

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**CEVİZ (*Juglans regia* L.) BİTKİSİNİN *IN VITRO*  
MİKROÇOĞALTIMI ÜZERİNE KÜLTÜR  
TİPLERİNİN ETKİLERİ**

Cem DİRLİK

Danışman: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir  
2021







## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Ceviz (*Juglans regia* L.) Bitkisinin *In Vitro* Mikroçoğaltımı Üzerine Kültür Tiplerinin Etkileri**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / .... / 20..

Cem DİRLİK



**ÖZET****CEVİZ (*Juglans regia* L.) BİTKİSİNİN *IN VITRO* MİKROÇOĞALTIMI  
ÜZERİNE KÜLTÜR TİPLERİNİN ETKİLERİ**

DİRLİK, Cem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

2021, 63sayfa

Bu çalışmanın amacı, ceviz (*Juglans regia* L.) bitkisinde ‘Paradox’ anaç çeşidine ait nod eksplant kökenli *in vitro* çoğaltım için farklı kültür tiplerinin (yarı katı, sıvı ve çift-fazlı) etkilerinin belirlenmesi ve mikroçoğaltım için gerekli tüm basamakların gerçekleştirilerek etkili bir mikroçoğaltım protokolünün oluşturulmasıdır.

Çalışmanın ilk aşamasında uygun sterilizasyon yöntemini belirlemek amacıyla, Ulu Ceviz firmasından temin edilen nod eksplantları, farklı sterilizasyon yöntemlerine maruz bırakıldıktan sonra DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) ve Rugini (Rugini, 1984) temelli yarı katı besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. En etkili sterilizasyon yöntemi olan ST2 yöntemiyle, 15 dk deterjanlı su ve arkasından 15 dk akar su altında bekletilen eksplantlar, kabin içerisine alınarak 5 dk %70 alkol uygulandıktan sonra 5 dk birkaç damla Tween 20 ilave edilmiş %0,2 HgCl<sub>2</sub> içerisinde çalkalanmıştır. Daha sonra üç defa steril sudan geçirilerek otoklavlanmış besin ortamlarına transfer edilmişlerdir. Bu sterilizasyon işlemi, eksplantlarda en az kararmanın (%4) gözlemlendiği yöntem olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında yüzey sterilizasyonu sağlanan nod eksplantlarından sürgün indüksiyonu ve çoğaltımını gerçekleştirmek amacıyla, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin (IBA ve BAP) ve farklı kimyasal bileşiklerin (adenin hemisülfat ve kazein hidrolizat) kullanıldığı farklı besin ortamlarında (DKW, Rugini, Modifiye Rugini), farklı kültür tiplerinde (yarı katı, sıvı, çift-fazlı) kültüre alınmışlardır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, birim eksplant başına düşen en yüksek sürgün sayısı (1,05 sürgün/eksplant) yarı katı SP4 (4 mg/L BAP+ 0.001 mg/L IBA + 200 mg/L kazein hidrolizat+ 50 mg/L adenin hemisülfat içeren

DKW) besin ortamında elde edilmiştir. Ayrıca birim eksplant başına düşen ortalama nod sayısı (7,95 adet/eksplant) ve ortalama sürgün uzunluğu (1,6 cm) bakımından en başarılı ortam yarı katı SP2 (2 mg/L BAP + 0.001 mg/L IBA+ 200 mg/L kazein hidrolizat+ 50 mg/L adenin hemisülfat içeren DKW) olmuştur.

Çalışmanın üçüncü aşamasında çoğaltımı gerçekleştirilen sürgün eksplantlarının köklendirilmesi amacıyla iki aşamalı bir *in vitro* köklendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Köklendirme çalışmasının ilk aşaması olan kök indüksiyonu için; sürgün eksplantları, farklı sükroz konsantrasyonlarının (30 ve 40 g/L) ve FeEDDHA (119 mg/L)'nın denenmesi amacıyla 4 mg/L IBA içeren farklı yarı katı besin ortamlarında (Modifiye MS, ½ Modifiye MS, Modifiye DKW, ½ Modifiye DKW) 7 gün boyunca karanlık koşullar altında kültüre alınmışlardır. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre en iyi kök indüksiyonu; 4 mg/L IBA içeren Modifiye yarı güç MS ortamında sağlanmıştır. Kök indüksiyonu gerçekleştirilen sürgün eksplantları daha sonra kök oluşumunun ve uzamasının sağlanması amacıyla; jelleştirici ajan olarak 2.4 mg/L Gelrite içeren, hormonsuz ve vermikülit ile karıştırılan (1:1 h/h) farklı besin ortamlarında (Modifiye DKW, ½ Modifiye DKW) 21 gün boyunca 16 saatlik fotoperiyotta (3500 lüks) kültüre alınmıştır. Kök oluşumu için en etkili ortam DKW temelli ¼ DFe olarak belirlenmiş ve %45,45 köklendirme oranı elde edilmiştir.

Araştırmamızda, sıvı ve çift-fazlı besin ortamlarında kültüre alınan eksplantlar kararma ve kontaminasyon nedeniyle kaybedilmiştir. Sürgün rejenerasyonu ve köklenme bakımından yarı katı besin ortamları daha başarılı bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Juglans regia* L., ceviz, Paradox, *in vitro*, kültür tipleri, yarı katı, sıvı, çift-fazlı, mikroçoğaltım, nod eksplantı, sürgün

**ABSTRACT****EFFECTS OF CULTURE TYPES ON *IN VITRO*****MICROPROPAGATION OF WALNUT (*Juglans regia* L.)**

DİRLİK, Cem

MSc in Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aynur GÜREL

2021, 63 pages

The aim of this study is to determine the effects of different culture types (semi solid, liquid, double-phase) and to create an effective micropropagation protocol performing all the steps required for *in vitro* reproduction of nodal explant origin in "Paradox" rootstock cultivar in walnut (*Juglans regia* L.) plant.

In the first phase of the study, in order to determine the appropriate sterilization method, nodal explants obtained from Ulu Ceviz company were cultured in DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) and Rugini (Rugini, 1984) based nutrient semi solid media after exposure to different sterilization methods. With the ST2 method, which is the most effective sterilization method, explants kept in detergent water for 15 minutes and then under running water for 15 minutes and then taken into the cabin and 70% alcohol was applied for 5 minutes, and after, shaken for 5 minutes with 0.2% HgCl<sub>2</sub> added a few drops of Tween 20. Later, it was passed through sterile water three times and transferred to autoclaved nutrient media. This sterilization method was determined as the method in which the least blackening (4%) observed in the explants.

In the second stage of the study, different plant growth regulators (IBA and BAP) and different chemical compounds (adenine hemisulphate and casein hydrolyzate) were used in different nutrient media (DKW, Rugini, Modified Rugini) and different culture types (semi solid, liquid, double-phase) in order to perform shoot induction and production from node explants with surface

sterilization. According to the results obtained in the study, the highest number of shoot per unit (1.05 shoots / explant) was obtained in semi solid SP4 (4 mg/L BAP + 0.001 mg/L IBA + 200 mg/L casein hydrolyzate + 50 mg/L adenine hemisulphate containing DKW) in nutrient medium. In addition, the most successful medium in terms of the the avarege number of nodes per explant (7.95 nodes / explant) and avarage shoot length (1.6 cm) was semi solid SP2 (DKW with 2 mg/L BAP + 0.001 mg/L IBA + 200 mg/L casein hydrolyzate + 50 mg / L adenine hemisulphate).

In the third stage of the study, a two-step *in vitro* rooting process was carried out in order to root of shoot explants produced. For root induction, which is the first stage of rooting study; shoot explants were cultured in different semi solid nutrient media containing 4 mg/L IBA (Modified MS, Modified MS, Modified DKW, ½ Modified DKW) to test the effect of different sucrose concentrations (30 and 40 g / L) and FeEDDHA (119 mg / L) under dark conditions during the 7 day. According to the results from the study, the best root induction was provided from half strength Modified MS medium with 4 mg/L IBA. Shoot explants, which root induction was performed, later in order to ensure root formation and elongation were cultured in different nutrient media (Modified DKW, ½ Modified DKW) containing 2.4 mg/L Gelrite as a gelling agent, without hormones and mixed with vermiculite (1:1 v/v) for 21 days in a 16-hour photoperiod (3500 lux). The most effective medium for root formation rate (45.45%) was determined as DKW based ¼ DFe.

In our study, explants that were cultured in liquid and double-phase nutrient media were lost due to browning and contamination. Semi-solid nutrient media were found more successful in terms of shoot regeneration and rooting.

**Keywords:** *Juglans regia* L., walnut, Paradox, *in vitro*, culture types, semi solid, liquid, double-phase, micropropagation, node explants, shoot

## ÖNSÖZ

Ceviz bitkisi kullanım alanları itibariyle hem Türkiye hem de Dünya piyasasında değerli meyveden biridir. Ancak çoğaltımı aşamasında tohum kullanımı meyve kalitesini uzun vadede düşürmekte ve üreticilerin karlılığını azaltmaktadır. Bahçelere yeni ekilecek fidanların saha performansını kanıtlamış ceviz anacı üzerine aşılı fidanlar ile yapılması bahçedeki ağaçları standardize ederek üreticilerin karlılığını arttıracak ve bu durum ülkemize katma değer olarak geri dönecektir.

Bu amaç kapsamında çalışmamızda farklı kültür koşullarında “Paradox” ceviz anacının mikroçoğaltımı amaçlanmıştır. Uygulanabilir ve verimli bir mikroçoğaltım prosedürü elde ederek klonal olarak üretilmiş anaçlar daha erişilebilir olması ve dikim alanları artması tez sürecimde motivasyon kaynağı olmuştur. Çalışmadan elde edilen sonuçlar ile fidan üretim sektöründe Bitki doku kültürü laboratuvarında “Paradox” ceviz anaçları fidan üretim sektöründe daha ulaşılabilir olacak ve ülkemizdeki ceviz dikili arazilerde birim alandan alınan verim artacaktır.

Bu tez çalışmasının, yürütülmesine katkı sağlayan ve yardımcı olan EBİLTEM TTO’ ya, ULU CEVİZ Tarım Ürünleri Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi’ne teşekkürü borç bilirim.

İZMİR

.../.../20..

Cem DİRLİK



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	3
2.1. Ceviz ile İlgili Genel Bilgiler	3
2.2. Cevizin Ekonomik Değeri	5
2.3. Ceviz Üretim Teknikleri	8
2.3.1 Generatif, Tohumla çoğaltma	8
2.3.2. Vejetatif Çoğaltma	9
2.3.2.1. Aşılama	9
2.3.2.2. Mikroçoğaltım	10
2.4. Paradox Ceviz Çeşidi ile İlgili Doku Kültürü Çalışmaları	12
2.5. Diğer Ceviz Genotipleri ile ilgili Yapılan Doku kültürü Çalışmaları	13

**İÇİNDEKİLER (Devam)**

	<u>Sayfa</u>
3. MATERYAL METOT	21
3.1. Materyal	21
3.2. Metot	21
3.2.1. Nod Eksplantlarının Kültüre Alınacağı Yarı Katı Besin Ortamlarının Hazırlanması	21
3.2.2. Ön Sterilizasyon Aşaması	24
3.2.3. Hazırlık Aşaması	24
3.2.4. Sterilizasyon Aşaması	24
3.2.5. Yarı Katı Besin Ortamında Sürgün İndüksyonu Denemeleri	26
3.3. Nod Eksplantlarının Sıvı Besin Ortam Denemeleri	27
3.4. Nod Eksplantlarının Çift-Fazlı Besin Ortamında Mikroçoğaltım Denemeleri	28
3.5. <i>In Vitro</i> Köklendirme denemeleri	28
3.6. Verilerin değerlendirilmesi	29
4. BULGULAR	30
4.1. Sterilizasyon Denemesinin Sonuçları	30
4.2. Besin Ortamlarının Kararma Üzerine Etkisi	32
4.3. Besin Ortamlarının Hiperhidrisite Üzerine Etkisi	33

**İÇİNDEKİLER (Devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.4. Ortamların Nekroz Üzerine Etkisi	33
4.5. Sürgün İndükleme Denemeleri Sonuçları	35
4.5.1. Eksplant başına elde edilen ortalama nod sayısı (adet)	35
4.5.2 Eksplant başına elde edilen ortalama sürgün sayısı (adet)	38
4.5.3 Eksplant başına elde edilen ortalama sürgün uzunluğu (cm)	40
4.6 Nodal Eksplantların Sıvı Kültürde Mikroçoğaltım Denemeleri	41
4.7. Nodal Eksplantların Çift Faz Kültürlerinde Mikroçoğaltım Denemeleri	42
4.8. <i>In Vitro</i> Köklendirme Denemeleri	43
4.8.1 Köklendirme indüksiyon denemeleri	43
4.8.2 Kök gelişimi denemeleri	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
6. ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR DİZİNİ	58
TEŞEKKÜRLER	62
ÖZGEÇMİŞ	63

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Juglans regia</i> L. Ağacı	3
2.2. <i>Juglans regia</i> L. Meyvesi	4
2.3. Ceviz çiçeklerinin morfolojileri a) olgunlaşmamış erkek b) olgunlaşmış erkek c) olgunlaşmamış dişi d) olgunlaşmış dişi çiçek.	8
2.4. Yeni çimlenmiş ceviz tohumu, çöğür	9
4.1. Farklı sterilizasyon yöntemlerinin dört gözlem parametresine (kararma (%), kontaminasyon (%), hiperhidrisite (%), nekroz (%)) göre değerlendirilmesi ..	31
4.2. Ceviz kültüründe karşılaşılan problemlerin örnekleri a) kararma b)kontaminasyon c) hiperhidrisite d) nekroz	32
4.3. Farklı besin ortamlarının kararma yüzdesine etkisi	32
4.4. Farklı besin ortamlarının hiperhidrisite yüzdesine etkisi	33
4.5. Farklı besin ortamlarının nekroz yüzdelerine etkisi	35
4.6. Farklı besin ortamlarının sürgün sayısı üzerine etkileri	36
4.7. Farklı besin ortamlarının sürgün oluşturma yüzdesi üzerine etkileri	36
4.8. Her bir besin ortamından elde edilen sürgün örnekleri a) DKW b) D1B c) D4B ç) SP1 d) SP2 e) SP4 f) Ru g) Ru1 ğ) Ru2 h) mRu0,5 ı) mRu1	37
4.9. Farklı besin ortamlarının nod sayısı üzerine etkileri	39
4.10. SP2 ortamında indüklenen sürgün örnekleri	39
4.11. Farklı besin ortamlarının sürgün uzunluğu üzerine etkileri	41

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12. Sıvı kültürde mikroçoğaltım denemelerinde ölen ceviz eksplantı örnekleri	41
4.13. Çift faz denelerinde kararma ve kontaminasyon sonucu ölen ceviz eksplantı örnekleri	42
4.14. Kök indüksiyon ortamlarının kök oluşumunun başlamasına yönelik etki oranı (%)	43
4.15. MD304 ortamında gelişen kök indüksiyonu	44
4.16. ½ I30 ortamında kurulan kök indüksiyon denemeleri	44
4.17. ¼ DFe ortamında sürgünden kök gelişimi	46
4.18. Köklendirme ortam içeriklerine göre kök oluşum yüzdeleri (%)	46
4.19. Köklendirme ortam denemelerine ait ortalama kök uzunluğu (cm) ve ortalama kök sayısı (adet)	47
4.20. MDFe besin ortamında oluşan kallus görüntüsü ve kök yapısı	47
4.21. ¼ DFe ortamında gelişen sürgüne ait yaprak ucunda oluşan kallus ve kök görüntüsü	48
4.22. Vermikulit denemeleri sonucu gelişen mikrosürgünler a) ¼ DV besin ortamında oluşan yoğun kallus yapısı, b) MDV besin ortamında gelişen kök yapısı	48

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Türkiye son 5 yıllık ceviz pazar verileri (bin ton)	6
2.2. Önemli ceviz üreticisi ülkelerin 2013-2017 üretim miktarları	7
3.1. Çalışma kapsamında kullanılan DKW ve Rugini besin ortamları içerikleri.	22
3.2. Çalışma kapsamında kullanılan MS ve modifiye MS besin ortamlarının içerikleri	23
3.3. Sterilizasyon yöntemleri	26
3.4. Sterilizasyon yöntemi ve kullanılan ortam kodları	26
3.5. Besin ortamı içerikleri	27
3.6. Kök indüksiyonu denemelerinde kullanılan besin ortamı kompozisyonu	29
3.7. Kök gelişimi denemelerinde kullanılan besin ortamı kompozisyonu	29
4.1. Farklı sterilizasyon metodlarının kararma, kontaminasyon, hiperhidrisite ve nekroz üzerine etkileri	31
4.2. Farklı besin ortamlarının kararma, hiperhidrisite ve nekroz yüzdesine etkisi	34
4.3. Eksplant başına elde edilen ortalama sürgün sayısı ve sürgün oluşturan eksplant yüzdesi	35
4.4 Farklı besin ortamlarında kültüre alınan nodal eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün sayısının tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi	36

4.5 Farklı besin ortamlarında kültüre alınan nodal eksplantlarının sürgün oluşturma yüzdesinin tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi	36
4.6. Eksplant başına elde edilen ortalama nod sayısı ve standart hata	38
4.7. Farklı besin ortamlarında kültüre alınan nodal eksplantlarından elde edilen sürgünlerin ortalama nod sayısının tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi	38
4.8. Eksplant başına elde edilen ortalama sürgün uzunluğu ve standart hata	40
4.9. Farklı besin ortamlarında kültüre alınan nodal eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunluğunun tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi	40
4.10. Köklendirme denemelerinde besin ortamlarının parametrelere etkisi	45

**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ****Simgeler**

M

 $\mu$ M

g/L

mg/L

°C

**Açıklama**

Molar

Mikromolar

gram/L

miligram/L

Santigrad derece

**Kısaltmalar**

MS

DKW

WPM

TDZ

NAA

BAP

IAA

IBA

FAO

**Açıklama**Murashige & Skoog  
(1962)Driver and Kuniyuki  
Walnut Medium  
(1984)Woody Plant Medium  
(1981)

Thidiazuron

Naftalen Asetik Asit

6-Benzilaminopürin

İndol-3-Asetik Asit

İndol Bütirik Asit

Food and Agriculture  
Organization of the  
United Nations

TÜİK

Türkiye İstatistik  
Kurumu

## 1. GİRİŞ

Ceviz (*Juglans regia* L.), botanikte Dicotyledoneae sınıfı, Juglandales takımı, *Juglandaceae* familyası ve *Juglans* cinsinde yer alır. *Juglans* cinsi içerisinde günümüzde özellikleri belirlenen 18 türden en önemlisi ve üstün meyve kalitesi ile ceviz denildiğinde ilk akla gelen, “Anadolu cevizi”, “İran cevizi” ve “İngiliz cevizi” olarak da adlandırılan *J. regia*’dır (Anonim 2019a).

*Juglans regia* L., bir gıda olarak besleyici değeri, yüksek ahşap kalitesi ve farmakolojik uygulamalar için sahip olduğu biyoaktif özellikleri ile ticari olarak Dünya’da ve Türkiye’de oldukça önemli bir türdür (Yiğit ve Ay, 2016).

Dünya genelinde ceviz ağaçlarının geleneksel yöntemlerle çoğaltılması uzun yıllardır yoğun bir şekilde incelenmektedir. Ancak *Juglans regia* L.’nin pazar değerini karşılayabilmek adına kullanılan geleneksel yöntemler tam olarak mükemmelleştirilmemiştir. Cevizin gen merkezi ve anavatanı arasında yer alan Türkiye, ceviz varlığı ile dünyada önemli bir ülke olarak yer almasına rağmen üretim ve ihracatta maalesef istenen yerde değildir (Ketenci ve Bayramoğlu, 2018).

Vejetatif çoğaltma yöntemlerinden bir diğeri doku kültürü ile çoğaltmadır. Doku kültürü, sahip olduğu avantajla istenilen hatların yoğun şekilde üretilmesine imkan sağlamaktadır. Bu nedenle çeşitli bitki türlerinde tohum, çelik, dallandırma ve aşılama gibi geleneksel çoğaltım yöntemine karşı önemli bir seçenek haline gelmektedir. Ancak meyve türleri ve özellikler sert kabuklu türlerin mikroçoğaltımı otsu bitkilerin mikroçoğaltımına göre oldukça zordur. Bu nedenle seçilmiş sert kabuklu meyve klonlarının mikroçoğaltımında uygun fizyolojik dönem ve eksplant seçimi, kültürlerde tanen ve diğer toksik bileşiklerin zararlı etkilerinin üstesinden gelinmesi, kabul edilebilir sürgün çoğaltım oranının sağlanması, köklü sürgünlerin elde edilmesi son derece önemlidir (Babaoğlu ve ark., 2002).

Sahip olduğu ceviz varlığı ve ürettiği ceviz miktarı ile dünya ülkeleri arasında ilk sıralarda yer alan ülkemiz; standart çeşitlerle bilinçli bir ceviz yetiştiriciliği gerçekleştiremediğinden hem üretim hem de pazarlamada birçok problemle karşılaşmaktadır ve dolayısıyla mevcut potansiyelinden gereği gibi faydalanamamaktadır. Ceviz yetiştiriciliğinde sürdürülebilir bir yöntemin uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle tarımda sürdürülebilir üretim

için önerilen en önemli tekniklerden biri olan bitki doku kültürü yöntemlerinin ceviz üretimi açısından en uygun alternatif olacağı düşünülmektedir. Bitki doku kültürü çalışmalarında, meydana gelen ilerlemeler sayesinde çeşitler, türler ve türlerarası melezlemeler sonucu elde edilmiş bitkiler çoğaltılabilmektedir (Şirin, 2014). Son yıllarda bu yöntemle *J. regia* türüne ait çeşitler çoğaltılabilmekte ve kendi kökleri üzerinde araziye dikilebilmektedir. *J. regia* ile bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmalarda mikroçoğaltım yönteminin önemli bir potansiyele sahip olduğu belirtilse de türe bağlı genotip farklılıkları, kararma, kontaminasyon ve düşük köklenme oranı vb. zorluklar *J. regia* türleri için daha hala çözülemeyen sorunlar olmaya devam etmektedir (Yıldırım, 2018).

Klonal anaçların çoğaltılması daldırma ve çelik gibi yöntemlerle yapılmakla beraber, çoğaltma esnasında oluşan biyotik ve abiyotik sorunlar kayıpları büyük boyutlara ulaştırabilmektedir. Bunun yanı sıra iklime bağlı olunması ve yeterli miktarda anaç bitki bulunmaması klasik vejetatif çoğaltım metotlarının kullanımını kısıtlayan problemler arasında bulunmaktadır. Bu amaçla doku kültürüyle çoğaltma yöntemi sayesinde mevsimlere bağlı kalmaksızın, kısa sürede, küçük alanlarda, çok sayıda klon anaç elde edilmesi mümkündür (Hepaksoy 2004).

Bu tez kapsamında önemli ceviz anaçlarından olan Paradox çeşidinde tam bitki rejenerasyonu sağlayarak etkili bir mikroçoğaltım protokolünün oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmada ceviz türlerinin mikroçoğaltımında zorluklar çıkaran kararma ve kontaminasyon problemlerinin önüne geçmek amacıyla öncelikle farklı sterilizasyon yöntemlerinin uygulanması hedeflenmiştir. En uygun sterilizasyon yöntemi belirlendikten sonra sürgün indüksiyonunun sağlanması ve maksimum çoğaltım katsayısının belirlenmesi adına yarı katı, sıvı ve çift faz kültür koşullarında denemelerin gerçekleştirilmesi esas alınmıştır. Elde edilen sürgünlerin daha sonra köklendirme ortamlarına transfer edilmeleriyle nod kökenli eksplantlardan sağlıklı bitkiciklerin elde edilmesi hedeflenerek, genellikle *in vitro* kültüre karşı dirençli olduğu bilenen bu ceviz çeşidinde uygun bir mikroçoğaltım protokolünün oluşturulması esas alınmıştır.

## 2. LİTERATÜR BİLDİRİŞİ

### 2.1. Ceviz ile İlgili Genel Bilgiler

Sistemik olarak ceviz, Magnoliophyta (Manolyagiller, Çiçekli Bitkiler) bölümü, Magnoliopsida (Manolyalar, Çift Çenekliler, Dikotiledon) sınıfı, Juglandales (Cevizgiller) takımı, Juglandaceae (Cevizler) familyası ve *Juglans* (Ceviz) cinsine dâhil edilmektedir. Ceviz  $2n=32$  kromozoma ve 25 türe sahip olup, bunların içerisinde en önemli ve ilk akla geleni ise *Juglans regia* L.'dir. Bu tür, dünyada “Anadolu cevizi”, “İran cevizi” ve “İngiliz cevizi” olarak bilinmekte ve özellikle meyvesi için yaygın şekilde yetiştirilmektedir (Şen, 2011) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: *Juglans regia* L. Ağacı (Anonim1, 2021)

Sert kabuklu bir meyve olan ceviz; yeşil kabuk, sert kabuk ve iç cevizden oluşmaktadır. Yeşil kabuk; kılıf ve çiçek örtüsünden, sert kabuk ise yumurtalık duvarından oluşmaktadır. İç cevizde embriyo bulunmaktadır. Tohum, endosperm bulundurmamakta ve yedek besinler kotiledonda birikmektedir (Şekil 2.2). Genç dallar pürüzsüzdür, ilerleyen yıllarda ise gövdede çatlaklar oluşur ve kabuk rengi gri ve siyahımsı bir renk alır. Ceviz ağacı gerekli koşullar sağlandığında 25 m'ye kadar boylanabilmektedir. Büyük yuvarlak taç yapmasına rağmen taç özelliği çeşitlere göre değişebilmektedir (Yıldırım, 2018).



Şekil.2.2.: *Juglans regia* L. Meyvesi (Anonim2, 2021)

Ceviz, Orta Asya sıradağlarının doğal bitkisi olup; buradan Sincan (Doğu Türkistan)'a, Kazakistan'ın bir kısmına, Özbekistan'a, Kırgızistan'ın güneyine, buradan Nepal dağlarına, Tibet'e, Hindistan'ın kuzeyine ve Pakistan üzerinden Afganistan'a, Tacikistan'a, Türkmenistan'a, İran'a, Irak'a, Azerbaycan'ın bir kısmına, Ermenistan'a, Gürcistan'a, Türkiye'nin doğusuna ve giderek Türkiye'nin tamamına yayılmıştır. Ceviz aynı zamanda Bulgaristan, eski Yugoslavya, Romanya ve Yunanistan'ın da doğal bitki örtüsü içinde yer almaktadır (Şen, 2011).

Ülkemiz ceviz ağacı varlığı bakımından son yıllara kadar dünyada önemli bir ülke olmasına rağmen üretimin tohumdan yetiştirilen genotiplerle yapılması nedeniyle beklenen üretim seviyelerine ulaşamamıştır (Yıldız ve Çolak 2017). Ülkemiz ceviz üretiminde 1970'li yıllarda dünyada en öndeleyen, 1980'li yıllarda ikinciliğe, 1990'lı yıllarda üçüncülüğe ve 2000'li yıllarda da dördüncülüğe

gerilemiş, hatta ürettiğimiz ceviz miktarı ülkemizin ihtiyacını karşılayamaz duruma gelmiştir (Aslansoy 2012).

Ceviz, özellikle kuru meyve şeklinde çok tüketilmektedir. Ceviz bitkisinin ağaç kabuğu, meyve kabuğu, yeşil meyve kabuğu ve yaprak aksamaları ilaç ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak, halı ve tekstil endüstrisinde ise boyar madde olarak kullanılmaktadır (Yiğit ve ark., 2009). Ceviz ağacı; ayrıca sert ve odunsu özelliğinden dolayı, kerestecilik sanayisinde de kullanılmaktadır. Kaliteli mobilya üretiminde ve iç mekan dekorasyonunda oldukça fazla kullanılan bir ana malzemedir (Yıldırım, 2018).

Ülkemiz dünya ceviz üretiminde büyük paya sahip olmasına ve ceviz varlığı ile dünyada önemli bir ülke olarak yer almasına rağmen üretimin ve ihracatın ne yazık ki istenilen yerde olmadığı ifade edilmiştir. Bununla birlikte ülkemizin yılda 77 bin ton gibi önemli miktarda ceviz ithal ettiği kaydedilmiştir (TÜİK, 2018).

Ülkemizde ceviz üretiminin önündeki en büyük engeller; toprağın yüksek pH'sı, ceviz antraknoz hastalığı ve iç kurdudur. Bu yüzden ülkemizde bu stres faktörlerine dayanıklı materyallerin üretimi ve plantasyonlarının yaygınlaştırılması gerekmektedir (Budak, 2010).

## 2.2. Cevizin Ekonomik Değeri

Cevizin (*Juglans regia* L.), dünyada yetiştirilen en eski sert kabuklu meyve türlerinden biri olduğu bilinmektedir (Şen, 1986). *Juglans* cinsi içerisinde genel anlamda en çok *Juglans regia*'nın kültürü ve ticaretinin yapıldığı bilinmektedir (Çam, 2020).

Ceviz, FAO 2016 yılı verilerine göre sert kabuklu meyveler içerisinde dünyada alan olarak %24'lük payla üçüncü sırayı almakta olup, üretim miktarı bakımından ise %34'lük pay ile ilk sıradadır (Ketenci ve Bayramoğlu, 2018). Her yıl düzenli olarak artan Dünya ceviz üretimi 2.282.264 tona kadar yükselmiştir. Dünyada önemli ceviz üreticisi ülkeler Çin, Amerika Birleşik Devletleri, İran ve Türkiye'dir. Yaklaşık 979.366 ton üretim ile dünyada birinci sırada yer alan Çin'in

ceviz üretimi genellikle tohumdan yetişmiş tiplerden karşılandığı için, standardizasyon problemi bulunmaktadır. Hâlbuki ABD’nde ceviz üretiminin tamamı standart çeşitlerle kurulu kapama ceviz bahçelerinden temin edilmektedir (Açıksöz, 2020) (Çizelge 2.1).

**Çizelge 2.1:** Türkiye son 5 yıllık ceviz pazar verileri (bin ton) (TÜİK,2020)

	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19	Son İki Yıllık Değişim (%)
<b>Alan (ha)</b>	69.395	71.820	86.853	92.013	111.775	21,5
<b>Verim (kg/ağaç)</b>	26	25	24	24	22	-8,3
<b>Meyve Veren Ağaç (bin adet)</b>	7.001	7.596	8.171	8.767	9.875	12,6
<b>Üretim</b>	181	190	195	210	215	2,4
<b>Yurt içi kullanım</b>	202	241	248	275	283	2,8
<b>İthalat</b>	34	64	66	77	103	33,6
<b>İhracat</b>	8	8	8	7	30	328,6

Ceviz dış ticaret verileri kabuklu ve kabuksuz olarak incelendiğinde 2019 yılında Türkiye’nin kabuklu ceviz ihracat değeri yaklaşık 42 bin\$, kabuksuz ceviz ihracat değeri 26,2 milyon\$ olarak gerçekleşmiştir. 2019 yılında kabuklu ceviz ithalat değeri yaklaşık 106 milyon\$, kabuksuz ceviz ithalat değeri 23 milyon\$ olarak gerçekleşmiştir.

Türkiye kabuklu ceviz ithalatında %70’lik payla Şili, Ukrayna ve ABD, kabuksuz ceviz ithalatında ise %75’lik payla Ukrayna ve Hindistan önemli bir yere sahiptir. Kabuklu ceviz ihracatında KKTC, kabuksuz ceviz ihracatında ise Suudi Arabistan birinci sıradadır (TÜİK,2020).

Türkiye’de kapama ceviz bahçelerinin tesisinde iklime uygun fidan seçiminin yapılması, standart ve kaliteli çeşitlerin üretimi, uygun fiyat oluşumu için mevcut pazarlama sistemi içerisinde iyileştirmeyi sağlayacak düzenlemeler yapılması, ceviz üretiminde ve ticaretinde rekabeti artırıcı etkisi olacaktır. Cevizin anavatanı olan Türkiye’de, ceviz üretiminde bilinç düzeyinin yüksek olmaması, aşılı fidan temininde ve kapama bahçelerinin kurulmasında yetersiz olunması üreticilerin yeterli ve kaliteli meyve elde etmesinde sorunlara neden olmaktadır (TEPGE, 2020).

Bağ-bahçe ürünlerinin üretim, tüketim ve ticareti yönünden önemli ülkeler arasında yer alan Türkiye, köklü bir meyvecilik kültürüne sahip olup birçok meyve türünde olduğu gibi cevizin de yetiştirilebildiği uygun ekolojilere sahiptir. Ülkemiz, cevizin anavatanı olmasından dolayı, hemen hemen her ilinde ceviz yetiştiriciliği yapılmaktadır. Türkiye, Dünya ceviz üretiminde A.B.D., Çin ve İran'dan sonra dördüncü sırada gelmektedir (Çizelge 2.2). Ülkemizin 2018 yılında ceviz üretimi il düzeyinde incelendiğinde; Kahramanmaraş'ın 10 515 ton ile ilk sırada yer aldığı görülmekte, bu ilimizi 8 828 ton ile Bursa ve 8 537 ton ile Denizli ve 7 863 ton ile Mersin takip etmektedir (Açıksöz, 2020).

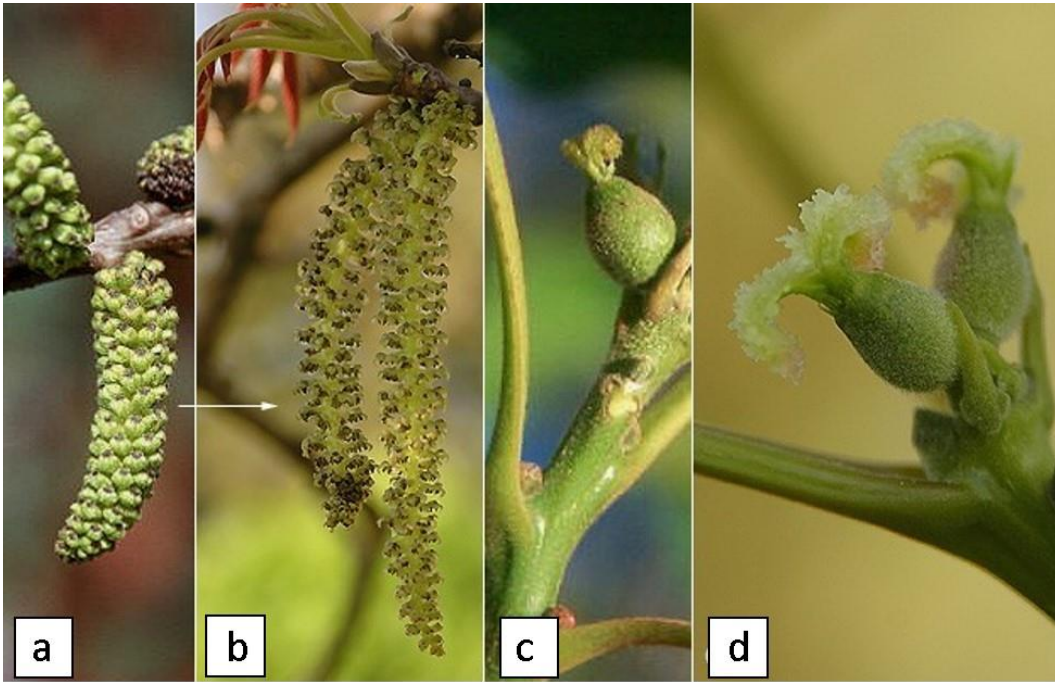
**Çizelge 2.2.** Önemli ceviz üreticisi ülkelerin 2013-2017 üretim miktarları (Açıksöz, 2020)

Ülke	2013	2014	2015	2016	2017
Çin	1 432 984	1 580 940	1 683 409	1 785 879	1 925 403
ABD	446 334	518 002	547 032	607 814	571 526
İran	222 610	403 158	420 000	405 281	349 192
<b>Türkiye</b>	<b>212 140</b>	<b>180 807</b>	<b>190 000</b>	<b>195 000</b>	<b>210 000</b>
Meksika	106 945	125 758	122 714	141 818	147. 198
Ukrayna	115 800	102 740	115 080	107 990	108 660
<b>Dünya</b>	<b>3 007 937</b>	<b>3 385 873</b>	<b>3 589 651</b>	<b>3 747 549</b>	<b>3 829 626</b>

## 2.3. Ceviz Üretim Teknikleri

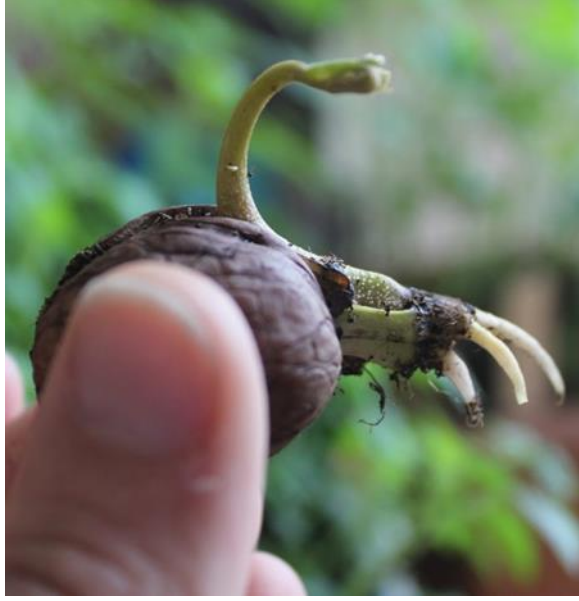
### 2.3.1 Generatif, Tohumla Çoğaltma

Ceviz tek evcikli bir bitkidir. Aynı ağaç üzerindeki çiçekler farklı cinsiyet özellikleri taşırlar. Dişi ve erkek çiçeklerin farklı dönemlerde tozlama ve tozlaşma olgunluğuna gelmeleri sonucu sürekli yabancı tozlaşma oluşmaktadır (Özkan, 1991) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Ceviz çiçeklerinin morfolojileri a) olgunlaşmamış erkek b) olgunlaşmış erkek c) olgunlaşmamış dişi d) olgunlaşmış dişi çiçek (Anonim3, 2021)

Tohumla yapılan çoğaltmalarda meydana gelen yavru bitkiler, ana bitkinin hemen hemen hiçbir özelliğini taşımazlar. Bu nedenle cevizlerde tohumla çoğaltma, anaç veya çöğür eldesi ve ıslah çalışmaları dışında, genetik açılım nedeniyle, tercih edilen edilen bir çoğaltma yöntemi değildir (Budak, 2010) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Yeni çimlenmiş ceviz tohumu, çöğür (Anonim4, 2021)

### 2.3.2. Vejetatif çoğaltma

Genetik açılma nedeniyle tohumla çoğaltmanın yapılamadığı ceviz bitkileri vejetatif yollarla çoğaltılırlar. Cevizlerde aşı tutmasının zor olmasına rağmen günümüzde geçerliliğini koruyan çoğaltma metodu halen aşı ile çoğaltmadır (Budak, 2010).

#### 2.3.2.1 Aşılama

Cevizde fidan elde etme, çeşit değiştirme ve onarma amacıyla aşılama yapılmaktadır. Cevizde aşı başarısını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Sıcaklık başta olmak üzere ekolojik koşullar, kanama, aşı kalemi kalitesi, anaç kalitesi, anacın gelişme durumu, aşı ustasının el becerisi, aşı sonrası bakım koşulları ve aşıda kullanılan malzemelerin durumu bunlar arasında gösterilebilir. Bu faktörler içerisinde sıcaklık, kanama ve aşı kalemi kalitesi daha önemlidir. Cevizde optimum aşı kaynaşması için 25–27°C sıcaklığa ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun yanında aşırı özsu akıntısı ile meydana gelen kanama olayı aşı kaynaşmasını olumsuz etkilemektedir. Cevizde çeşit değiştirme amacıyla yarma, kakma ve kabuk

altı aşı yöntemleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte en yaygın kullanılan yöntem kabuk altı aşısıdır (Er ve ark., 2017).

### 2.3.2.2 Mikroçoğaltım

Vejetatif çoğaltma yöntemlerinden bir diğeri bitki doku kültürü ile çoğaltım yöntemidir. Doku kültürü, sahip olduğu avantajlarla istenilen hatların yoğun şekilde üretilmesine imkan sağlamaktadır. Bu nedenle, çeşitli bitki türlerinde tohum, çelik, dallandırma ve aşılama gibi geleneksel çoğaltım yöntemine karşı önemli bir seçenek haline gelmektedir. Ancak meyve türleri ve özellikle sert kabuklu türlerin mikroçoğaltımı, otsu bitkilerin mikroçoğaltımına göre oldukça zordur. Bu nedenle seçilmiş sert kabuklu meyve klonlarının mikroçoğaltımında uygun fizyolojik dönem ve eksplant seçimi, kültürlerde tanen ve diğer toksik bileşiklerin zararlı etkilerinin üstesinden gelinmesi, kabul edilebilir sürgün çoğaltım oranının sağlanması, köklü sürgünlerin elde edilmesi son derece önemlidir (Şirin, 2014).

Bitki doku kültüründe en önemli aşama sterilizasyon işlemidir. Bitki doku kültüründe bakteriler en yaygın kontaminasyon kaynaklarıdır. Bu mikroorganizmalar bitki materyallerinin yüzeyinde olabileceği gibi iletim demetlerinde de bulunabilirler. Benzer şekilde funguslar da kültür ortamına bitkisel materyaller aracılığı ile taşınabilirler. Yüzey sterilizasyonu iyi yapılmadığı takdirde bu mikroorganizmalar kültür ortamında ciddi kontaminasyonlara neden olmaktadır. Bitki doku kültürü çalışmalarında, bitkisel materyallerin yüzeylerinin bakteri, mantar ve benzeri mikroorganizmalardan arındırılabilmesi için gerekli olan optimum dezenfektan çeşitleri, konsantrasyonları ve uygulama süreleri farklılık göstermektedir. Bu yüzden, sterilizasyon denemesi sırasında en düşük ve en yüksek konsantrasyonda dezenfektan dozunun belirlenmesi, kullanılacak optimum dezenfektan konsantrasyonunun belirlenmesinde önemli parametrelerdir (Kyte ,1987).

Literatür bilgileri incelendiğinde; Fu ve ark. (2003), *Carya illinoensis* (pikan cevizi) bitkisinin sürgün uçları kullanılarak, en uygun sterilizasyon yönteminin önce %70

etil alkole batırılıp ve 15 dakika boyunca %0,2 HgCl<sub>2</sub>' e (birkaç damla Tween 20 ilave edilerek) karıştırılıp ve daha sonra 10 kez steril saf su ile durulanmasıyla elde edilmiştir. Eksplantlar karanlık ortamda ve aktif kömür ilave edilerek, kararma engellenmiştir. Penisilin ve streptomisinin besin ortamına ilave etmenin kontaminasyon oluşmasını engellendiği bildirilmiştir.

Rios Leal ve ark. (2007), olgun ceviz ağaçlarından alınan eksplantlarla yapılan mikroçoğaltım denemelerinde içsel kontaminasyonun önemli bir problem olduğunu belirtmişlerdir. Buna ek olarak yüzey sterilizasyonu aşamasında dokularda meydana gelen oksidasyon sonucu kararmanın sürgün oluşumunun büyük ölçüde azalmasına neden olduğu ve bu sorunun, dezenfeksiyon işlemine daha dayanıklı ancak yarı odunsulaşmış genç sürgün eksplantlarının kullanılması ile aşılabilecek bir problem olduğunu belirtmişlerdir.

Ceviz yetiştiriciliğinin gelişmiş olduğu ülkelerde cevizin doku kültürü ile çoğaltılması konusunda çok sayıda çalışma yapılmış ve önemli bilgi birikimleri elde edilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda kültür ortamına ilave edilecek uygun gelişme düzenleyici konsantrasyonu üzerinde durulmuştur. Bazı araştırmacılar cevizin doku kültürü ile çoğaltılmasında karşılaşılan en önemli problemlerden birisinin fenolik maddelerden kaynaklanan kararmanın olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca sürgün oluşum oranı ve sürgün uzunluğu açısından genotipler arasında önemli farklılıkların olduğu da bildirilmiştir (Şirin, 2014).

Ceviz gibi ekonomik değeri yüksek olan bir meyve türünün doku kültürü ile çoğaltılması konusunda yurt dışında çok sayıda çalışma yapılmış olmasına karşılık, ülkemizde bu konuda yapılmış yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Yapılmış olan çok az sayıdaki çalışmada ise istenen başarının yakalanamadığı bildirilmiştir (Fidancı 2005). Ceviz yetiştiriciliğinin gelişmiş olduğu bazı ülkelerde de başlangıçta başarısız sonuçlar alınmasına rağmen ısrarla çalışmalara devam edilmiş ve bugün cevizin doku kültürü ile çoğaltılması konusunda belli bir başarı seviyesi yakalanmıştır. Benzer şekilde ülkemizde de bu konuda yapılacak farklı çalışmalardan elde edilecek sonuçlarla pratikte kullanılabilecek bir başarı düzeyine ulaşılabilir. Türkiye’de ceviz bitkisinde doku kültürü ile ilgili çalışmalar, günümüzde hız kazanmakla birlikte, talebi karşılayacak seviyelere henüz

ulaşamamıştır. Yeterli miktarda anaç ve fidan üretimi için mikroçoğaltım çalışmalarının artırılması gerekmektedir. Ceviz bitkisinin hızlı, klonal ve hastaliksız bir şekilde anaç ve fidan üretiminin sağlanması için mikroçoğaltım son derece önemlidir (Şirin, 2014; Açıksöz, 2020).

Ceviz türlerinde gerçekleştirilen mikroçoğaltım çalışmalarında hala daha istenilen oranda bir başarı elde edilememiştir. Bunun temel nedeni ceviz bitkisinin neredeyse tüm türlerinin mikroçoğaltıma karşı direnç göstermesinden kaynaklanmaktadır. Cevizin mikroçoğaltımında karşılaşılan ve hala çözülmeyi bekleyen bazı sınırlamalar mevcuttur. Eksplant kaynaklı içsel kontaminasyon, kararma, düşük çoğaltım ve köklendirme oranı gibi etmenler cevizin mikroçoğaltım başarısını sınırlamaktadır ve bu sınırlamaların genotipe bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu nedenle ceviz türlerinde özellikle türe bağlı *in vitro* çalışmaların daha detaylı araştırılmasına ve geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Julian et al., 2020).

#### **2.4. Paradox Ceviz Çeşidi ile İlgili Doku Kültürü Çalışmaları**

Paradox ceviz anacı (*Juglans hindsii* x *J. regia*), *J. hindsii* ile *J. regia*'nin tozlanmasından elde edilen birinci jenerasyon hibrididir (F1). F1 hibrit dölünün yüksek genetik çeşitlilik, daha sonraki süreçte anaç olarak kullanımında bitki performansını etkileyecektir. Bu nedenle aynı özellikleri taşıyan yeterli miktarda anaç üretilebilmek için üstün özellikli Paradox anaçlarının vejetatif çoğaltımına yönelik metotların geliştirilmesi gerekmektedir. (Driver ve Kuniyuki, 1984).

Paradox cevizi (*Juglans hindsii* x *J. regia*)'nin apikal ve lateral meristemleri, bu anacın *in vitro* çoğaltımını gerçekleştirme durumunu incelemek üzere Driver ve Kuniyuki tarafından ele alınmıştır. Cevize spesifik bir ortam olan DKW (Driver and Kuniyuki Walnut Medium)'nin, 4,5µM benziladenin (BA) ve 5 nM indolbütirikasit (IBA) eklenmesiyle optimum çoklu sürgün gelişimini sağladığı ve çoğaltım katsayısının beşe kadar çıkabildiği belirtilmiştir (Driver and Kuniyuki, 1984).

Yapılan bir çalışmada, kök gelişimiyle ilgili kalitatif ve kantitatif gelişmeler, çoğalma ve köklenme kabiliyetleri için seçilen ve doku kültüründe çoğaltılan altı

klon ceviz ağacında elde edilmiştir. Seyreltilmiş jelleştirilmiş ortamın (DKW, makro elementler 1/4) ve vermikülitin, 250/200 (h/h) oranlarında kullanılan karışımı, 2 haftalık kültürden sonra sürgünlerin kök uzamasını (iki ile yedi kat) ve sekonder köklerin gelişimini kuvvetlice teşvik ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, köklenme oranlarının arttığı (%15 ile %50) ve köklenmiş eksplant başına primer kök sayısının iki ile altı kat daha yüksek olduğu da ifade edilmiştir. Vermikulite eklenen distile suyun her zaman en zayıf köklenmeye neden olduğu gösterilmiştir. Vermikülit, köklerin penetrasyonunu ve havalanmasını Gelrite'tan daha fazla teşvik etmiştir ve etkisi perlitinkinden daha iyi bulunmuştur. Bu protokol beş hibrit ceviz klonu için %80-100 köklenme ile sonuçlanmıştır (Jay-Allemand et al., 1992).

Peixe ve ark., 2015 yılında yaptıkları çalışmada mikroçoğaltılmış Juglans bitkilerinin aklimatizasyonunda bitki kaybının %0 ile 80 arasında değişen değerlerin literatürde bulunabildiğini, ancak çoğu çalışmada sorunu görmezden gelmenin tercih edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmalarında Juglans hibriti 'Paradox' (*Juglans regia* × *Juglans hindsii*) üzerine odaklanılarak, *in vitro* köklü bitkilerin aklimatizasyonundaki başarısızlık oranlarını en aza indirmek için yeni metodolojilerden faydalanmışlardır. *In vitro* köklenme ve aklimatizasyon verileri sunmuşlardır. Taşyünü küpleri, turba preslenmiş peletler ve Jiffy Preformas® test edilmiştir ve yaygın olarak Juglans mikroçoğaltım protokollerinde kullanılan Phytigel™ ile katılaştırılmış DKW besin çözeltisi ve nemlendirilmiş geleneksel vermikülit ile karşılaştırmalar yapılmıştır. Bu yeni yaklaşımlar, *in vitro* köklü bitkilerin aklimatizasyonuna izin vererek, nakil sonrası stresi önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Peixe et al., 2015).

## **2.5 Diğer Ceviz Genotipleri ile ilgili Yapılan Doku kültürü Çalışmaları**

Ceviz mikroçoğaltımında doku kültürü teknikleri ile ilgili ana sorunlardan biri düşük çoğaltım oranıdır. Bu düşük oranın sebebi rejenere sürgünlerin yavaş büyümesi ile ortaya çıkan uzun kültür süreleri ve buna bağlı kültürde gelişen gizli kontaminasyon olduğu bildirilmiştir. Bu problemin üstesinden gelmek için, aksiller sürgünlerin üretimini arttırdığı gösterilen çift fazlı bir sistemde embriyonik ve genç materyalden nodal segmentler kültürlenmeye çalışılmış ve kültür ortamında

bakteriyel kontaminasyonu önlemek için antibiyotik karışımları eklenmiştir. Bu araştırma ceviz (*Juglans regia* L.) için mikroçoğaltım tekniklerini optimize etmek amacıyla yürütülmüştür (Revilla et al., 1989).

Fidancı 2005 yılında gerçekleştirdiği araştırmasında, Şebin ve KR-2 ceviz çeşitlerini *in vitro*'da kültür oluşturma, çoğaltma (kardeşlenme), köklendirme ve alıştırma safhalarını kapsayan çalışmalar yapmıştır. Üç farklı eksplant kaynağından alınan materyal ile üç farklı eksplant tipi kullanılarak (meristem, sürgün ucu ve üzerinde bir göz bulunan nodal segment) üç farklı ortamda (MS, WPM, DKW) kültürler oluşturulmuştur. Cevizin mikro üretiminde kültür oluşturma safhasında karşılaşılan en önemli problemin bulaşma ve kararına olduğu belirtilmiştir (Fidancı, 2005).

Caboni ve Damiano'nun 2006 yılındaki çalışmalarında, yıllarca süren araştırmalar sonucunda cevizin *in vitro* köklenmesine yönelik Roma'daki "Istituto Sperimentale per la Frutticoltura" Departmanı tarafından elde edilen sonuçlara genel bir bakış sunulmuştur. Kültür bazal ortamı ve makro tuz konsantrasyonu, karanlık muamelesinin uzunluğu, oksinin tipi ve dozu, 10 günlük köklenme indüksiyonundan sonra hormonsuz bir ortama aktarım, köklenme ortamında agar bulunmaması, mikrosürgünlerin bazal kısmının lokalize *Agrobacterium rhizogenes* ile enfeksiyonu ve yabancı tipler değerlendirilen faktörler olarak ele alınmışlardır. İyi bir köklenme cevabı elde etmek için kritik faktörlerin: 10µM IBA ve 10-12 günlük bir karanlık muamelesi (indüksiyon fazı) ile desteklenmiş ½ kuvvetli makro tuz içeren yarı katı bir DKW ortamı olduğu bildirilmiştir. Mikro sürgünlerin, indüksiyon fazından sonra hormonsuz bir ortama aktarılmasının da önemli olduğu belirtilmiştir (Caboni ve Damiano, 2006).

Kara ceviz sürgün kültürlerinin büyümesi, besin formülasyonunda (MS, DKW, WPM ve 1/2X DKW), sitokinin tipinde (ZEA, BA ve TDZ) ve sitokinin konsantrasyonunda farklılık gösteren ortamlarda karşılaştırılmıştır. WPM ve ½ X DKW ortamlarında, yüksek tuzlu ortamdaki (DKW ve MS) %10-40 frekanslara kıyasla %60-100 frekanslarında hiperhidriklik gözlenmiştir. Üç sitokininin tamamı nodal kesimlerden sürgün rejenerasyonunu kolaylaştırmıştır, ancak sekiz haftalık iki kültür döneminden sonra hatlarda en hızlı uzamaların (ortalama 70-80 mm

sürgünler) sadece BA (5–12.5  $\mu\text{M}$ ) ve ZEA (5–25  $\mu\text{M}$ ) kombinasyonlarında gözlemlendiği bildirilmiştir, ZEA (Zeatin)'nin, iki kültür dönemi boyunca en az 35 mm ortalama sürgün uzunluğuna sahip altı sürgün hattının hepsinde etkili olduğu, ancak sürgün hatlarının ikisi, ortalama <15 mm sürgün boyuyla BA'ya yanıt vermediği bildirilmiştir. Buna karşılık, sürgün ucu eksplantları kültür çoğaltması için kullanıldığında, ZEA'nın, yalnızca %30-40'luk çoğalma frekansları ile en az etkili sitokinin olduğu belirtilmiştir. Çoğaltım oranlarının TDZ için (0,05-0,1  $\mu\text{M}$ ) iki kat daha büyük olduğu (%75–87), fakat yeniden üretilen sürgünlerin çoğu şişkin veya birleşik morfolojide oldukları belirtilmiştir. BA (12.5–25  $\mu\text{M}$ ) kullanılarak yüksek çoğaltım oranlarının (%61-88) da mümkün olduğu, ancak aksiller sürgünlerin iyi uzamadığı, ortalama 4-5 hafta sonra ortalama 5-10 mm uzunluğuna ulaştığı gösterilmiştir. Yüksek frekanslı (>%50) aksiller çoğaltım için gerekli sitokinin tipleri ve konsantrasyonları, sürgünlerin morfolojisi ve büyüme potansiyeli üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğundan, nodal çeliklerin kullanımına dayalı çoğaltım stratejileri önerilmektedir (Bosela ve Michler, 2008).

Vahdati ve ark., (2009) doku kültürünün başarısının, kültür ortamının kimyasal bileşimine bağlı olduğunu ve cevizin mikroçoğaltımının uygun bir kültür ortamının olmayışı ile kısmen sınırlandırıldığını ifade etmişlerdir. Ceviz tohumlarında bulunanlara benzer oranlarda bulunan minerallerin sürgün mikroçoğaltımı için optimum bir ortam sağlayabileceği düşünülmüştür. Beş ceviz çeşidinin 'Serr', 'Pedro', 'Lara', 'Hartley' ve 'Ron de Montignac' tohumlarının mineral bileşimi İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES) ile analiz edilmiştir. Buna ek olarak, Cu ve myo-inositolün sürgün uzunluğu ve eksplantların köklenme oranı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Ceviz tohumlarındaki mineral konsantrasyonları, Driver ve Kuniyuki Ceviz (DKW) ortamından 2 ile 26 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Tohumlarda belirlenen minimum mineral konsantrasyonuna dayanarak,  $\times 1,5$  ve  $\times 2$  DKW makro ve mikro besin maddelerini içeren iki yeni ortam formüle edilmiştir.  $\times 2$  DKW ve  $\times 1,5$  DKW' de kültüre alınan eksplantların yeşil renkli yapraklara sahip sürgünler oluşturduğu, ancak DKW besin ortamında kültüre alınanlara benzer şekilde kallus ürettikleri rapor edilmiştir.  $\times 1,5$  DKW ortamında daha iyi bir büyüme gözlemlendiğini belirten araştırmacılar, kullandıkları tüm çeşitlerde çoğalma oranlarını farklı bulmuşlardır, maksimum sürgün uzunluğu ve lateral tomurcukların sayısının  $\times 1,5$  DKW' de

“Vina” çeşidinde sağlandığını belirtmişlerdir. Daha yüksek Cu ve myo-inositol konsantrasyonları ile sürgün başına yan tomurcukların sayısının ve sürgün uzunluğunun arttırıldığı gösterilmiştir. ‘Sundland’, ‘Hartley’ ve ‘Vina’ *in vitro* köklenme yüzdeleri DKW ortamında sırasıyla %50, 31 ve 16 olarak tespit edilmiştir, ancak  $\times 2$  DKW ve  $\times 1,5$  DKW ortamlarında (%5-17) düşüş gösterdiği rapor edilmiştir. Sürgünler 10x Cu ve besin ortamında 2x konsantrasyonlarda myo-inositol içeren ortamlara yerleştirildiklerinde daha iyi köklenmelerin (%70'e kadar) elde edildiği belirtilmiştir. Araştırmacılar, sonuç olarak bazı ceviz çeşitlerinin DKW besin ortamından daha yüksek mineral konsantrasyonlu ortamlarda yetiştirilmesi gerektiğini ve ceviz eksplantlarının büyüme oranının ve köklenme oranının arttırılmasında daha yüksek Cu ve myo-inositol seviyelerinin etkili olabileceğini de belirtmişlerdir (Vahdati et al., 2009).

Kepenek ve Kolağası, 2016 yılındaki çalışmalarında ceviz (*Juglans regia* L.) için aksiller tomurcuklardan sürgün çoğaltımına yönelik bir rejenerasyon protokolü oluşturmayı amaçlamışlardır. NGE (Sanchez) ortamında çoğaltım amaçlı rejenerasyonu optimize etmek için TDZ (0.0, 1.0, 2.5, 5.0 mg / L), IBA (0.0, 1.0, 2.5, 5.0 mg/L) veya IBA'nın TDZ ile birlikte farklı konsantrasyonlarını incelemişlerdir. Çoğaltım oranının, TDZ ile birlikte TDZ veya IBA konsantrasyonunun artmasıyla arttığı bildirilmiştir. Dördüncü altkültürde en yüksek ortalama çoğaltım katsayısının, 2.5 mg/L TDZ + 2.5 mg/L IBA ile eksplant başına 5.33 adet sürgüne ulaştığı rapor edilmiştir. 5 mg/L IBA ile desteklenen sürgünlerde köklü sürgün sayısının (%62,71), 2.5 mg/L IBA ile desteklenmiş sürgünlerden (%45.66) daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Sürgünlerin ortalama sağ kalım oranı, 2.5 mg/L TDZ + 2.5 mg/L IBA'da %35.27'ye ulaştığı rapor edilmiştir. Ceviz *in vitro* mikroçoğaltımın mümkün olduğu ve en iyi büyüme yüzdesinin 5.0 mg/L TDZ ve 2.5 mg/L IBA ile 2.5 mg/L TDZ'de elde edildiği gösterilmiştir (Kepenek ve Kolağası, 2016)

Lone ve ark., 2017 yılında ceviz germplazmasında mevcut genetik değişkenliği belgelemek, üstün niteliklere ve kalite özelliklerine sahip seçkin ceviz genotiplerini seçmek amacıyla, farklı büyüme düzenleyici kombinasyonlarının ceviz (*J. regia* L.) *in vitro* kallus kültürü üzerine olan etkilerini MS besin ortamı kullanarak incelemişlerdir. Araştırma kapsamında veriler, Keşmir vadisinin farklı

bölgelerinde yetişen 152 ceviz ağacından kaydedilmiştir. Çalışma aynı zamanda, üstün ceviz seçimlerinin sürgün morfogenezinde farklı bitki büyüme düzenleyicilerine farklı yanıtların oluştuğunu göstermiştir. Odunsu türlerde otsu bitkilere göre *in vitro* klonlamanın çok daha zor olduğu belirtilmiştir. Eksplantların olgun odunsu türlerde *in vitro* manipülasyona zayıf cevabı, genellikle kararma ve eksplant nekrozu ile ilişkilendirilmiştir. 0,3 mg/L Benzilamino pürin ve 0.1 mg/L indol-3-bütirik asit ilave edilmiş Murashige ve Skoog'un bazal ortamı, başlangıç kültürlerinin oluşmasında, minimum ortam kararmasında (%80.44), minimum eksplant kararması (% 78.22) ile en iyi yanıt verdiği rapor edilmiştir. Sağ kalım (%23,45) ve kültürlerin büyümesi (%21,77), BAP (0,3 mg/L) ve IBA (0,1 mg/L) ile desteklenmiş MS ortamında da maksimum olduğu gösterilmiştir (Lone et al., 2017).

Tuan ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmalarında; *Juglans regia*'nin yağ, protein ve vitamin bakımından zengin en önemli kabuklu yemiş bitkilerinden birisi olduğunu ve *J. regia*'nin çoğaltımının genotipe çok sıkı bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Yavaş *in vitro* büyümenin düşük çoğaltım oranlarına neden olduğunu ve geleneksel köklendirme yöntemleri kullanıldığında zorluklarla karşılaşıldığını aktarmışlardır. Çalışmalarında olgun cevizlerden ayrılan embriyo eksenlerini sürgün kültürlerinin oluşturulmasında birincil eksplant olarak kullanmışlardır. Ceviz sürgün kültürlerinin gelişimi, besin formülasyonundaki (Rugini zeytin ortamı ve DKW ortamı), 6-benziladenin (BA) (2.2-8.8  $\mu$ M) ve indol-3-butirik asit (IBA) (4-20  $\mu$ M) konsantrasyonlarında farklılığa sahip katı ve sıvı ortamlarla karşılaştırılmıştır. 21 günlük kültür geçişi sırasında Rugini besin ortamı, DKW besin ortamından çok daha fazla yaş ağırlık ve aksiller sürgün sayısı verdiğini rapor etmişlerdir. *J. regia* eksplantları için en iyi BA konsantrasyonu 2.2  $\mu$ M BA olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar ayrıca katı ortamın (7 g/L agar) sürgün çoğaltımı için sıvı ortamdaki daha iyi olduğunu göstermiştir. Mikrosürgünlerin köklenmesi için indüksiyon ortamındaki optimal IBA konsantrasyonunun, kök ekspresyon ortamına transfer edilmeden önce 5 gün boyunca karanlıkta uygulanan 12  $\mu$ M IBA olduğu. 21 gün sonra mikrosürgünlerin köklenmesinde iki kök ekspresyon ortamı ( $\frac{1}{4}$  DKW + Vermikülit ve  $\frac{1}{4}$  MS + Vermikülit) arasında anlamlı bir fark olmadığı rapor edilmiştir. Köklendirilmiş bitkiciklerin kuruma eğilimi ve serada yüksek nem kaynaklı hastalıkların ortaya çıkması sebebiyle mikrosürgünlerin

aklimatizasyonunun zor olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, *J. regia* bitkiciklerinin %80'inin serada başarıyla köklendirildiği bildirilmiştir (Tuan et al., 2017).

Kara ceviz (*Juglans nigra* L.) uzun zamandır kerestesiyle, ticari ekime ve pazarlanabilir özellikleri geliştirmek için önemli çoğaltma çabalarına yol açmıştır. Ancak vejetatif ve *in vitro* kara ceviz çoğaltma teknikleri değişken ve oldukça genotipe bağımlıdır. Steven ve Pijut, 2018 yılındaki çalışmalarında, bitki büyüme düzenleyici tipini ve konsantrasyonunu optimize etmenin, başarılı bir mikroçoğaltım protokolü geliştirmek için olmazsa olmaz olduğunu bildirmişlerdir. Bir sıvı ortamın yeni kullanımı ile birlikte meta-topolin (MT) eklenmesinin, hızlı bir sürgün çoğaltım sisteminin geliştirilmesine yol açtığını rapor etmişlerdir. Bu araştırmanın amacı, üstün siyah ceviz genotipleri için tekrarlanabilir ve güvenilir bir mikroçoğaltım protokolü geliştirmek üzerinedir. Araştırmacılar, 8.9  $\mu\text{M}$  benziladenin, 0.005  $\mu\text{M}$  indol-3-butirik asit (IBA), 200 mg/L kazein hidrolizat, 50 mg/L adenin hemisülfat, 2 mL/L PPM<sup>TM</sup> ve 4.1  $\mu\text{M}$  MT ile takviye edilmiş yarı katı DKW ortamı üzerinde kültürlenmiş nodal eksplantlardan *in vitro* sürgün kültürleri oluşturmuşlardır. Uzun dönem sağ kalım ve mikrosürgünlerin çoğalması, *in vitro* yetiştirilen sürgünlerin nodal kısımları, 3L' lik bir polikarbonat Fernbach tarzı şişelerde sıvı başlatıcı ortamda, 25 ° C'de 16 saatlik bir fotoperiyot altında (100 rpm) döner bir çalkalayıcı üzerinde kültürlendiğinde elde edilmiştir. Büyütülmüş mikrosürgünler (5-7 cm uzunluğunda), %0.11 (ağırlık / hacim) Phytigel<sup>TM</sup> ve 50  $\mu\text{M}$  IBA ile takviye edilmiş kaba vermikülit (2: 1, hacim / hacim) içeren yarı kuvvetli DKW ortamından oluşan bir bulamaç-benzeri ortamda 5 hafta süreyle köklendirilmiştir. Köklenmiş sürgünler, kültür odası çevre koşullarına aklimatize edilebildikleri halde, seraya aktarılan bitkiciklerin hayatta kalamadığı rapor edilmiştir (Stevens ve Pijut, 2018).

Ceviz türlerinin mikroçoğaltımında karşılaşılan en önemli sınırlamalardan biri de düşük köklendirme oranıdır. Bu sorunun üstesinden gelmek amacıyla araştırmacılar çeşitli yöntemler denemişlerdir. Scaltsoyiannes ve ark. (1997), gelişen sürgünlerin köklendirilmesinin DKW besin ortamında 40 g/L sükröz ve 4,4  $\mu\text{M}$  IBA kullanarak 6 gün karanlıkta bekletmeyle gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Kamali ve ark. (2001), GF-677 anaçlarının köklendirilmesi çalışmalarında, 0,3 mg/L NAA ile 1,6 mg/L thiamine içeren besin ortamından kökler elde etmişlerdir. 7 günlük karanlık uygulamasının köklenme için olumlu sonuç verdiği de belirtilmiştir.

Tetsumura ve ark. (2002), ceviz bitkisinden elde edilen mikro sürgünleri köklendirme için, 25 µM IBA içeren DKW ortamında ve vermikülit + gelrite karışımında 5 gün karanlıkta bekletilmesiyle elde edilebileceğini yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir.

Fidancı (2005) yaptığı çalışmada, Şebin ve KR-2 ceviz çeşitlerinde üç farklı eksplant ile mikroçoğaltım çalışması gerçekleştirmiştir. Elde ettiği sürgünlerde en yüksek köklenme, kök sayısı, kök uzunluğu ve kök kalınlığının her iki çeşitte de 4 mg/L IBA içeren ortamdan elde edildiği belirlenmiştir.

Dong ve ark. (2007), ceviz bitkisinden çoğaltılan sürgünlerin köklendirilmesi için ¼ oranında DKW içeren IBA ilave edilmemiş vermikülit ortamının kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir. Köklenme oranının ise %60.5 düzeyinde olduğu bildirilmiştir.

Amiri ve Gharati (2011) cevizde yaptıkları çalışmada, besin ortamında bulunan makro elementlerin köklenme üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada 1, 1/2, 1/3, 1/5 oranlarında DKW besin ortamı kullanılmıştır. Bu çalışmada kök çıkışı ve gelişiminin, en düşük makro element içeren ortamda gerçekleştiği bildirilmiştir.

Moreno ve ark. (2015) melez ceviz çeşitlerinde yaptıkları çalışmada FeEDTA ile FeEDDHA arasındaki farkların sukrozun köklenme oranına ve kök uzunluğuna etkilerini araştırmışlardır. FeEDDHA ve 40-60 mg/L sukroz kullanımının köklenmeyi arttıracığı belirtilmiştir.

Kepenek ve Kolağası (2016), elde edilen mikro sürgünlerde en iyi köklenmenin 5 mg/L IBA içeren besin ortamlarından elde edildiğini bildirmişlerdir.

Zarghami ve Salari (2015) yaptıkları köklendirme çalışmasında, Chandler ceviz çeşidi için 3 mg/L IBA içeren ortamın en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir.

Tuan ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, farklı melez ceviz çeşitlerinde en iyi kök gelişiminin 12 µM IBA içeren DKW ortamına eklenen vermikülit + gelrite kültür koşullarında gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Yıldırım, (2018) gerçekleştirdikleri çalışmada, bazı ceviz çeşitlerine (Vlach, Chandler, Yalova-1) ait koltukaltı tomurcuklarından *in vitro* olarak elde ettiği sürgünlerle gerçekleştirdiği rejenerasyon çalışmasında her üç çeşitte de gelişim gösteren sürgünleri köklendirme çalışmasında kullanmış, ancak sadece Yalova-1 çeşidinde köklenmeler görmüştür. Sürgünlerin köklendirilmesi için modifiye olarak hazırlanmış MS besin ortamına 4 mg/L IBA ilave edilerek köklendirmeler sağlanmıştır.

### **3. MATERYAL ve METOT**

#### **3.1. Materyal**

Tez materyali olarak ULU CEVİZ Tarım Ürünleri Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi tarafından Menemen/Yahşeller bölgesindeki sera ortamından temin edilen “Paradox” ceviz anacına ait nod eksplantları kullanılmıştır.

#### **3.2. Metot**

Çalışmamızda; eksplantlarımız farklı kültür tipleri olarak yarı katı, sıvı ve çift-fazlı sistemlerde kültüre alınmışlardır.

##### **3.2.1 Nod eksplantlarının kültüre alınacağı yarı katı besin ortamlarının hazırlanması**

Çalışmada, farklı mikroçoğaltım aşamalarında kullanılmak üzere DKW (Driver and Kuniyuki, 1894), Rugini (Rugini, 1984) ve MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamları tam güçte, yarı güçte, modifiye şekilde ve farklı dozlarda bitki büyüme düzenleyicileri içerecek şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2).

Yarı katı besin ortamının hazırlığı için, ilk olarak önceden hazırlanan stok çözeltilerden 1 litre besin ortamı için 5 mL pipetle çekilerek besin ortamının yapılacağı behere aktarılmıştır. Daha sonra besin ortamına eklenmesi gereken kimyasallar ve karbon kaynağı (30 g/L sükröz) tartılarak ilave edilmiştir. Son olarak hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Katı bileşikler iyice çözüldükten sonra seyreltilmiş 1N NaOH (sodyum hidroksit) veya 1N HCl (hidrojen klorür) kullanılarak pH 5.8'e ayarlanmıştır. Besin ortamı, 3 g/L gelrite ilave edildikten sonra besin ortamı manyetik karıştırıcılı ısıtıcıda bulanıklığı gidene kadar kaynatılmış ve sıcak olarak tüplere her biri 10 mL içerecek şekilde paylaştırılmıştır. Ağızları kapakla kapatılan kültür tüpleri, steril edilmek amacıyla 121°C'de, 105

kPa basınçta 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan steril besin ortamları kullanılabileceği kadar kapakları açılmadan kuru ve serin bir ortamda saklanmıştır. Yarı güçteki besin ortamları ( $\frac{1}{2}$  DKW ve  $\frac{1}{2}$  Rugini) için, 1L besin ortamı hazırlandıktan sonra hacim 2L'ye saf su ile tamamlanmıştır. Jelleştirici ajan miktarı ise her 1L'lik ortam için aynı bırakılmıştır (Gelrite 3 g/L).

**Çizelge 3.1.** Çalışma kapsamında kullanılan DKW ve Rugini besin ortamları içerikleri

<b>Bileşimler</b>	<b>DKW (Driver and Kuniyiki, 1984) (mg/L)</b>	<b>Modifiye DKW (MDKW) (mg/L)</b>	<b>Rugini (Rugini, 1984) (mg/L)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.416,00	708	412,00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4,80	4.8	12,40
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	147,00	74.5	440,00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.960,00	984	600,00
KNO <sub>3</sub>	-		1.100,00
KCl	-		500,00
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25	0.25	0,25
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	740	335	1.500,00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	33,50	33.5	16,90
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	259,00	132.5	340,00
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.560,00	779.5	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39	0.39	0,25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	17,00	17	14,30
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	33,40	16.9	27,80
Na <sub>2</sub> EDTA	44,70	22.7	37,30
Myo-inositol	1.000,00	100	100,00
Tiamin-HCL	2,0	2.0	0,50
Nikotinik asit	2,0	1.0	5,0
Pridoksin- HCl	-	-	0,50

Glisin	2,0	2,0	2,0
Biyotin	-	-	0,05
Folik asit	-	-	0,5
Glutamin	-	-	2.190,00
Sükroz	30.000	30.000-40.000	30.000

**Çizelge 3.2.** Çalışma kapsamında kullanılan MS ve modifiye MS besin ortamlarının içerikleri

<b>Bileşikler</b>	<b>MS Besin Ortamı (Murashige &amp; Skoog, 1962) (mg/L)</b>	<b>Modifiye MS Besin Ortamı (mg/L)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	720
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9	16,9
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	17
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	265
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	440
KI	0,83	0,83
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
Titriplex <sup>®</sup> (Na <sub>2</sub> EDTA)	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
Nikotinic Asit	0,5	0,5
Pridoksin-HCl	0,5	0,5
Tiamin-HCl	0,1	0,1
Glisin	2	2
myo-inositol	100	100
KNO <sub>3</sub>	1900	1900
Sukroz	30000	30000-40000

### 3.2.2. Ön Sterilizasyon Aşaması

Sera ortamından alınan Paradox ceviz anaçlarının taze sürgünlerinden tepe kısımlarından bahar ve yaz mevsiminde kesildikten hemen sonra nemli bir ortamda laboratuvara getirilmiştir. Yapraklarından ayrılan eksplantlar, her parçada bir veya iki nod olacak şekilde kesilmiştir. Kesilen eksplantlar, 10 dk süreyle deterjanlı su ile çalkalanmıştır. Daha sonra akar su altında 10 dk bekletilmiştir.

### 3.2.2 Hazırlık aşaması

Kabin içine alınacak olan pens, peçete, fayans, destek gibi materyaller alüminyum folyo ile sarılıp 170°C' de 1 saat boyunca etüvde steril edilmiştir. Durulama amacıyla kullanılan steril sular, 220 cc'lik kavanozlara 200 mL distile su doldurularak 121 °C'de 1 atm basınç altında 15 dk süreyle otoklavlanarak hazırlanmıştır.

Ticari olarak temin edilen %96' lık etil alkolden 70 birim etil alkolün üzerine 26 birim saf su eklenerek %70' lik etil alkol hazırlanmıştır. Laminar hava akışlı kabinin havalandırması açılarak yüzeyi etil alkol sıkılarak silinmiştir. Sterilizasyon için kullanılacak olan tüm bitkisel materyal ve ekipmanlar, üzerlerine %70'lik etil alkol çözeltisi sıkıldıktan sonra kabin içine alınmıştır. Kabinde sterilizasyonu sağlamak amacıyla, UV ışığı 15 dk süreyle açık bırakılmıştır.

### 3.2.3 Sterilizasyon aşaması

Kabinde UV sterilizasyon işlemi bittikten sonra kabinin kapağı açılmış ve kabin çalışmasına geçilmiştir. Kabinin içindeki ekipmanlar en rahat çalışılacak şekilde düzenlenmiştir. %70'lik etil alkol, %0,1'lik civa klorür (HgCl<sub>2</sub>) ve 3 adet steril su içeren cam kavanozlar sırayla dizilmiştir. Alev ocağı yakılmış ve alüminyum folyoyla sarılı ekipmanlar açılmıştır. Öncesinde yüzey sterilizasyonu tamamlanan eksplantlar için sterilizasyon denemeleri (Çizelge 3.3) kurulmuştur.

Birinci sterilizasyon yöntemi (ST1) için; nod eksplantları ilk olarak %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dk çalkalanmış, etil alkolden çıkarıldıktan sonra peçete üzerinde kurutulmuştur. Sonra %0,1'lik HgCl<sub>2</sub> çözeltisinde 5 dk bekletildikten sonra 3 kere steril su içeren cam kavanozlarda 1'er dk bekletilmiştir.

İkinci sterilizasyon yöntemi (ST2) için; nod eksplantları ilk olarak %70'lik etil alkol çözeltisinde 5 dk çalkalanmış, etil alkolden çıkarıldıktan sonra peçete üzerinde kurutulmuştur. Sonra Tween 20 ilave edilmiş %0,2'lik HgCl<sub>2</sub> çözeltisinde 5 dk bekletildikten sonra 3 kere steril su içeren cam kavanozlarda 1'er dk bekletilmiştir.

Üçüncü sterilizasyon yöntemi (ST3) için; nod eksplantları ilk olarak %70'lik etil alkol çözeltisinde 5 dk çalkalanmış, etil alkolden çıkarıldıktan sonra peçete üzerinde kurutulmuştur. Sonra hazırlanan %20'lik çamaşır suyu çözeltisinde 3 dk bekletildikten sonra 3 kere steril su içeren cam kavanozlarda 1'er dk bekletilmiştir.

Dördüncü sterilizasyon yöntemi (ST4) için; nod eksplantları ilk olarak %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dk çalkalanmış, etil alkolden çıkarıldıktan sonra peçete üzerinde kurutulmuştur. Sonra %0,1'lik HgCl<sub>2</sub> çözeltisinde 5 dk bekletildikten sonra %12'lik çamaşır suyu çözeltisinde 5 dk çalkalanmıştır. 3 kere steril su içeren cam kavanozlarda 1'er dk bekletilmiştir.

Bu denemelerin her birinden sonra eksplantlar cam tüplerdeki besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Besin ortamı ve sterilizasyon yöntemlerinin oluşturduğu deneme deseni Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Kültürler 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta,  $24 \pm 2$  °C'de ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir. 15 günde bir gözlem yapılmış ve karar ma yüzdesi (%), kontaminasyon yüzdesi (%), hiperhidrisite yüzdesi (%), nekroz oluşum yüzdesi (%), sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (%), sürgün uzunluğu (cm), nod sayısı (adet) ve çoğaltım katsayısı ve köklenme yüzdesi (%) parametreleri belirlenmiştir.

**Çizelge 3.3.** Sterilizasyon yöntemleri

<b>Sterilizasyon Kodu</b>	<b>Sterilizasyon Yöntemi</b>
ST1	1 Dk. %70 Etil Alkol + 5 Dk. %0.1 Cıva Klorür
ST2	5 Dk. %70 Etil Alkol + 5 Dk. %0.2 Cıva Klorür (Tween 20 İlave Edilmiş)
ST3	5 Dk. %70 Etil Alkol + 3 Dk. %20 Çamaşır Suyu
ST4	1 Dk. %70 Etil Alkol + 5 Dk. %0.1 Cıva Klorür + 5 Dk. %12 Çamaşır Suyu

**Çizelge 3.4.** Sterilizasyon yöntemi ve kullanılan ortam kodları

<b>Sterilizasyon Kodu</b>	<b>Ortam Kodu</b>
ST1	DKW
ST2	DKW
ST3	D1B
ST4	DKW

### 3.2.5. Sürgün İndüksiyon Denemeleri

Sterilizasyon denemelerinde istatistiklerle belirlenmiş en başarılı sterilizasyon yönteminin ST2 olduğuna karar verilmiştir. ST2 yöntemiyle sterilizasyonu gerçekleştirilen nod eksplantları kültüre alınmaya devam edilmiştir. Sürgün indüklenme denemeleri için nod eksplantları, içerikleri Çizelge 3.5’da verilen DKW ve Rugini temelli besin ortamları tam ve yarı güçte ve ayrıca bu ortamların modifiye ve/veya bitki büyüme düzenleyicisi ilave edilmiş hallerini içeren cam tüplerde her bir tekkerrürde 10 eksplant olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.5. Besin ortamı içerikleri

Ortam kodu	Bazal ortam	Hormon içeriği (mg/L)	Diğer kimyasal bileşikler (mg/L)
<b>DKW</b>	DKW	-----	-----
<b>D1B</b>	DKW	1 BAP	-----
<b>D2B</b>	DKW	2 BAP	-----
<b>D4B</b>	DKW	4 BAP	-----
<b>SP</b>	DKW	-----	200 kazein hidrolizat + 50 adenine hemisülfat
<b>SP1</b>	DKW	1 BAP + 0,001 IBA	200 kazein hidrolizat + 50 adenine hemisülfat
<b>SP2</b>	DKW	2 BAP + 0,001 IBA	200 kazein hidrolizat + 50 adenine hemisülfat
<b>SP4</b>	DKW	4 BAP + 0,001 IBA	200 kazein hidrolizat + 50 adenine hemisülfat
<b>Ru</b>	Rugini	-----	-----
<b>Ru1</b>	Rugini	1 BAP	-----
<b>Ru2</b>	Rugini	2 BAP	-----
<b>MRu0,5</b>	Modifiye Rugini	0,001 IBA	200 kazein hidrolizat + 50 adenine hemisülfat
<b>MRu1</b>	Modifiye Rugini	0,001 IBA	200 kazein hidrolizat + 50 adenine hemisülfat

### 3.3. Nod Eksplantlarının Sıvı Besin Ortam Denemeleri

Yarı katı kültürlerde istatistiki olarak sürgün çoğaltımında en iyi sonucu veren SP2 ortamı, katılaştırıcı ajan kullanılmadan sıvı şekilde hazırlanarak 100 mL ve 250 mL' lik erlenlerde denemeler yapılmıştır. Bu denemelerde 2020 yılının Eylül-Ekim aylarında alınan eksplantlar kullanılmıştır. Tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak 100 mL' lik erlene 15 mL sıvı ortam ve 3 nod eksplantı, 250 mL' lik erlene 25 mL sıvı ortam ve 4 nod eksplantı yerleştirilmiştir. Kültürler 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 24±2 °C' de ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir

### **3.4. Nod Eksplantlarının Çift-Fazlı Besin Ortamında Mikroçoğaltım Denemeleri**

Yarı katı kültürlerde istatistik olarak en iyi sürgün indüklenme sonucunu veren SP2 kodlu besin ortamı çift fazlı besin ortamının yarı katı kısmı, sürgün uzamasını teşvik için belirlenen Ru2 kodlu besin ortamı ise çift fazlı besin ortamının sıvı kısmı için kullanılmıştır. Bu denemelerde 2020 yılının Eylül-Ekim aylarında alınan nod eksplantları kullanılmıştır. Cam tüplerde hazırlanan yarı katı SP2 ortamında kültüre alınan nodal eksplantların üzerine yarı katı ortamın yüzeyi kaplayacak kadar (1-2 mL) sıvı Ru2 besin ortamından eklenmiştir. Deneme; tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 eksplant olacak şekilde kurulmuştur. Kültürler 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyotta,  $24\pm 2$  °C’de ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

### **3.5 *In Vitro* Köklendirme Denemeleri**

Çoğaltılan sürgünler ile köklendirme denemeleri gerçekleştirilmiştir. Köklendirme denemeleri için kullanılan ortam ve içerikleri Çizelge 3.6’da belirtilmiştir. Köklendirme denemeleri 2 aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada kök indüksiyonunun sağlanması için farklı besin ortamlarına (Çizelge 3.6) aktarılan 2-3 cm boyundaki mikrosürgünler 7 günlük süreçte karanlık koşullar altında bekletilmiştir. Kök indüksiyonu sağlandıktan sonra ise 21 günlük süreçte farklı köklendirme ortamlarına (Çizelge 3.7) aktarılmıştır. Deneme; tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 eksplant olacak şekilde kurulmuştur. Kültür kapları 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta,  $24\pm 2$  °C’ de ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.6. Kök indüksiyonu denemelerinde kullanılan besin ortamı kompozisyonu

Besin ortamı kodu	Bazal besin ortamı	Bitki büyüme düzenleyicisi ve miktarı	Karbon kaynağı ve miktarı	Katılaştırıcı ajan ve miktarı
1I30	MMS	4 mg/L IBA	30 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite
1I40	MMS	4 mg/L IBA	40 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite
½I30	½ MMS	4 mg/L IBA	30 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite
½ 30	½ MMS	-	30 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite
½ I40	½ MMS	4 mg/L IBA	40 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite
MD304	MDKW	4 mg/L IBA	30 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite
MD404	MDKW	4 mg/L IBA	40 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite
MDFI	MDKW	4 mg/L IBA+119 mg/L FeEDDHA	30 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite

Çizelge 3.7. Kök gelişimi denemelerinde kullanılan besin ortamı kompozisyonu

Besin ortamı kodu	Bazal besin ortamı	Ortam kompozisyonunda var olan farklılık	Karbon kaynağı ve miktarı	Katılaştırıcı ajan ve miktarı
MDFe	MDKW	119 mg/L FeEDDHA	30 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite
¼ DFe	¼ DKW	119 mg/L FeEDDHA	30 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite
MDV	MDKW	1:1 vermikulit	30 g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite
¼ DV	¼ DKW	1:1 vermikulit	30g/L sükroz	2.4 g/L Gelrite

### 3.6 Verilerin değerlendirilmesi

Proje kapsamında yapılan *in vitro* uygulamalar tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Uygulamalardan elde edilen veriler, Minitab® 19 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Sterilizasyon Denemesinin Sonuçları

Yapılan sterilizasyon denemelerinin gözlem parametrelerine etkileri incelenmiş ve veriler kaydedilmiştir. Değerler yüzdeler olarak hesaplanmıştır. (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Kararmaya etkileri açısından ele alındıklarında, ST4 yöntemi kararma üzerinde %46.7 ile en başarısız bulunmuştur. ST1 metodunda kültüre alınan eksplantlarda kararma gözlenmemiştir. ST1 metodu kararma açısından diğer yöntemlerden daha başarılı olarak belirlenmiştir. Kararma problemi, nod eksplantlarından genellikle ilk bir hafta içinde ortaya çıkmıştır.

Kontaminasyona etkisine göre, en başarılı yöntem ST1 olarak belirlenmiştir. Kültüre alınan eksplantlarda görülen kontaminasyonlar bakteriyel veya maya kaynaklı olmuştur. Genellikle kültüre alınma süresinden 7 ila 15 gün sonra kontaminasyonlar gözlenmiştir (Şekil 4.2)

Hiperhidrisiteye etkisine göre, ST1 ve ST2 yöntemleri kullanıldıklarında hiç hiperhidrisite sorunuyla karşılaşılmamıştır ve başarılı yöntemler olarak kabul edilmişlerdir. En yüksek hiperhidrisite %33.3 ile ST3 metodunda kaydedilmiştir. Hiperhidrisitenin sürgünlerde ortaya çıkması ise eksplantların kültüre alınmasından 7. günden sonraki günlerde gerçekleşmiştir.

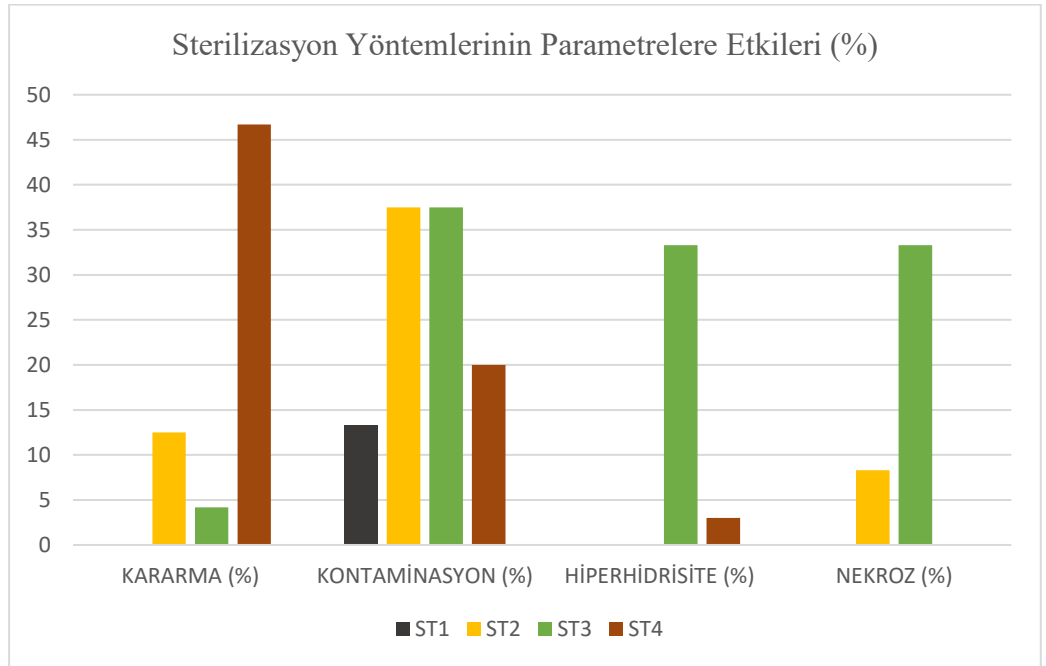
Nekroz etkisine göre, ST3 %33.3 nekroz oluşum yüzdesi ile en başarısız sterilizasyon metodu olarak belirlenmiştir, ST1 ve ST4 Sterilizasyon metodlarında nekroz gözlemlenmemiştir ve başarılı olarak değerlendirilmişlerdir. Nekrozun sürgünlerde ortaya çıkması ise eksplantların kültüre alınmasından 7. günden sonraki günlerde gerçekleşmiştir.

Bu dört gözlem parametresine göre bakıldığında ST1 daha iyi görünmektedir. Ancak çalışmanın ilerleyen aşamalarında kontaminasyon sebebiyle sterilizasyon aşamasında yüzey aktif madde ihtiyacının oluşması sebebiyle Tween20® içeren

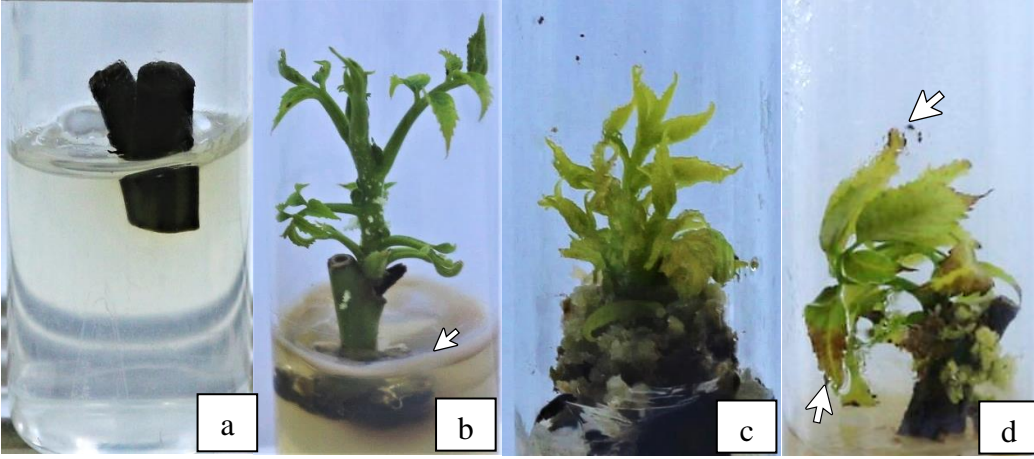
cıva klorür bazlı sterilizasyon metodu olan ST2 ile çalışmalara devam edilmiştir. Sterilizasyon denemesinden sonraki bütün denemelerde eksplantlar, ST2 yöntemiyle steril edilip kültüre alınmışlardır.

**Çizelge 4.1.** Farklı sterilizasyon metodlarının kararma, kontaminasyon, hiperhidrisite ve nekroz üzerine etkileri

Sterilizasyon Metodu	Kararma (%)	Kontaminasyon (%)	Hiperhidrisite (%)	Nekroz (%)
ST1	0	13,3	0	0
ST2	12,5	37,5	0	8,3
ST3	4,17	37,5	33,3	33,3
ST4	46,7	20	3	0



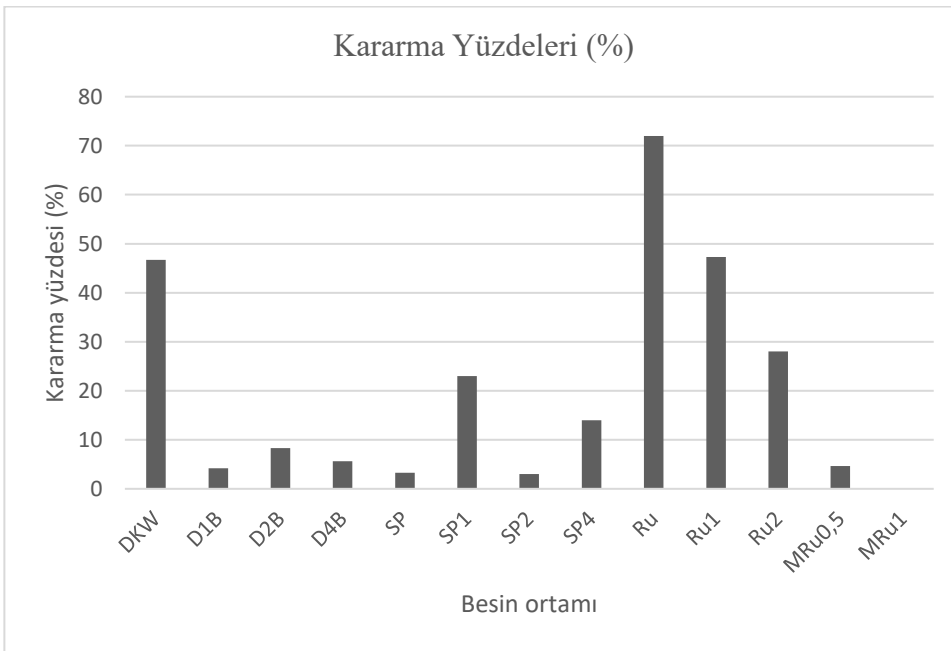
**Şekil 4.1.** Farklı sterilizasyon yöntemlerinin dört gözlem parametresine (kararma (%), kontaminasyon (%), hiperhidrisite (%), nekroz (%)) göre değerlendirilmesi



**Şekil 4.2.** Ceviz kültüründe karşılaşılan problemlerin örnekleri a) kararma b) kontaminasyon c) hiperhidrisite d) nekroz

#### 4.2 Besin ortamlarının Kararma Üzerine Etkisi

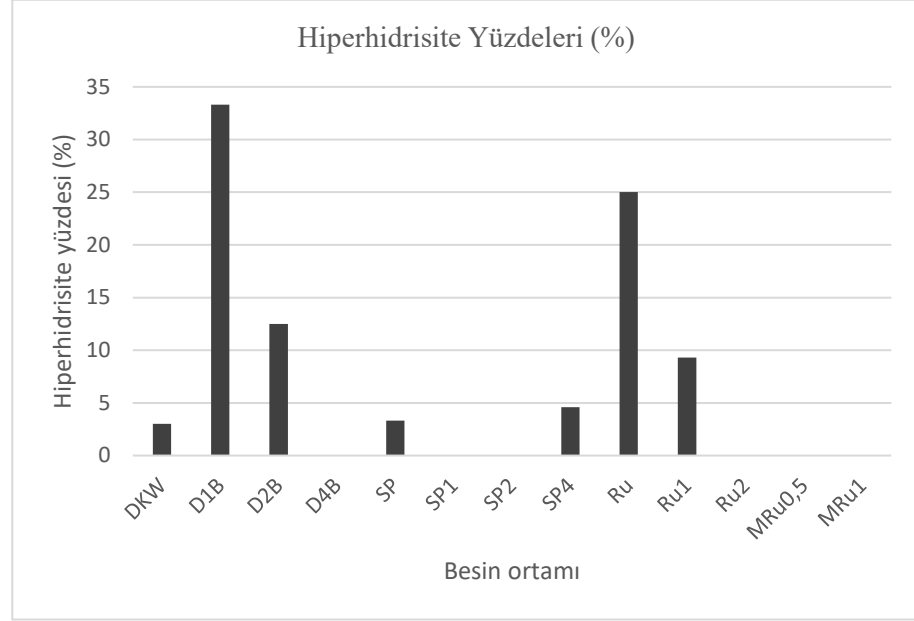
Cam tüplerde yaptığımız denemelerde farklı besin ortamlarının kararma üzerine etkisi (Şekil 4.3, Çizelge 4.2) gösterilmiştir. Kaydedilen veriler sonucunda en yüksek kararma yüzdesi (%72) Ru besin ortamında gözlemlenmiştir. MRu1 besin ortamında ise kararma gözlenmemiştir.



**Şekil 4.3.** Farklı besin ortamlarının kararma yüzdesine etkisi

### 4.3 Besin Ortamlarının Hiperhidrisite Üzerine Etkisi

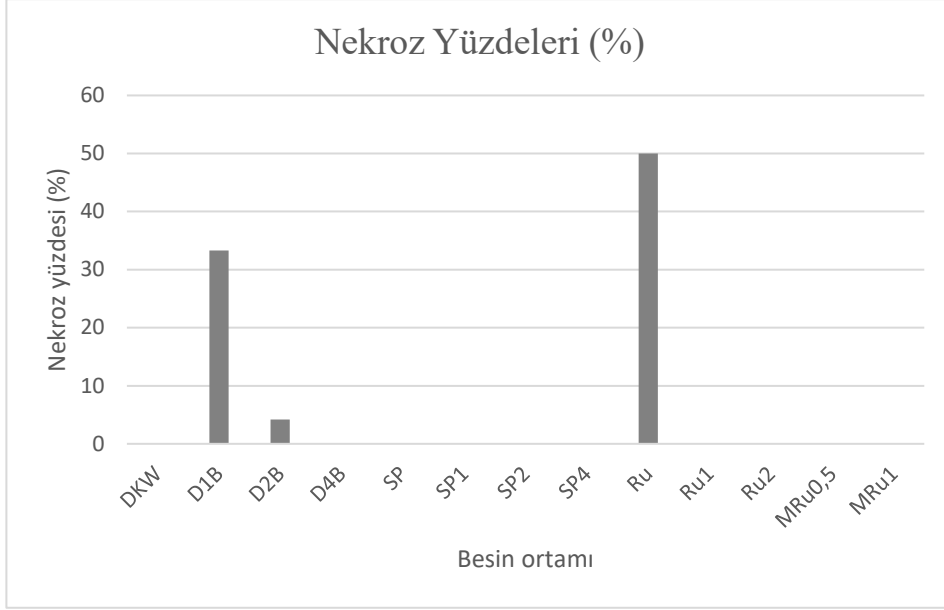
Cam tüplerde yaptığımız denemelerde farklı besin ortamlarının hiperhidrisite üzerine etkisi (Şekil 4.4, Çizelge 4.2) incelenmiştir. Kaydedilen veriler sonucunda en yüksek hiperhidrisite yüzdesi (%33,3) D1B besin ortamında gözlemlenmiştir. D4B, SP1, SP2, Ru2, MRu0,5 ve MRu1 besin ortamlarında ise hiperhidrisite saptanmamıştır.



Şekil 4.4. Farklı besin ortamlarının hiperhidrisite yüzdesine etkisi

### 4.4 Ortamların Nekroz Üzerine Etkisi

Cam tüplerde yaptığımız denemelerde farklı besin ortamlarının yaprak ve sürgün nekrozu üzerine etkisi (Şekil 4.5, Çizelge 4.2) incelenmiştir. Kaydedilen veriler sonucunda; istatistik olarak en yüksek nekroz yüzdesi (%50) Ru besin ortamında gözlemlenmiştir. Daha sonra sırasıyla %33,3 ile D1B ve %4,17 ile D2B ortamları takip etmiştir. DKW, D4B, SP, SP1, SP4, Ru1, Ru2, MRu0,5 ve MRu1 besin ortamlarında ise nekroz gözlemlenmemiştir.



**Şekil 4.5.** Farklı besin ortamlarının nekroz yüzdelerine etkisi

**Çizelge 4.2.** Farklı besin ortamlarının kararma, hiperhidrisite ve nekroz yüzdelerine etkisi

<b>Ortam kodu</b>	<b>Kararma yüzdesi (%)</b>	<b>Hiperhidrisite yüzdesi (%)</b>	<b>Nekroz Yüzdesi (%)</b>
<b>DKW</b>	46,7	3	0
<b>D1B</b>	4,17	33,3	33,3
<b>D2B</b>	8,3	12,5	4,17
<b>D4B</b>	5,6	0	0
<b>SP</b>	3,3	3,3	0
<b>SP1</b>	23	0	0
<b>SP2</b>	3	0	0
<b>SP4</b>	14	4,6	0
<b>Ru</b>	72	25	50
<b>Ru1</b>	47,3	9,3	0
<b>Ru2</b>	28	0	0
<b>MRu0,5</b>	4,67	0	0
<b>MRu1</b>	0	0	0

## 4.5 Yarı Katı Besin Ortamlarında Sürgün İndüklenme Denemeleri Sonuçları

### 4.5.1. Sürgün oluşturan eksplant sayısı ve yüzdesi

Sürgün indüklenme amacıyla nod eksplantları çeşitli ortamlarda ve cam tüplerde kültüre alınmışlardır. 13 farklı besin ortamında elde edilen sürgün sayıları ve sürgün oluşturma yüzdeleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda besin ortamının sürgün sayısı ve sürgün oluşturma yüzdesi üzerine etkisi önemli ( $p < 0.05$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5). En başarılı besin ortamı 1,05 adet/eksplant ve %100 sürgün oluşumu ile SP4 olmuştur. Bu parametreye göre en az başarılı besin ortamı ise 0,57 adet/eksplant ve %57 Sürgün oluşumu ile Ru besin ortamı olmuştur (Çizelge 4.3, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).

Çizelge 4.3. Eksplant başına elde edilen ortalama sürgün sayısı ve sürgün oluşturan eksplant yüzdesi

Ortam kodu	Eksplant başına elde edilen ortalama sürgün sayısı (Ortalama $\pm$ S.H.)	Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (Ortalama $\pm$ S.H.)
DKW	0,90 $\pm$ 0,07 ab	80,00 $\pm$ 17,3 abc
D1B	1,00 $\pm$ 0,07 ab	93,33 $\pm$ 5,77 ab
D2B	0,90 $\pm$ 0,17 ab	67,00 $\pm$ 6,93 abc
D4B	1,00 $\pm$ 0,14 ab	71,00 $\pm$ 6,93 abc
SP	0,71 $\pm$ 0,10 ab	63,30 $\pm$ 30,6 bc
SP1	0,80 $\pm$ 0,09 ab	81,00 $\pm$ 8,66 abc
SP2	0,95 $\pm$ 0,05 ab	96,67 $\pm$ 5,77 ab
SP4	1,05 $\pm$ 0,05 a	100,0 $\pm$ 0,00 a
Ru	0,57 $\pm$ 0,11 b	57,00 $\pm$ 14,0 c
Ru1	0,67 $\pm$ 0,13 ab	61,67 $\pm$ 8,08 bc
Ru2	0,76 $\pm$ 0,10 ab	76,00 $\pm$ 8,66 abc
MRu0,5	0,90 $\pm$ 0,07 ab	90,67 $\pm$ 8,08 abc
MRu1	1,00 $\pm$ 0,07 ab	90,67 $\pm$ 8,08 abc

**Çizelge 4.4.** Farklı besin ortamlarında kültüre alınan nodal eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün sayısının tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi

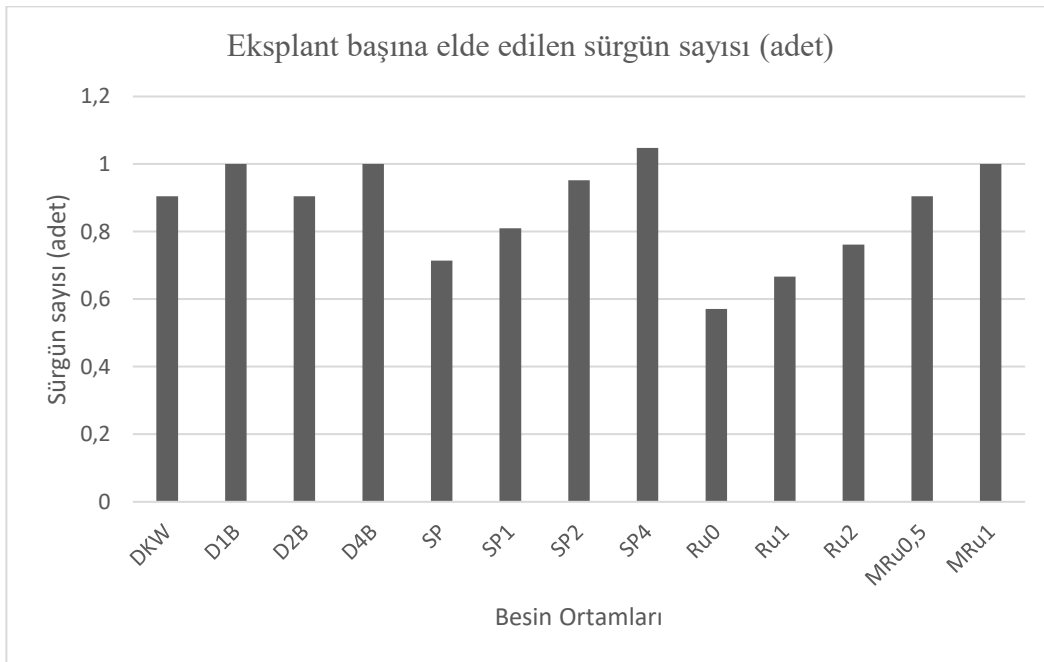
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Ortam	12	5,509	0,4591	2,27	0,009*
Hata	260	52,476	0,2018		
Genel	272	57,985			

\*:  $p < 0.05$  düzeyinde önemli, \*\*:  $p < 0.0.1$  düzeyinde önemli

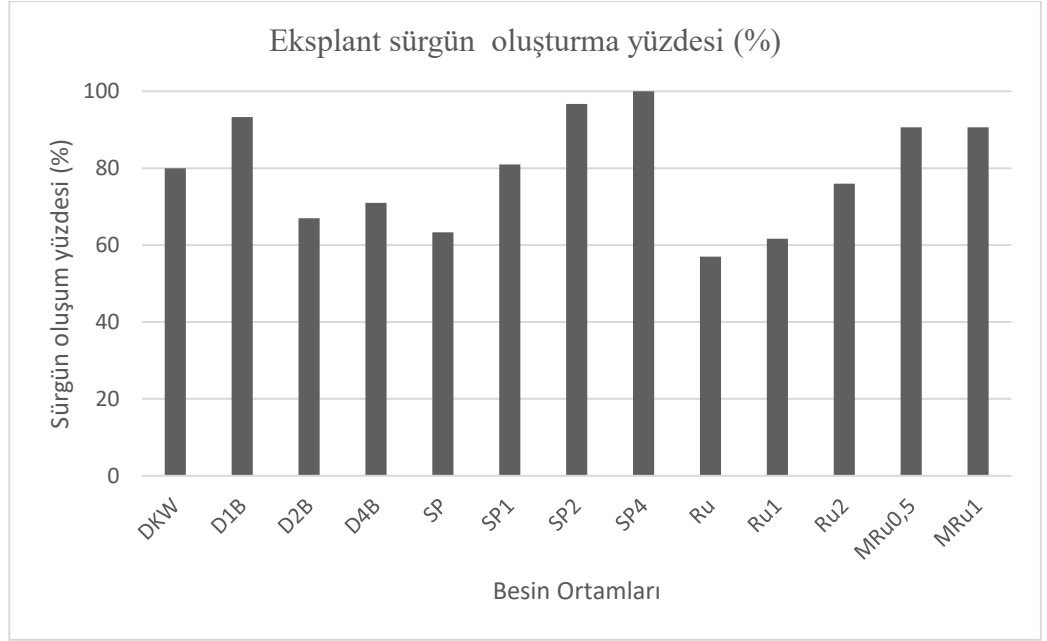
**Çizelge 4.5.** Farklı besin ortamlarında kültüre alınan nodal eksplantlarının sürgün oluşturma yüzdesinin tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Ortam	12	7448	7448	4,16	0,001*
Hata	26	3876	3876		
Genel	38	11324			

\*:  $p < 0.05$  düzeyinde önemli, \*\*:  $p < 0.0.1$  düzeyinde önemli



**Şekil 4.6.** Farklı besin ortamlarının sürgün sayısı üzerine etkileri



**Şekil 4.7.** Farklı besin ortamlarının sürgün oluşturma yüzdesi üzerine etkileri



**Şekil 4.8.** Her bir besin ortamından elde edilen sürgün örnekleri a) DKW b) D1B c) D4B ç) SP1 d) SP2 e) SP4 f) Ru g) Ru1 ğ) Ru2 h) mRu0,5 ı) mRu1

#### 4.5.2 Eksplant başına elde edilen ortalama nod sayısı (adet)

Yapılan varyans analizi sonucunda besin ortamının nod sayısı üzerine etkisi önemli ( $p<0.05$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.7). Bu parametreye göre en başarılı besin ortamı 7,95 adet/eksplant ile SP2 ortamı olmuştur (Şekil 4.9, Şekil 4.10). En düşük nod sayısı (1,57 adet/eksplant) Ru besin ortamında tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

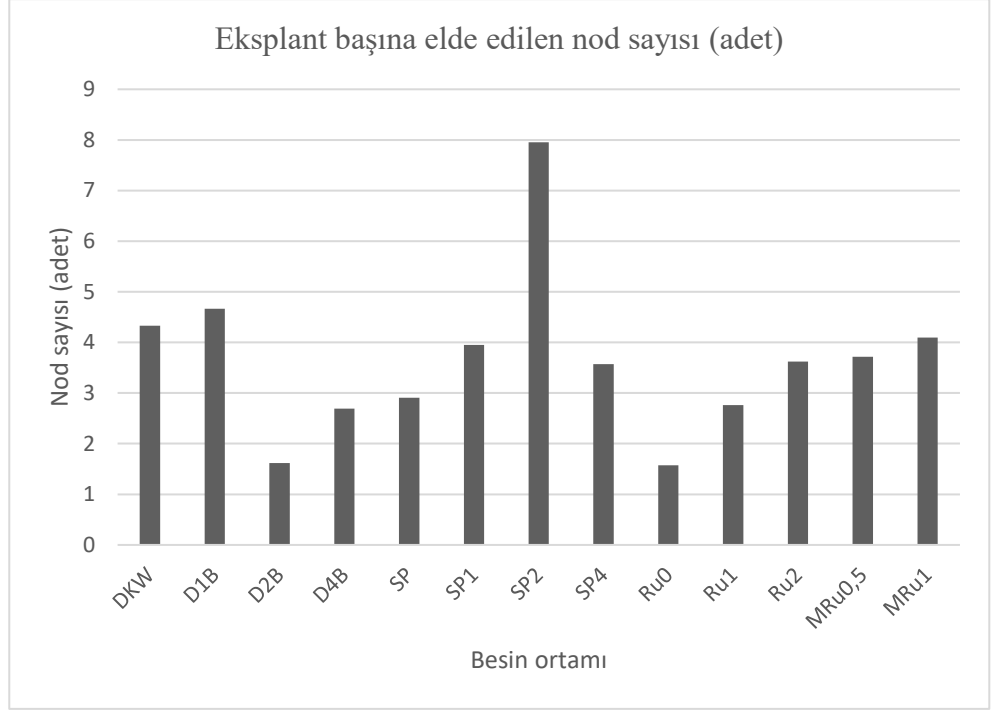
**Çizelge 4.6.** Eksplant başına elde edilen ortalama nod sayısı ve standart hata

Ortam Kodu	Eksplant başına elde edilen ortalama nod sayısı (Ortalama $\pm$ S.H.)
DKW	4,33 $\pm$ 0,66 b
D1B	4,67 $\pm$ 0,64 b
D2B	1,62 $\pm$ 0,34 c
D4B	2,69 $\pm$ 0,44 bc
SP	2,91 $\pm$ 0,49 bc
SP1	3,95 $\pm$ 0,75 bc
SP2	7,95 $\pm$ 0,69 a
SP4	3,57 $\pm$ 0,50 bc
Ru	1,57 $\pm$ 0,48 c
Ru1	2,76 $\pm$ 0,58 bc
Ru2	3,62 $\pm$ 0,58 bc
MRu0,5	3,71 $\pm$ 0,40 bc
MRu1	4,10 $\pm$ 0,23 bc

**Çizelge 4.7.** Farklı besin ortamlarında kültüre alınan nodal eksplantlarından elde edilen sürgünlerin ortalama nod sayısının tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Ortam	12	651,5	54,288	8,85	0,00*
Hata	260	1594,4	6,132		
Genel	272	2245,8			

\*:  $p<0.05$  düzeyinde önemli, \*\*:  $p<0.0.1$  düzeyinde önemli



**Şekil 4.9.** Farklı besin ortamlarının nod sayısı üzerine etkileri



**Şekil 4.10.** SP2 ortamında indüklenen sürgün örnekleri

#### 4.5.3 Eksplant başına elde edilen ortalama sürgün uzunluğu (cm)

Yapılan varyans analizi sonucunda besin ortamının sürgün uzunluğu üzerine etkisi önemli ( $p<0.05$ ) bulunmuştur (Çizelge 4.9). En başarılı besin ortamı 1,6 cm ile SP2 ortamı olmuştur (Şekil 4.11). Bu parametreye göre en az başarılı besin ortamı ise 0,23 cm ile Ru olmuştur (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.11).

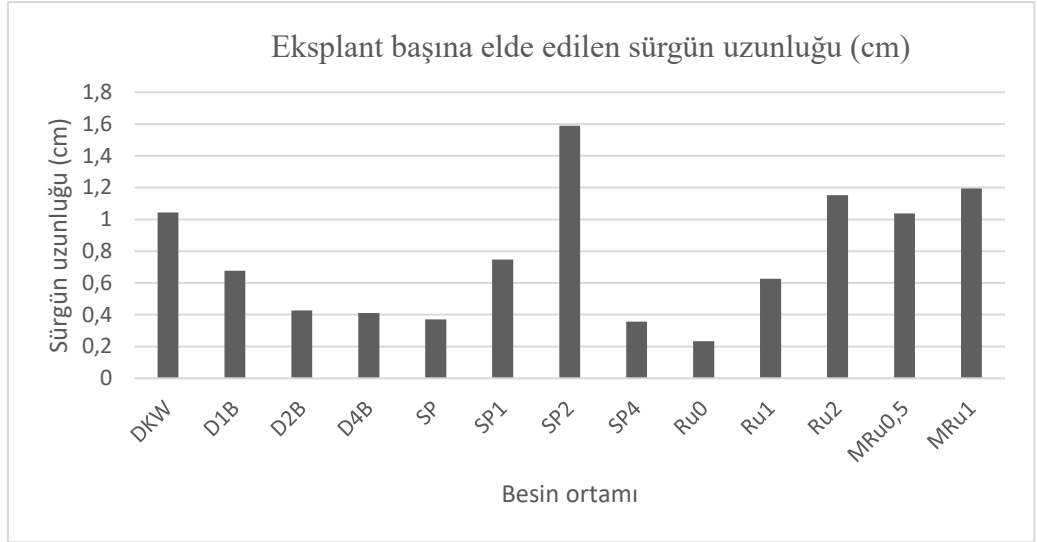
Çizelge 4.8. Eksplant başına elde edilen ortalama sürgün uzunluğu ve standart hata

Ortam kodu	Eksplant başına elde edilen ortalama sürgün uzunluğu (cm) (Ortalama $\pm$ S.H.)
DKW	1,04 $\pm$ 0,13 ab
D1B	0,68 $\pm$ 0,12 bc
D2B	0,43 $\pm$ 0,08 c
D4B	0,41 $\pm$ 0,06 c
SP	0,37 $\pm$ 0,07 c
SP1	0,75 $\pm$ 0,13 bc
SP2	1,60 $\pm$ 0,19 a
SP4	0,36 $\pm$ 0,09 c
Ru	0,23 $\pm$ 0,10 c
Ru1	0,63 $\pm$ 0,17 bc
Ru2	1,15 $\pm$ 0,20 ab
MRu0,5	1,04 $\pm$ 0,12 ab
MRu1	1,20 $\pm$ 0,09 ab

Çizelge 4.9. Farklı besin ortamlarında kültüre alınan nodal eksplantlarından elde edilen ortalama sürgün uzunluğunun tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Ortam	12	42,81	3,5678	10,58	0,000*
Hata	260	87,68	0,3372		
Genel	272	130,50			

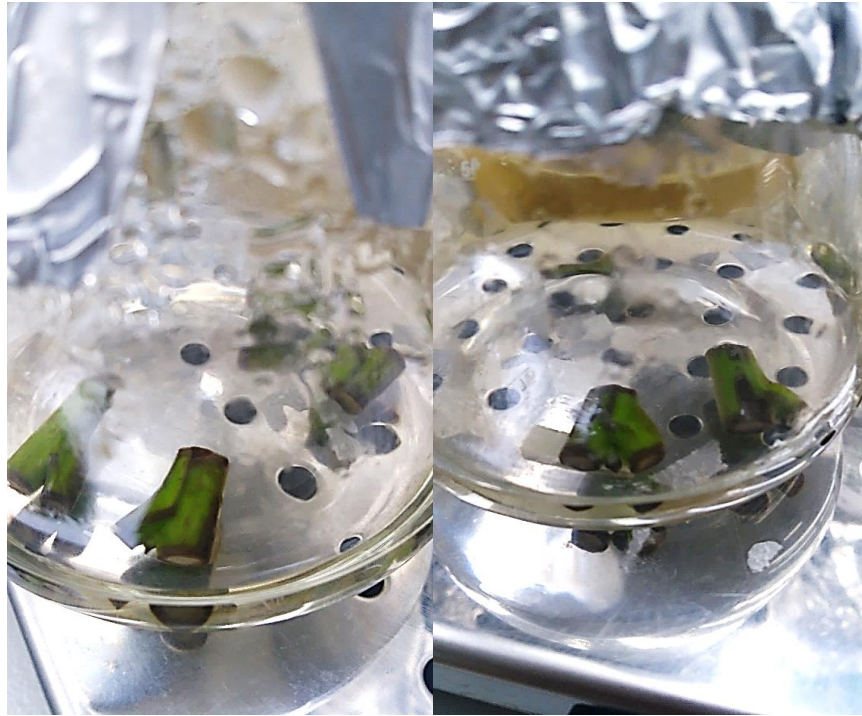
\*:  $p<0.05$  düzeyinde önemli, \*\*:  $p<0.0.1$  düzeyinde önemli



**Şekil 4.11.** Farklı besin ortamlarının sürgün uzunluğu üzerine etkileri

#### 4.6 Nodal Eksplantların Sıvı Kültürde Mikroçoğaltım Denemeleri

Sıvı besin ortamında kültüre alınan ceviz nodal eksplantlarının tamamı kararma ve kontaminasyon sebebiyle kaybedilmiştir. Kültüre alınan 12 erlendeki eksplantların hepsi 2 hafta sonunda kararma ve kontaminasyon sonucu ölmüşlerdir (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** Sıvı kültürde mikroçoğaltım denemelerinde kararma sonucu ölen ceviz eksplantı örnekleri

#### 4.7 Nodal Eksplantların Çift-Fazlı Kùltürlerde Mikroçoğaltım Denemeleri

Çift faz şeklinde kùltüre alınan ceviz nodal eksplantlarının tamamı kararma ve kontaminasyon sebebiyle kaybedilmiştir. Kùltüre alınan 25 tüpteki eksplantların tamamı 1 hafta süresinde kararma ve 2 hafta sonunda kontaminasyon göstererek ölmüşlerdir (Şekil 4.13).

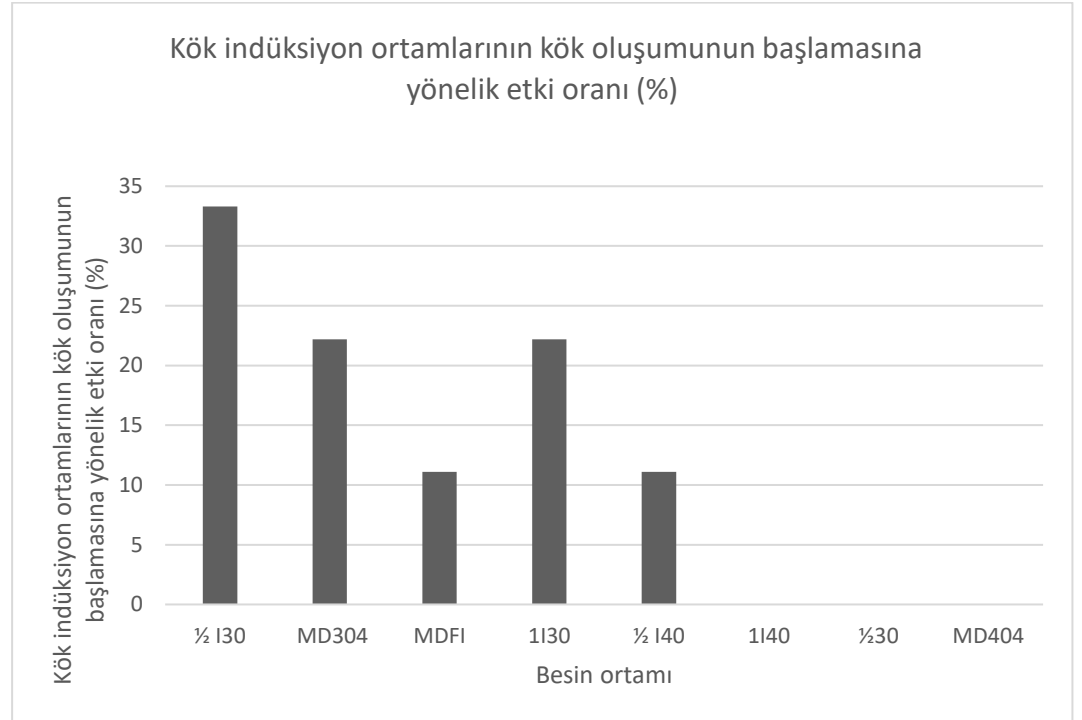


Şekil 4.13. Çift faz denemelerinde kararma ve kontaminasyon sonucu ölen ceviz eksplant örnekleri

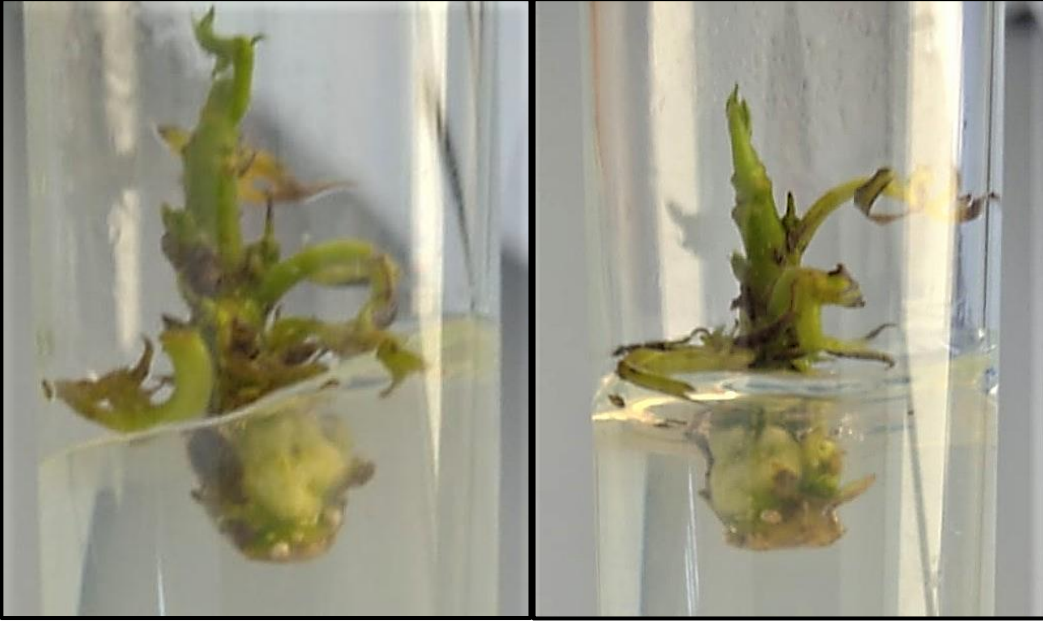
## 4.8 *In Vitro* Köklendirme Denemeleri

### 4.8.1 Köklendirme indüksiyon denemeleri

Yapılan kök indüksiyon denemelerinin kök oluşumunun başlamasına yönelik etkisi incelenmiştir. İstatistik analiz yapmaya yetecek güçte veri oluşturulamadığından yüzde hesaplamaları yapılmıştır. Bu veriler ışığında köklenmede en etkin indüksiyon sürecini başlatan besin ortamları ½ I30, MD304, MDFI, 1I30, ½ I40 olarak belirlenmiştir. En başarılı kök indüksiyon ortamı 4 mg/L IBA içeren ½ I30 ortamı (%33,3) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



**Şekil 4.14.** Kök indüksiyon ortamlarının kök oluşumunun başlamasına yönelik etki oranı (%)



Şekil 4.15. MD304 ortamında gelişen kök indüksiyonu



Şekil 4.16. 1/2 I30 ortamında kurulan kök indüksiyon denemeleri

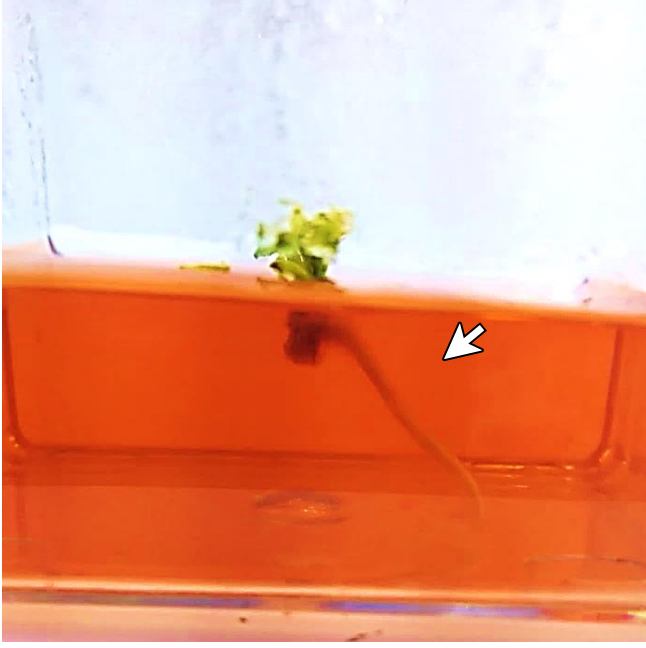
#### 4.8.2 Kök gelişimi denemeleri

Kök indüksiyonu gerçekleştirilen sürgünler Çizelge 3.7’de belirtilen farklı besin ortamı kompozisyonlarında kök geliştirme adına 21 günlük süreç boyunca, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyotta,  $24 \pm 2$  °C ’de ve beyaz LED aydınlatmalı 3500 lüks ışık şiddetinde muhafaza edilmişlerdir.

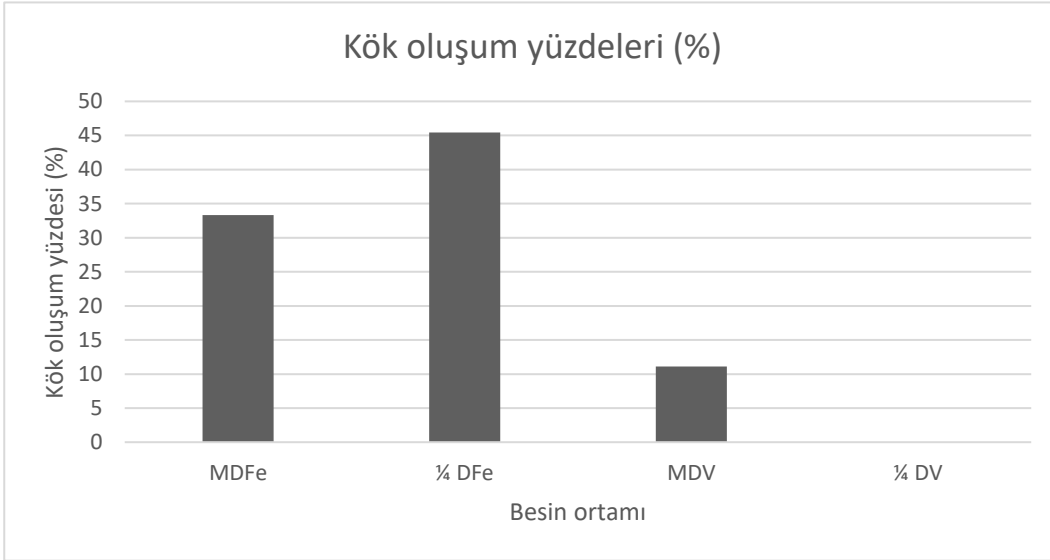
Denemelerde kullanılan besin ortamlarının ortalama kök uzunluğu (cm) ve kök sayısı (adet) üzerine etkisi ile ilgili yapılan incelemeler kaydedilmiştir. Gözlem verileri istatistiki açıdan farklılıklar önemsiz çıkmıştır (Çizelge 4.10, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18, Şekil 4.19). En başarılı köklendirme ortamının  $\frac{1}{4}$  DFe olduğu belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre en başarılı köklendirme oranı %45,45 olarak kaydedilmiştir. Kullanılan besin ortamlarına göre sürgün kaidelerinde %0-77.7 arasında değişen oranlarda kallus oluşumları meydana gelmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.20).

**Çizelge 4.10.** Köklendirme denemelerinde besin ortamlarının parametrelere etkisi

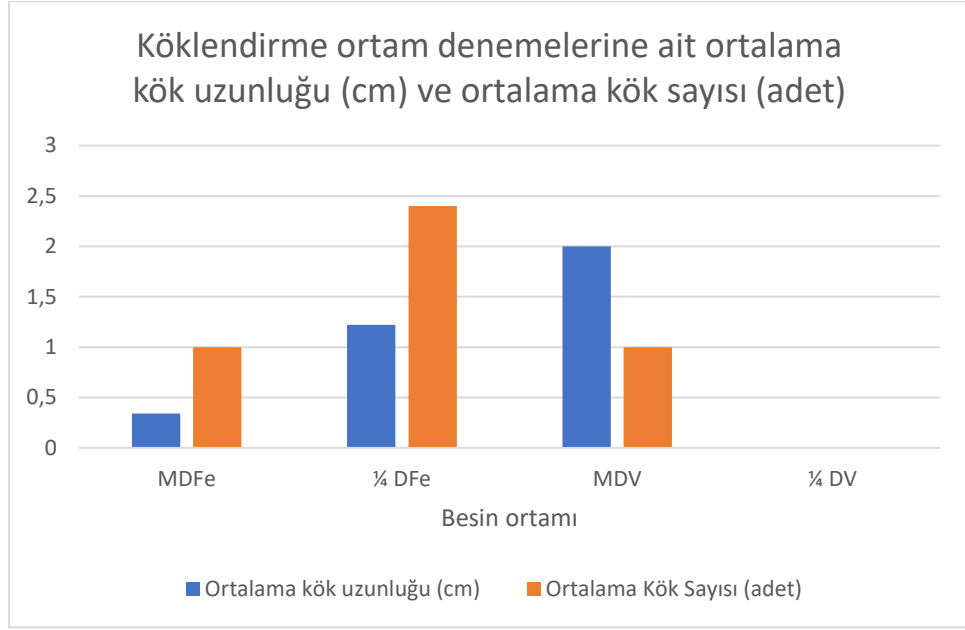
Köklendirme ortamı	Kök oluşum oranı (%)	En uzun kök uzunluğu (cm)	Ortalama kök uzunluğu (cm)	Ortalama Kök Sayısı (adet)	Kallus oluşum oranı (%)
<b>MDFe</b>	33,3	1	0,34	1	77,7
$\frac{1}{4}$ DFe	45,45	2,5	1,22	2,4	54,5
<b>MDV</b>	11,1	2	2	1	11,1
$\frac{1}{4}$ DV	0	0	0	0	0



Şekil 4.17.  $\frac{1}{4}$  DFe ortamında sürgünden kök gelişimi



Şekil 4.18. Köklendirme ortam içeriklerine göre kök oluşum yüzdeleri (%)



**Şekil 4.19.** Köklendirme ortam denemelerine ait ortalama kök uzunluğu (cm) ve ortalama kök sayısı (adet)



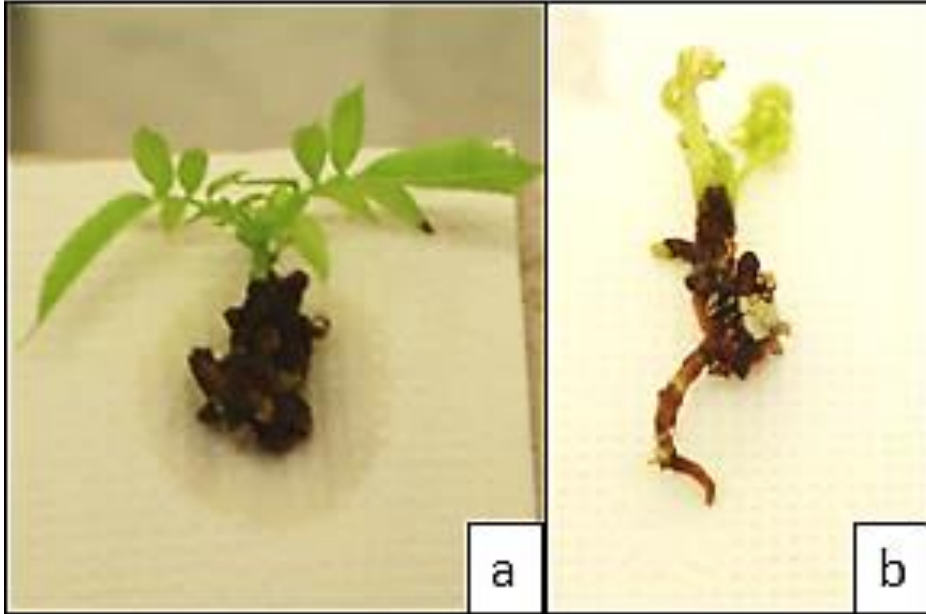
**Şekil 4.20.** MDFe besin ortamında oluşan kallus görüntüsü ve kök yapısı

İçerisinde 119 mg/L FeEDDHA bulunan MDFe besin ortamında kurulan kültürlerde gözlenen köklü sürgünler ise Şekil 4.19' de gösterilmiştir. Kök gelişim denemeleri içerisinde; ¼ DFe ortamı içeren kültür kabında gelişen sürgüne ait yaprak ucunda kallus oluşumu meydana gelmiştir. Adventif kök oluşumunun da bu kallus dokusundan oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.**  $\frac{1}{4}$  DFe ortamında gelişen sürgüne ait yaprak ucunda oluşan kallus ve kök görüntüsü

Vermikulit denemelerinin gerçekleştirildiği çalışmalardan elde edilen mikrosürgün ve kök görüntüleri ise Şekil 4.22' de gösterilmiştir.



**Şekil 4.22.** Vermikulit denemeleri sonucu gelişen mikrosürgünler a)  $\frac{1}{4}$  DV besin ortamında oluşan yoğun kallus yapısı, b) MDV besin ortamında gelişen kök yapısı

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen ilk aşama nod eksplantlarının yüzey sterilizasyonudur. Ceviz bitkisine ait eksplantlardan içsel kontaminasyon kaynaklarının elimine edilmesi mikroçoğaltım çalışmalarının en önemli basamağıdır. Çünkü ceviz çeşitleri ile gerçekleştirilen mikroçoğaltım çalışmalarında karşılaşılan ve daha tam olarak sonucu netleştirilemeyen kararma ve kontaminasyon probleminin elimine edilmesi gerekmektedir.

Juglans bitkisinin tüm türlerinin doku kültürüne karşı oldukça inatçı olduğu düşünülmektedir. Bunun nedeni; *in vitro* kültüre alınacak olan farklı türlerin ve tür eksplantlarının (organ, doku, hücre) *in vitro* ortama alıştırılmasında yaşanan zorluklardan kaynaklanmaktadır. 1980'lerden beridir cevizin mikroçoğaltımı ile ilgili pek çok bilimsel çalışma yayınlanmıştır, ancak türe bağlı doğru bir mikroçoğaltım protokolünün oluşturulmasında hala yeterli bilgi bulunmamaktadır (Julian et al., 2020).

Ceviz türlerinin mikroçoğaltım çalışmalarında çözülmesi gereken bazı zorluklar ifade edilmektedir. Eksplantlarda fenolik bileşenin oksidasyonuna bağlı olarak oluşan kararma, eksplantlarda bulunan içsel kontaminasyon kaynakları, kültür ortamına adaptasyon, köklenme ve toprağa transfer ile ilgili zorluklar ceviz mikroçoğaltımının en önemli sorunlarıdır (Kepenek ve Kolağasi, 2016).

Fidancı (2005) Şebin ve KR-2 ceviz çeşitlerini kullanarak yaptığı araştırmasında, mikroçoğaltımda kültür oluşturma safhasında karşılaşılan en önemli problemin bulaşma ve kararma olduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda da çözülmesi gereken en önemli probleminin bulaşma ve kararma olduğu düşünülmüş ve bu yönde çalışmalar yapılmıştır. Yapılan farklı sterilizasyon denemelerinde en yüksek kontaminasyon oranını (37,5) ST2 ve ST3 denemelerinde olurken en düşük kontaminasyon oranını (%13,3) ST1 de kaydedilmiştir. Benzer şekilde en yüksek kararma (%46,7) ST4 de kaydedilirken en düşük kararma (%0) ST1 sterilizasyon metodunda kaydedilmiştir.

Farklı sterilizasyon protokolleri uygulanarak gerçekleştirilen denemeler sonucunda kararma (%4) ve kontaminasyonun en aza indirildiği sterilizasyon yöntemi ST2 (5 dk %70 etil alkol + 5 dk %0,2 cıva klorür -Tween 20 ilave edilmiş) olarak belirlenmiştir.

Dong ve ark. (2007), cevizden alınan ekplantların rejenerasyon denemelerinde başarılı bir şekilde sterilizasyon gerçekleştirilmesi için, %70'lik etil alkolde bir süre bekletilen ekplantların ardından %0,1 HgCl<sub>2</sub> ile sterilizasyon işlemi tamamlanıp ardından steril distile su ile durulandığı bildirilmiştir.

Şirin (2014), Kaman 1 ve Kaman 5 ceviz çeşitlerinin koltukaltı tomurcuklarında sterilizasyon protokülü geliştirmek amacıyla, eksplantları %70'lik etil alkole 1 dakika maruz bırakıp ardından %0,2'lik HgCl<sub>2</sub> içinde 5 dakika boyunca sterilizasyon işlemini gerçekleştirmiştir. Cevizde yapılan rejenerasyon çalışmalarında yoğun olarak görülen kararmayı önlemek için 100 mg/L askorbik asit, 100 mg/L sitrik asit ilave edilerek önlenmeye çalışılmış, ayrıca 3, 24 ve 48 saat aralıklarla altkültüre alınarak çalışmaya devam edildiği bildirilmiştir.

Revilla ve ark. (1989) yaptıkları araştırmalarında, ceviz mikroçoğaltımında doku kültürü teknikleri ile ilgili ana sorunlardan birinin düşük çoğaltım oranı olduğunu belirtmişlerdir. Bu düşük oranın sebebi rejenere sürgünlerin yavaş büyümesi ile ortaya çıkan uzun kültür süreleri ve buna bağlı kültürde gelişen gizli kontaminasyon olduğu düşünülmüştür. Bu problemin üstesinden gelmek için, aksiller sürgünlerin üretimini arttırdığı gösterilen çift fazlı bir sistemde embriyonik ve genç materyalden nodal segmentler kültürlenmeye çalışılmıştır ve kültür ortamında bakteriyel kontaminasyonu önlemek için antibiyotik karışımlar eklenmiştir (Revilla et al., 1989). Kendi çalışmamızda da kontaminasyon ve kararma problemleri yaşanmıştır. Çeşitli sterilizasyon yöntemleri ile bu sorunun üstesinden gelinmeye çalışılmıştır. Özellikle HgCl<sub>2</sub> varlığında tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir.

Lone ve ark. (2017) odunsu türlerde, otsu bitkilere göre *in vitro* klonlamanın çok daha zor olduğunu belirtmişlerdir. Eksplantların olgun odunsu türlerden *in vitro* manipülasyona zayıf cevabı genellikle kararma ve eksplant

nekrozu ile ilişkilendirilmiştir. 0.3 mg/L Benzilamino pürin ve 0.1 mg/L indol-3-bütirik asit ilave edilmiş MS bazal ortamı, başlangıç kültürlerinin oluşmasında, minimum ortam kararında (%80.44), minimum eksplant kararında (% 78.22) ve eksplant başına ortalama minimum karar skoruna (% 9.17) ile en iyi yanıt verdiği rapor edilmiştir (Lone ve ark., 2017). Bitkilerde yeterli miktarda besin bulunmadığında nekroz oluşabilmektedir. Son derece düşük miktardaki fosfor başlangıçta bitkinin yapraklarının parlak yeşil görünmesine neden olmakta, ancak yaşlı yapraklar nekrotik hale gelmektedir. Eksikliği nekroza neden olan diğer besinler arasında potasyum, azot, bor, demir ve nikel bulunmaktadır (Anonim 2019b). Çalışmamızda, nekroz ve özellikle karar oranı Rugini ortamlarında genel olarak daha yüksek olarak gözlemlenmiştir. Buna karşın Rugini bazlı, kazein hidrolizat ve adenin hemisülfat eklenerek oluşturulan modifiye Rugini ortamlarında kararmanın azaldığı gözlemlenmiştir. Rugini ortamının MS ve DKW ortamlarına göre tuz yoğunluğunun az olması karar ve nekroza sebep olduğu düşünülebilir. Ortama eklenen kazein hidrolizat ve adenin hemisülfat eksplantları bu durumdan koruduğu düşünülebilir

Bu bilgiler ışığında ‘Paradox’ ceviz anacı türünde gerçekleştirdiğimiz sterilizasyon yönteminin literatür bilgileri ile uyumlu olduğu ve ceviz türlerinde karar ve kontaminasyon problemlerinin engellenmesine yardımcı olabileceği ifade edilebilir.

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen nod eksplantları sürgün indüksiyonunun gerçekleştirilmesi adına Çizelge 3.5’de belirtilen ortamlara aktarılmıştır. 21 gün sonunda elde edilen sonuçlara göre; birim eksplant başına düşen en yüksek sürgün sayısı (1,05 sürgün/eksplant) yarı katı SP4 (4 mg/L BAP + 0.001 mg/L IBA + 200 mg/L kazein hidrolizat + 50 mg/L adenin hemisülfat içeren DKW) besin ortamında elde edilmiştir. Ayrıca birim eksplant başına düşen en yüksek nod sayısı (7,95 adet/eksplant) ve sürgün uzunluğu (1,6 cm) bakımından en başarılı ortam yarı katı SP2 (2 mg/L BAP + 0.001 mg/L IBA + 200 mg/L kazein hidrolizat + 50 mg/L adenin hemisülfat içeren DKW) olmuştur.

Literatür bilgileri incelendiğinde; Scaltsoyianes ve ark. (1997) *Juglans regia* L.’de yaptıkları rejenerasyon çalışmasında en iyi aksiller sürgünlerin 4,44 µM BAP

ve 0,005  $\mu\text{M}$  IBA içeren DKW (Driver and Kuniyuki, 1987) besin ortamında gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Sürgün uzunluğunun en fazla 2,22  $\mu\text{M}$  BAP içeren kültür ortamında olduğu belirtilmiştir.

Saadat ve ark. (2002) tarafından *Juglans regia* L. çoğaltılması, üç farklı besin ortamı DKW, MS, WPM ve üç farklı katılaştırıcı Phytigel, Difco Bacto agar ve Phytigel'in bir karışımı ve Difco Bacto Agar ile besin ortamları arasındaki farklılıkları incelemişlerdir. Çalışmada, eksplantların rejenere olma oranı ve gelişim farklılıkları ele alınmıştır. Eksplantlardaki gelişmelerin DKW ortamında, MS ve WPM ortamlarına göre daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Phytigel katılaştırıcısının Difco Bacto Agar, Difco Bacto Agar + Phytigel' den daha iyi sonuç verdiği de çalışmada ifade edilmiştir.

Tetsumura ve ark. (2002) cevizde yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında, 5  $\mu\text{M}$  BAP ve 0,05  $\mu\text{M}$  IBA ilave edilen DKW besin ortamında başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

Fidancı (2005) yaptığı çalışmada, Şebin ve KR-2 ceviz çeşitlerinde üç farklı eksplant kullanmıştır (meristem, sürgün ucu, nodal segment) ve üç farklı besin ortamında kültüre alınmıştır. Besin ortamı olarak; MS, DKW, WPM ortamlarını kullanmıştır. En iyi gelişim DKW bazlı 1,0 mg/L BAP ve 0,01 mg/L IBA içeren besin ortamında gözlemlenmiş ve bu mikroçoğaltımlar bu ortam üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Amiri ve Gharati (2011) yaptıkları çalışmada, besin ortamında bulunan makro elementlerin mikroçoğaltım ve köklenme üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada 1, 1/2, 1/3, 1/5 oranlarında DKW besin ortamları kullanılmış, sürgün gelişimi ve çoğaltılmasında makro 15 elementin oranları artırılarak gelişmelerin de buna bağlı olarak arttığı ifade edilmiştir.

Mangal ve ark. (2012), embriyo kültürü yoluyla bitki rejenerasyonu ve elit genotiplerin çoğaltımı için daha yüksek ve daha hızlı bir oran elde etmek amacıyla dölleme sorunlarının üstesinden gelmek üzere yaptıkları bir çalışmada, cevizde bitki rejenerasyonu için bir protokol elde etmişlerdir. En iyi gelişmenin, 3  $\mu\text{M}$  BAP

ve 5 µM IBA ile takviye edilmiş DKW ortamında %94,66 oranında olduğu saptanmıştır.

Tuan ve ark. (2016) yaptıkları bir araştırmada, farklı melez ceviz çeşitlerinde DKW ve Ruguni besin ortamları ve Oxoid agar, Kobe agar, Gelrite gibi katılaştırıcı maddeler kullanarak denemeler kurmuşlardır. Ayrıca BAP, besin ortamlarına farklı konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. En iyi sürgün gelişiminin Ruguni besin ortamında olduğu ve Kobe agar ile gerçekleştirildiği bildirilmiştir.

Paradox cevizi (*Juglans hindsii* x *J. regia*)'nın apikal ve lateral meristemleri, bu anacın *in vitro* çoğaltımını gerçekleştirmek amacıyla kültüre alınmışlardır. Cevize spesifik bir besin ortamı olan DKW'ye 4,5µM benziladenin (BA) ve 5 µM indolbütirikasit (IBA) eklenmesiyle optimum çoklu sürgün gelişiminin sağlandığı belirtilmiştir (Driver and Kuniyuki, 1984). Çalışmamızda, yarı katı DKW ortamında kültüre aldığımız nod eksplantlarından BAP varlığında sürgün oluşturmada başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca SP kodunu verdiğimiz ortamlarda 0,001 mg/L IBA ve BAP (1, 2 ve 4 mg/L) kombinasyonlarında da çoklu sürgün gelişimi sağlanmıştır.

Mejer-Dinkel ve Wenzlitschke (2015) yaptıkları çalışmalarında, eksplant olarak seradaki aşılınmış bitkilerden ve 19 yaşındaki bir ağaçtan alınan genç sürgünleri kullanmışlardır. Yüzey sterilizasyonundan sonra, 6-benzilaminopurin (BAP) ve indol-3-asetik asit (IBA) ihtiva eden Driver ve Kuniyuki (DKW) ve Rugini Olive Medium (ROM) besin ortamlarında bir aksiller tomurcuğu olan nodal segmentler kültüre alınmıştır. Başlangıç aşamasında kontaminasyon ve eksplantların kahverengileşmesi ciddi sorunlar olarak belirlenmiştir. Eksplantların sağ kalım oranı çok düşük bulunmuştur. Her iki eksplant tipi için de ROM temelli ortam kombinasyonları ve sırasıyla ½ ROM ve ½ DKW ortamının bir kombinasyonu tanımlanmıştır; böylelikle, standart DKW ortamına kıyasla bir aylık kültür süresinde önemli ölçüde daha yüksek çoğaltım oranı (7,59) ve sürgün kalitesi (2,1 cm) sağlanmıştır (Meier-Dinkel and Wenzlitschke, 2015). Yaptığımız çalışmada da Rugini ve DKW ortamı ve modifikasyonları denenmiştir. Tam güçte denediğimiz DKW, Rugini besin ortamına göre daha yüksek sürgün sayısı

vermiştir. Bunun tam güç ve yarı güç arasındaki içerik farkından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bosela ve Michler (2008) yaptıkları çalışmalarında, kara ceviz eksplantlarının WPM ve ½ x DKW ortamlarında, yüksek tuzlu ortamdaki (DKW ve MS) %10-40 frekanslara kıyasla, %60-100 frekanslarında hiperhidrisite gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise, Rugini ortamlarına göre DKW ortamlarında daha fazla hiperhidrisiteye rastlanmıştır.

Gruselle ve Boxus (1990) yaptıkları araştırmalarında, *J. regia*, *J. nigra*, *J. cinerea* ve Paradox anacıyla çalışmışlardır. Kültür başlatma esnasında 0.5 mg/L BAP ilave ettikleri modifiye MS besin ortamını kullanmışlardır.

Steven ve Pijut, 2018 yılındaki çalışmalarında, *Juglans nigra* L. türü cevizlerin nod eksplantlarını 2mg/L BAP, 0.001 mg/L IBA, 1 mg/L MT, 200 mg/L kazein hidrolizat, 50 mg/L adenin hemisülfat ve 2 mL/L PPM eklenmiş DKW bazlı sıvı besin ortamı içeren 3 litrelik Fernbach tipi şişelerde kültüre alınarak orbital çalkalayıcı (100 rpm) üzerinde tutulmuşlardır. Sıvı kültür içerisindeki nodların tamamının sürgün uzaması gösterdiği, kararmanın olmadığı ve kontaminasyonun ise %6.9 olduğunu kaydetmişlerdir. Bizim çalışmamızda, sıvı ortam denemelerinde 250 mL ve 100 mL hacimli erlenlerde SP2 ortamı kullanılarak nod eksplantı denemeleri kurulmuştur ve tüm eksplantlar kararma ve kontaminasyon sonucu kaybedilmiştir. Çalışmamızda en iyi sonuçlar yarı katı ortamlarda alınmıştır.

Payghamzadeh ve Kazemitabar (2008) ceviz nod eksplantları ile yaptıkları çalışmada; aktif karbon eklenmiş bitki büyüme düzenleyici içermeyen yarı katı DKW bazal ortamını alt faz olarak kullanırlarken, üst fazda ise 2 mg/L BAP içeren sıvı DKW bazal ortamını tercih etmişlerdir. Çift-fazlı kültür tipinin; yarı katı ve sıvı kültür tiplerinden daha iyi olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda çift-fazlı kültür tipinde alt fazda, yarı katı ortamlardan en iyi sürgün rejenerasyonu ve eksplant başına nod sayısı veren SP2 ortamı kullanılmış, üst fazda ise sıvı MRU2 ortamı kullanılmış ve başarısız bulunmuştur. Bu başarısızlığın sebepleri eksplantların sonbahar döneminde alınması ve alt fazda aktif karbon kullanılmaması sonucu artan kararma olarak gösterilebilir.

Sürgün indüksiyonu ve çoğaltım aşamalarından sonra elde edilen 3-5 cm uzunluğuna erişen sürgünler alınarak Çizelge 3.6'da belirtilen köklendirme ortamlarına aktarılmıştır. Köklendirme denemeleri iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada kök indüksiyonu için besin ortamlarına alınan sürgün eksplantları karanlık koşullarda 7 gün boyunca muhafaza edilmiştir. Bu indüksiyon aşamasında en başarılı ortam (%33) ½I30 besin ortamı olurken, 1I40, ½30, MD404 kodlu besin ortamlarında kök indüksiyonu ya olmamış veya eksplantlar ölmüştür. Daha sonraki aşamada ise kök oluşumunu gerçekleştirmek amacıyla karanlık koşullardan çıkarılan sürgün eksplantları farklı besin kompozisyonlarını içeren köklendirme ortamlarına transfer edilerek, 21 günlük süreçte aydınlık 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta muhafaza edilmiştir. Bu sürenin sonunda ¼ DFe kodlu ortamdaki eksplantlar en başarılı şekilde (2,4 cm kök boyu, 1.22 kök sayısı) köklenmişlerdir. Karanlık koşullarda bir süre bekletilen sürgünlerde kök indüksiyonu sağlandıktan sonra, aydınlık koşullar altında kök uzamasının desteklenmesini içeren pek çok literatür bilgisi bulunmaktadır (Fu et al. (2003); Caboni and Damiano, (2006); (Tuan et al., (2017); Kamali et al. (2001)).

## 6. ÖNERİLER

Ceviz türleri geleneksel olarak tohumların çimlendirilmesi ve elde edilen çöğürün üzerine istenen çeşit meyvenin aşılması ile çoğaltılmaktadır. Ceviz bitkisi yara dokusundan salgıladığı sekonder bileşikler yüzünden çelikle çoğaltılmaya karşı direnen bir yapıya sahiptir. Bu durum ceviz klonal çoğaltılmasının önündeki en büyük engellerden biridir.

Tohumdan çoğaltılan ceviz fidanları ile bahçe kurulduğunda, tohum kaynaklı oluşan genetik açılımdan dolayı bahçedeki ağaçlarda büyüme dengesizlikleri gözlemlenebilmekte bu durum meyvenin standardizasyonunu engellemektedir.

Bunun önüne geçebilmek için kurulacak bahçelerde kullanılacak fidanların klonal olarak çoğaltılmış anaçlar üzerine aşılanmış fidanlardan seçilmesi gerekmektedir. Bu noktada talep edilen klonal anaç ihtiyacını karşılayabilmek için ceviz anaçlarının Bitki Doku ve Organ Kültürü laboratuvarlarında en hızlı ve en uygulanabilir şekilde üretilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda piyasada en çok talep gören anaç olan “Paradox” ceviz anacının çalışmamızın sebebi budur. Bu ceviz anacının aşılama esnasında diğer çeşitlerle doku uyumu üstünlüğü bulunmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda “Paradox” anacı üzerine istenen çeşitlerin *in vitro* aşılama yapılarak piyasaya sürülmesi, üretilecek fidanların “Virüsten Ari” sertifikası alabilmesine ve ihracatta yüksek katma değerler oluşturmasını sağlayacaktır.

Çalışmalarımızda sera ortamında tutulan ceviz fidanlarının 1-2 aylık genç sürgünleri kullanılmıştır. Buna karşın ceviz bitkilerinden *in vitro*'da yıl boyu aynı yanıtı alamadığımızı gözlemledik. Bahar aylarında alınan ceviz eksplantları sürgün oluşumuna daha iyi yanıt verirken sonbahar aylarında alınan eksplantlar *in vitro* uygulamalara pozitif bir yanıt vermemiştir. Bu durumu ceviz bitkisinin çeşidine bağlı olarak ihtiyaç duyduğu “kışlama” isteği ile açıklamak mümkündür. Kış mevsimine hazırlık sürecine giren bitkiler, *in vitro* uygulamalara 4mg/L gibi yüksek konsantrasyonda sitokinin uygulanması durumlarında bile yanıt vermemektedir. İleride yapılacak çalışmalarda cevizin çeşidine bağlı olarak çalışmayı bahar ve yaz aylarında yapmanın, daha olumlu verilerin elde edilmesinde önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir.

Verilen bilgiler incelendiğinde, sürgün indüksiyonu için; 2 mg/L BAP + 0.001 mg/L IBA + 200 mg/L kazein hidrolizat + 50 mg/L adenin hemisülfat içeren DKW ortamının en etkili ortam olarak belirlenmesi literatür bilgileri ile uyumludur. Besin ortamı kompozisyonuna bağlı olarak alınan sonuçların türe ve çeşide göre değişebileceği şüphesizdir. Çünkü ceviz türlerinin mikroçoğaltımında genellikle türe ya da çeşide özgü protokollerin oluşturulması önerilmektedir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, sürgün indüksiyonu için bazal ortam olarak DKW'nin kullanılması 'Paradox' ceviz türlerinde olumlu sonuçların alınmasına yardımcı olabilecek niteliktedir.

Köklendirme aşaması *in vitro* üretilen sürgünler için aklimatizasyon aşamasına ve araziye aktarılması için önemli bir aşamadır. Çalışmamızda köklendirmenin iki aşamada yapılması materyal kabını azaltırken köklenme verimini arttırmıştır. Köklendirme aşamasında kullanılan 4 mg/L IBA miktarı bizim çalışmamızdaki çeşidimiz 'Paradox' için %45.45'lik bir indüklemeye sağlamıştır. Cevizin diğer çeşitlerinde yapılacak köklendirme denemelerinde bu değer çeşide bağlı değişiklik gösterebilir. Kök gelişimi aşamasında FeEDDHA kullanımının vermikulit kullanımına göre daha başarılı olduğu kaydedilmiştir. Kök gelişimi denemelerinde eklenen FeEDDHA ve seyreltilerek kullanılan besin ortamı, sinerjik etkiler göstererek kök gelişimi üzerinde olumlu etki oluşturmuştur.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Açıksöz, U.**, 2020, Bandırma İlçesindeki Ceviz Fidanı Üretiminin Mevcut Durumunun İncelenmesi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Akkemik, Ü.**, 2009, Genel Botanik Ders Notları, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Orman Botaniği Anabilim Dalı
- (Anonim 1) [https://www.gardenersdream.co.uk/images/juglans-regia-tree-p3311-24495\\_image.jpg](https://www.gardenersdream.co.uk/images/juglans-regia-tree-p3311-24495_image.jpg) (Erişim tarihi: 10.02.2021)
- (Anonim 2) <https://www.ozsahilfidancilik.com.tr/images/ceviz-meyvesi.jpg> (Erişim tarihi: 10.02.2021)
- (Anonim 3) <https://i.ytimg.com/vi/Thzw2mHmxRs/maxresdefault.jpg> (Erişim tarihi: 10.02.2021)
- (Anonim 4) <https://landscapeplants.oregonstate.edu/plants/juglans-regia> (Erişim tarihi: 10.02.2021)
- Anonim 2019a** [http://ceviz.ksu.edu.tr/?page\\_id=31](http://ceviz.ksu.edu.tr/?page_id=31) (Erişim tarihi: 22.11.2019)
- Anonim 2019b** <https://sciencing.com/the-definition-of-necrosis-in-plants-12003546.html> (Erişim tarihi 25.11.2019)
- Bayram U.** <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Menu/27/Tarim-Urunleri-Piyasalari>
- Bosela, M. J. ve Michler, C. H. (2008).** Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth *in vitro*: Evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44(4), 316–329. doi:10.1007/s11627-008-9114-5
- Budak Y., 2010.** Ceviz yetiştiriciliği. Samsun İl Tarım Müdürlüğü, Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayını, 14 p., Samsun.
- Caboni, E. ve Damiano, C. (2006).** *In vitro* propagation of walnut (*Juglans regia* L.): Critical factors for the induction of the rooting response. *Acta Horticulturae*, 705, 329–333.
- Cheniany, M., Ebrahimzadeh, H., Masoudi-nejad, A., Vahdati, K., & Leslie, C. (2010).** Effect of endogenous phenols and some antioxidant enzyme activities on rooting of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *African Journal of Plant Science*, 4(12), 479-487.
- Çam, E., 2020,** Bazı Ceviz (*Juglans regia* L.) Genotiplerinin Meyvelerinde Fenolik Bileşik İçeriklerinin Belirlenmesi, Çukurova Üni, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Dong, P., Lichai, Y., Qingming, W., & Ruisheng, G. (2007).** Factors affecting rooting of *in vitro* shoots of walnut cultivars. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(2), 223-226.
- Driver, J. ve Kuniyuki, A. (2014).** *In vitro* propagation of Paradox Walnut root stock, (January).

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Er, E., Akyüz, B., Öztürk, A., & Serdar, Ü. (2017).** Cevizde Çeşit Değişirme: Kabukaltı Aşısı, Meyvecilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
- Fernández-Moya, J., Licea-Moreno, R. J., Urbán-Martínez, I., Castro-Fernández, R. M., & Ramírez-López-Ramallal, C. (2020).** Clonal effect on rooting and acclimation rates for *in-vitro* micropropagation in hybrid walnut (*Juglans x intermedia* Mj 209): preliminary observations. *Annals of Silvicultural Research*, 44(1), 41-46.
- Fidancı, A. (2005).** Şebın ve KR-2 ceviz çeşitlerinin *in vitro*'da hızlı çoğaltılma tekniklerinin belirlenmesi. *Bahçe*, 34 (1), 239-246. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/bahce/issue/3349/46350>
- Fu Y, Gu F, Wu W (2003).** Sterilization of *Carya illinoensis* Explants in Tissue Culture. *Journal of Anhui Agricultural University*. 31(2): 169-172.
- Gotea, R, Gotea.L, Sestras. R, and Vahdati, K. 2012.** *In vitro* Propagation of Several
- Gruselle, R., Boxus, P. (1990).** Walnut micropropagation. *Acta Horticulturae* 284.
- Höltken, A. M., Wenzlitschke, I., Winkelmann, T., Tuan, P. N., & Meier-Dinkel, A. (2015, April).** Factors affecting shoot multiplication and rooting of walnut (*Juglans regia* L.) *in vitro*. In VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155 (pp. 525-530).
- Jay-Allemand, C., Capelli, P. ve Cornu, D. (1992).** Root development of *in vitro* hybrid walnut microcuttings in a vermiculite-containing gelrite medium. *Scientia Horticulturae*, 51(3-4), 335-342. doi:10.1016/0304-4238(92)90132-V
- Julian, L. M. R., Alexandru, F., & Georgi, C. (2020).** Micropropagation of valuable walnut genotypes for timber production: new advances and insights. *Annals of Silvicultural Research*, 44(1), 5-13.
- Kamali K, Majidi E, Zarghami R (2001).** Micropropagation of GF-677 Rootstocks (*Prunus amygdalus* x *P. persica*). *Seed and Plant* 17: 175-177.
- Kepenek, K., & Kolağasi, Z. (2016).** Micropropagation of Walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Physica Polonica, A.*, 130(1).
- Ketenci, C. K., & Bayramoğlu, Z. (2018).** Türkiye'de Ceviz Üretiminin Rekabet Analizi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(3), 339-347.
- Kyte, L., (1987).** Plants from Test Tubes. An Introduction to Micropropagation. Timber
- Leal, D. R., Sánchez-Olate, M., Avilés, F., Materan, M. E., Uribe, M., Hasbún, R., & Rodríguez, R. (2007).** Micropropagation of *Juglans regia* L. In *Protocols for Micropropagation of Woody trees and fruits* (pp. 381-390). Springer, Dordrecht.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Licea-Moreno, R.J., Contreras, A., Morales, A.V. (2015).** Improved walnut mass micropropagation through the combined use of phloroglucinol and FeEDDHA. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **123**, 143–154.
- Lone, I. A. (2017).** Effect of different growth regulator combinations on *in vitro* callusing of walnut (*J. regia* L.), 12(1), 203–209.
- Mangal M, Sharma M (2012).** Walnut Regeneration Through Embryo Culture. *Progressive Horticulture*. 44(1):120-123.
- Mcgranahan, Gale & Driver, John & W, Tuleke. (1987).** Tissue Culture of Juglans. 10.1007/978-94-017-0992-7\_19..
- Meier-Dinkel, A., & Wenzlitschke, I. (2015, April).** Micropropagation of mature Juglans hybrids. In VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155 (pp. 85-92).
- Murashige, G, Skoog F (1962).** A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Payghamzadeh, K., & Kazemitabar, S. K. (2011).** *In vitro* propagation of walnut- A review. *African Journal of biotechnology*, 10(3), 290-311.
- Peixe, A., Alpendre, P., Barroso, J., Carlos, R. ve Soto, M. G. (2015).** New strategies for *in vitro* rooting and plantlet acclimatization of the “Paradox” (*Juglans regia* × *Juglans hindsii*) rootstock. *Acta Horticulturae*, 1083(1994), 287–293.
- Press, Portland, Oregon, USA. 160 pp**
- Revilla, M. A., Majada, J., Rodriguez, R., Revilla, M. A., Majada, J., Walnut, R. R., ... Majada, J. (1989).** Walnut (*Juglans regia* L.) micropropagation To cite this version: HAL Id: hal-00882523 (*Juglans regia* L.) micropropagation, 46.
- Rugini, E. (1984)** *In Vitro* Propagation of Some Olive (*Olea europaea* sativa L.) Cultivars with Different Root-Ability, and Medium Development Using Analytical Data from Developing Shoots and Embryos. *Scientia Horticulturae*, 24, 123-134.
- Saadat Y A, Hennerty M J (2002).** Factors Affecting the Shoot Multiplication of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae*. 95(3): 251-260.
- Scaltsoyiannes A, Tsoulpha P, Panetsos K P, Moulalis D (1997).** Effect of Genotype on Micropropagation of Walnut Trees (*Juglans regia*). *Silvae Genetica* 46, 6.
- Stevens, M. E., & Pijut, P. M. (2018).** Rapid *in vitro* shoot multiplication of the recalcitrant species *Juglans nigra* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54(3), 309-317.
- Şen, S.M. 1986.** Ceviz Yetiştiriciliği. Eser Matbaası, Samsun, 229s.
- Şirin, E. (2014).** Kaman 1 ve Kaman 5 ceviz çeşitlerinin (*Juglans regia* L.) mikroçoğaltımı (Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi).

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Tetsumura T, Tsukuda K, Kawase K (2002).** Micropropagation of Shinano Walnut (*Juglans regia* L.). J. Japon. Soc. Hort. Sci. 71:5 661-663.
- Tuan, P. N., Meier-Dinkel, A., Höltken, A. M., Wenzlitschke, I. ve Winkelmann, T. (2017).** Factors affecting shoot multiplication and rooting of walnut (*Juglans regia* L.) *in vitro*. Acta Horticulturae, (1155), 525–530. doi:10.17660/ActaHortic.2017.1155.77
- Tuan, P. N., Meier-Dinkel, A., Höltken, A. M., Wenzlitschke, I., & Winkelmann, T. (2016).** Paving the way for large-scale micropropagation of *Juglans* × intermedia using genetically identified hybrid seed. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 126(1), 153-166.
- Vahdati, K., Ashrafi, E. N., Ebrahimzadeh, H. ve Mirmasoumi, M. (2009).** Improved micropropagation of walnut (*Juglans regia* L.) on media optimized for growth based upon mineral content of walnut seed. Acta Horticulturae, 839 (July), 117–124. doi:10.17660/ActaHortic.2009.839.13
- Vahdati, K., Leslie, C., Zamani, Z., & McGranahan, G. (2004).** Rooting and acclimatization of *in vitro*-grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars. HortScience, 39(2), 324-327.
- Vahdati, K., Mirmasoumi, M., & Rezaee, R. (2008).** Rooting and multiplication ability of Persian walnut as influenced by motherstock vigor and precocity. In I International Symposium son Biotechnology of Fruit Species: BIOTECHFRUIT2008 839 (pp. 223-228).
- Walnut Cultivars. Bulletin UASVM Horticulture, 69(1)**
- Yıldırım, H. T. (2018).** Bazı ceviz çeşitlerinde *in vitro* mikroçoğaltım (Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi).
- Yiğit, D., Yiğit, N., Aktaş, E., & Özgen, U. (2009).** Ceviz (*Juglans regia* L.)'in antimikrobiyal aktivitesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 39(1-2), 7-11.
- Yiğit, Y., & Ay, E. (2016).** Fonksiyonel Gıda Özelliğiyle Ceviz ve Kaman Cevizi. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Dergisi (Ibad), 1(2), 142-153.

## TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesiyle bana her zaman yol gösterici olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Aynur GÜREL'e,

Tez çalışmam boyunca bilgi eksikliğimi kapatmam konusunda çok yardımcı olan, sayın Dr. Öğr. Üyesi Meltem BAYRAKTAR'a,

Tez çalışmam boyunca materyal kaynağı konusunda yardımcı olan sayın Berat GÜLCAN'a,

Bilgisiyle ve tecrübesiyle bana çok şey katan sayın Ar. Gör. Begüm GÜLER'e,

Yüksek Lisans hayatım boyunca beni her zaman destekleyen ve her daim yanımda olan beraber çalışmaktan çok keyif aldığım değerli arkadaşlarım, Senem ŞEN ve Hacer KANDEMİR, Nurberat ÇETİN, Melis SAÇU, Elvan KETE, Merve SEZEN, Halide Hande GÜNGÖR'e

ve son olarak bana ilerlediğim bu yolda daima maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen canım aileme,

saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

Cem DİRLİK

## ÖZGEÇMİŞ

Lise öğrenimini Bandırma'nın Ayyıldız Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2010 yılında Bilecik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü kazandı. 2016 yılında lisans öğrenimini tamamladı. 2017 yılında Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı.