

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİREKT ORGANOGENESİS YÖNTEMİ İLE ÇOĞALTILAN KIZILÇAM'DA
(*Pinus brutia* Ten.) SÜRGÜN GELİŞİMİNİN OPTİMİZE EDİLMESİ

Süleyman Alpkan AKKUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2013

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİREKT ORGANOGENESİS YÖNTEMİ İLE ÇOĞALTILAN KIZILÇAM'DA
(*Pinus brutia* Ten.) SÜRGÜN GELİŞİMİNİN OPTİMİZE EDİLMESİ**

Süleyman Alphan AKKUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 01/02/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (90) not takdir edilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd.Doç. Dr Tolga YILDIRIM..... (Danışman)

Doç. Dr. Nuray KAYA.....

Yrd. Doç. Dr. Ayşegül NASIRCILAR.....

ÖZET

DİREKT ORGANOGENESİS YÖNTEMİ İLE ÇOĞALTILAN KIZILÇAM'DA (*Pinus brutia* Ten.) SÜRGÜN GELİŞİMİNİN OPTİMİZE EDİLMESİ

Süleyman Alpkan AKKUŞ

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM

Ocak 2013, 37 sayfa

Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.), çamgiller (Pinaceae) ailesi, iğne yapraklılar (Pinales) takımından iğne yapraklı ve yaprağını dökmeyen bir türdür. Türkiye’de 5.4 milyon hektarın üzerinde bir alanda doğal olarak bulunan kızılçam, Türkiye ibreli ormanlarının yaklaşık %25’ini kaplar ve hızlı büyür (OAE 1987, Kayacık 1965, Öztürk vd 2010). Bu çalışmadaki amaç halen devam etmekte olan ıslah çalışmalarına ek olarak *in vitro* (laboratuar koşullarında) fidan üretim tekniklerinin geliştirilmesi, elde edilen veya edilecek olan üstün genetik özellikli bireylerin süratle çoğaltılmasına katkıda bulunmaktır. Bu amaç doğrultusunda 4 deney yapılmıştır. Çalışmalarda, çimlendirilen tohumlardan alınan kotiledonlar eksplant olarak kullanılmıştır. Sürgün gelişiminin araştırıldığı deneylerde besin ortamı olarak DCR (Douglas fir cotyledon revised medium) besin ortamı kullanılmıştır (Gupta ve Durzan 1985). İlk deneyde 5 farklı (0.5mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L, 4.0mg/L, 8.0mg/L) konsantrasyonda GA₃ (giberellik asit) uygulaması yapılmış ve kullanılan bu BBD’lerin (bitki büyüme düzenleyici) sürgün gelişimi üzerine etkileri incelenmiş ve GA₃ uygulanmayan eksplantlarla karşılaştırılması yapılmıştır. Karşılaştırma sonunda GA₃ uygulamasının sürgün gelişimi üzerinde olumsuz sonuçlar yarattığı ve sürgün gelişimini durdurduğu tespit edilmiştir. En yüksek sürgün ortalaması 4.49 ile kontrol grubundan elde edilmiştir. İkinci çalışmada GA₃ uygulamaya başlama sürelerinin sürgün uzamasına etkileri incelenmiş

ve bu çalışma için de eksplantlar 3, 6 ve 9 hafta gecikme ile BBD içermeyen besin ortamından GA₃ içeren besin ortamına transfer edilerek sürgün gelişimleri incelenmiştir. Bu çalışmada en yüksek sürgün ortalaması 2.26 ile 9 hafta gecikmeli transfer edilen grupta elde edilmiştir. Üçüncü çalışmada ise DCR besin ortamında kullanılan farklı makroelement miktarlarının (½ , ¾ ve kontrol) sürgün gelişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışma sonunda en yüksek sürgün ortalaması 6.80 ile kontrol grubundan elde edilmiştir. Son olarak da kazein (casein hydrolysate) kullanımının sürgün gelişimi üzerine etkisi olup olmadığının incelenmesi yapılmıştır. Test sonuçlarının ANOVA analizlerine göre CH uygulaması ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan bir fark oluşmamıştır.

Sonuç olarak test edilen uygulamaların tamamının kontrol grupları ile karşılaştırıldığında sürgün gelişimi üzerinde etkili olmadığı görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELER: Bitki doku kültürü, Direkt organogenez, *Pinus brutia* var. *brutia* Ten.

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM (Danışman)

Doç. Dr. Nuray KAYA

Yrd. Doç. Dr. Ayşegül NASIRCILAR

ABSTRACT

SHOOT GROWTH OPTIMIZATION ON TURKISH RED PINE (*Pinus brutia* Ten.) MULTIPLIED BY DIRECT ORGANOGENESIS METHOD

Süleyman Alpkın AKKUŞ

M.Sc. Thesis in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Tolga YILDIRIM

January 2013, 37 pages

Pinus brutia Ten. is a coniferous and evergreen species from Pinaceae family and Pinales team. Covering an area of more than three million hectares in Turkey naturally, *Pinus brutia* Ten. accounts for approximately 25% of coniferous forests of Turkey and has been expanding its area very fast (OAE 1987, Kayacık 1965, Ozturk 2010). The purpose of this study was to develop *in vitro* (under laboratory conditions) young tree cultivation techniques in addition to breeding activities that are still ongoing and to contribute to the multiplication of superior genetic individuals that have been or will be obtained. In this respect, 4 experiments were undertaken. In the studies, the cotyledons that were taken from the germinated seeds were used as explants. In the experiments in which shoot development was examined, DCR (Douglas fir cotyledon revised medium) was used as a medium (Gupta and Durzan 1985). In the first experiment, GA₃ (gibberellic acid) was applied in 5 different concentrations (0.5mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L, 4.0mg/L, 8.0mg/L) and the effect of such PGRs (plant growth regulators) on shoot development was examined and they were compared to explants on which GA₃ wasn't applied. It was determined that GA₃ application caused negative results on shoot development and stopped shoot development. The highest shoot average was obtained from control group with 4.49. The effects of times of starting GA₃ application on shoot growth were examined in the second study and the shoot

developments were examined by transferring the explants from a nutritional environment with no PGR to a nutritional environment containing GA₃ with delays of 3, 6 and 9 weeks. The highest shoot average was obtained from the group that was transferred with a delay of 2.26 to 9 weeks in this study. In the third study, on the other hand, the effects of different macro element amounts used in DCR nutritional environment ($\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ and control) on shoot development were examined. As a result of the study, the highest shoot average was obtained from control group with 6.80. Finally, it was examined whether use of casein hydrolysate has any effect on shoot development or not. According to ANOVA analyses of test results, there was no statistically significant difference between CH application and control group.

In conclusion, when all of the tested applications were compared with control groups, it was observed that they weren't effective on the shoot development.

KEYWORDS: Plant Tissue Culture, Direct Organogenesis, *Pinus brutia* var. *brutia* Ten.

COMITTEE: Asst. Prof. Dr. Tolga YILDIRIM (Supervisor)
Assoc. Prof. Dr. Nuray KAYA
Asst. Prof. Dr. Ayşegül NASIRCILAR

ÖNSÖZ

Ülkemiz coğrafi konumu ve yüzey şekilleri nedeniyle çok çeşitli iklim türleri ve buna bağlı olarak çok çeşitli bitki ve hayvan türlerine ev sahipliği yapmaktadır. Bu türlerden biri olan ve genelde Doğu Avrupa ülkelerinde yayılış gösteren, en yaygın yetişme alanlarından biri olan Anadolu coğrafyasında da Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinde yayılışı yoğunlaşan bir tür olan Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) Türkiye ibreli ağaçları arasında %36 gibi bir oranla çok büyük bir paya sahiptir. Tarım bitkilerinde halen uygulanmakta olan doku kültürü tekniklerinin, gerek mobilya, gerek kimya, gerek ilaç, gerekse yakıt amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılan orman ağaçlarında kullanımı çok yenidir. Ormanların kendilerini doğal olarak yenileyebilme ve çevre toleranslarının geniş olması, fakat zamanla korunmadıkları takdirde tükenen ve üretilmesi gereken bitkiler olmaları, geliştirilmek istenen bu *in vitro* doku kültürü tekniklerinin önemini ortaya koymaktadır.

Yüksek lisans çalışmamda bu türün doğal ortamda yetişme süresinden daha kısa sürede yetiştirebilmek, kullanılan ve geliştirilen yöntemlerin daha verimli genotiplerin seçilimi ve üretiminde kullanılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın her aşamasında her türlü ilgi, bilgi, deneyim ve desteğini benden esirgemeyen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak da çalışmalarımda her zaman yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1 <i>Pinus brutia</i> 'nın Sistematik Bilgileri	4
2.2. Kızılçam'ın (<i>Pinus brutia</i> Ten.) Ekolojik İstekleri	5
2.3. Kızılçam'ın (<i>Pinus brutia</i> Ten.) Morfolojik Özellikleri ve Biyolojisi	6
2.4. Kızılçam'ın (<i>Pinus brutia</i> Ten.) <i>In vitro</i> Çoğaltılması İle İlgili Çalışmalar	9
3. MATERYAL VE METOD	12
3.1. Bitki Materyali	12
3.2. Deneylerde Kullanılan Besin Ortamlarının Hazırlanması.....	14
3.3. Sürgün Gelişimi İçin Yapılan Deneyler	16
3.3.1. Giberellik asit miktarının sürgün gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi	16
3.3.2. Giberellik asit uygulamaya başlama zamanlarının sürgün gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi	17
3.3.3. Besin ortamında bulunan makroelement miktarlarının sürgün gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi	17
3.3.4. Kazeinin sürgün gelişimi üzerinde etkisinin belirlenmesi	18
3.3.5. Verilerin toplanması ve analiz edilmesi	18
4. BULGULAR.....	19
4.1. Giberellik Asit Miktarının Sürgün Gelişimi Üzerindeki Etkisi.....	19
4.2. Giberellik Asit Uygulamaya Başlama Zamanlarının Sürgün Gelişimi Üzerindeki Etkisi.....	20
4.3. Besin Ortamında Bulunan Makroelement Miktarlarının Sürgün Gelişimi Üzerindeki Etkisi.....	25
4.4. Kazeinin Sürgün Gelişimi Üzerinde Etkisinin Olup Olmadığının Belirlenmesi.....	26
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ	30
7. KAYNAKLAR	31
8. EKLER.....	37
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

BAP	6-benzilaminopurin
CH	Casein hydrolysate
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
GA ₃	Gibberellik Asit
HCl	Hidroklorik asit
IBA	Indol butirik asit
L	Litre
m	Metre
M	Mol
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimol
NaOH	Sodyumhidroksit
TDZ	Thidiazuron
UV	Ultraviyole
w	Watt
WPM	Woody Plant Medium besin ortamı
WV3	Westvaco 3 besin ortamı
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
µM	Mikromol

% Yüzde

Kısaltmalar

BBD	Bitki büyüme düzenleyicileri
DCR	Douglas fir cotyledon revised besin ortamı
GD	Gresshoff & Doy besin ortamı
L.	Linnaeus
½ MS	Yarım kuvvet MS
Mill.	Miller
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
NAA	Naftelen asetik asit
Ten.	Tenore
Thunb.	Thunberg
SH	Schenk ve Hildebrandt besin ortamı
Sm.	Smith
vb.	Ve benzeri
vd	Ve diğerleri
Var.	Varyete

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 Kızılçam Anadoludaki Dağılışı (EUFORGEN 2009)	4
Şekil 2. 2 Kızılçamın Gövde ve Kabuk Yapısı	6
Şekil 2. 3 Kızılçam İbre ve Kozalakları (Genç 2009).....	7
Şekil 2. 4 Kızılçam Kozalakları ve Ağaçtaki Pozisyonları	8
Şekil 2. 5 Kızılçam Tohumları	8
Şekil 3. 1 Kızılçam Tohumlarının Sterilizasyona Hazırlanması	12
Şekil 3. 2 Megagametofitlerin Kabuklarından Ayrılması	13
Şekil 3. 3 Çimlenme Besin Ortamına Alınan Megagametofitler	13
Şekil 4. 1 Giberellik Asit Miktarının Sürgün Oluşumuna Etkisi	20
Şekil 4. 2 Sürgün Uyartım Aşamasındaki Kotiledonlar ve Kotiledon Üzerinde Oluşan Sürgünler	20
Şekil 4. 3 GA ₃ uygulamasının sürgünler üzerindeki etkisi.....	21
Şekil 4. 4 Haftalar Bazında Sürgün Ortalamaları.....	22
Şekil 4. 5 Uygulamalar Bazında Sürgün Ortalamaları.....	23
Şekil 4. 6 Makroelement Oran Değişimlerine Göre Sürgün Ortalamaları.....	25
Şekil 4. 7 Kazein Uygulaması Sürgün Ortalamaları	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1 Besin Ortamlarında Kullanılan Bileşenler ve Kullanılan Miktarları	14
Çizelge 3. 2 Makroelement Uygulama Miktarları ve Uygulanma Şekilleri	17
Çizelge 4. 1 Çizelge 4.1. Giberellik Asit Deneyinin Tek Yönlü Varyans Analizi.....	19
Çizelge 4. 2 Giberellik Asit Uygulamaya Başlama Zamanı Deneyinin Tek Yönlü Varyans Analizi	21
Çizelge 4. 3 Haftalar ve Uygulamalar Bazında Sürgün Ortalamaları	25
Çizelge 4. 4 Makroelement Deneyinin Tek Yönlü Varyans Analizi	26
Çizelge 4.5 Kazein Deneyinin Tek Yönlü Varyans Analizi.....	26

1. GİRİŞ

Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.), Pinophytina bölümünün, Coniferae sınıfına ait Coniferales takımının Pinaceae ailesi içinde sınıflandırılmaktadır. Kızılçam genel olarak kuzey yarımkürenin kabaca 15-45 doğu boylamları 32-45 kuzey enlemleri arasındaki bölgede doğal olarak yayılan bir türdür. Bu sınırlar içinde en batı ucu Kalabriya yarımadası, en doğu noktası ise Irak'ın kuzeyindeki Zavita-Atrush bölgesidir. Ülkemiz kızılçam ormanlarının %47'lik bir bölümü Akdeniz Bölgesinde bulunmaktadır. Toros Dağları'nın denize bakan yamaçlarında yoğunlaşmıştır. Kısa mesafelerde rakımı hızla yükselen bu dağ grubu, kızılçamın kıydan uzaklaşmasını engellemektedir. (Öktem 1987) Sıcaklık isteği yüksek, donlara hassas ve karasal iklimlerden kaçınan bir türdür. Kızılçam kuzey bakılarda 0-600 m, güneyde 0-1400 m rakımlarda yer almaktadır. Işık gereksinimi fazla olan kızılçam, yayılış alanlarında güneş radyasyonunun çok olduğu güney bakılarda, kuzey bakılara oranla daha yükseklerde yayılış göstermektedir.

Gövde yapısı genelde düzgün, dış kabuk kırmızımsı kahverengidir. Kozalaklar 6-11cm boyunda ve topaç şeklindedir. Türkiye ibreli ormanlarının yaklaşık olarak % 25 sını kaplayan ve hızlı büyüme özelliğiyle bilinen bir türdür (OAE 1987, Kayacık 1965). Bu özelliği nedeniyle DPT (1995) tarafından ıslah çalışmaları öngörülen beş orman ağacı arasında ilk sırada yer alır. Orman Ağaçları ve Tohum Islah Araştırma Enstitüsü tarafından fenotipik olarak üstün kabul edilen anaç ağaçlar seçilerek 68 adet kızılçam tohum bahçesi kurulmuştur (2010 yılı Çalışma Raporu itibariyle). Tohum bahçelerinin kurulmasındaki amaç yeni kurulacak plantasyonlarda bu tohum bahçelerinden elde edilecek üstün nitelikli tohumların kullanılarak odun hammadde üretiminin arttırılmasıdır. Kızılçam odunun özellikleri kağıt endüstrisi için oldukça uygun bir yapıdadır. (Bektaş vd 1999). Diğer ara ürünler dahi teknolojik bakımdan kağıt endüstrisi için uygun özelliklere sahiptir. Türkiye'de doğal çam türleri arasında özgül ağırlığı en yüksek olan türdür. Saf kızılçam odunu kullanılarak üretilen yonga levhalardan iyi sonuçlar elde edilmiştir. Kızılcamın odunu inşaat malzemesi, ambalaj kutuları, kablo direkleri, maden direği, çit kazığı, taban döşemesi, travers, tarım aletleri, mobilya yapımında kullanılmaktadır (Bozkurt 1971, Kayacık 1980). Kereste olarak oldukça uygun miktarlarda talep görmekte, ambalaj sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Odununun çok çeşitli kullanım alanlarına uygun olması nedeniyle kızılçam kullanım değeri oldukça yüksek olan bir türdür (Ürgeç 1998).

Diğer taraftan ülkemizde bu denli büyük alanlarda yayılış gösteren kızılçam ormanları büyük toprak tutma yeterliliği sayesinde erozyonla mücadele, bol oksijen üretimi, yakıt olarak kullanımı, mobilya ve kağıt sanayisi için de en büyük hammadde kaynağı olarak yerini alır. Fakat bunun yanında kontrol edilemeyen orman yangınları, bilinçsiz olarak tarla ve arazi açılması, bilinçsiz, kontrolsüz ve plansız şehirleşme, aşırı otlatma ve sanayi üretimi maksatlı aşırı kesimler sonucunda çok büyük tahribata uğramaktadır.

Kızılçamın tohumla üretimi ise hayli uzun bir süreç gerektirmektedir. Kızılçamlar genel olarak 4-5 yaşından itibaren normal gelişmiş kozalak verebilmektedirler. Yöre ve rakıma bağlı olarak değişmekle birlikte her yıl veya her 2-3 yılda bir tohum veriminin bol olduğu gözlenebilir. Tohumlar ağaç üzerinde 3-4 yıl kalabilmektedir. Hasat, tohumun dikili ağaç üzerinden toplanması şeklinde olur. Kızılçam kozalakları geç ve güç açılırlar, bu yüzden güneşe sererek ve üzerlerine ara ara su serperek açılmayı hızlandırmak gerekir (Saatçioğlu 1971).

Genel olarak kızılçam tohumunda kabuktan kaynaklı bir çimlenme engeli bulunmaktadır. Bu nedenle tohumlar çimlenme öncesinde 45 gün soğuk-ıslak katlamaya alınır ve derişik sülfürik asitle muamele edilir. Bu şekilde çimlendirilen tohumların çimlenme yüzdeleri genelde %27-99 aralığında gerçekleşmektedir (Aslan ve Uğurlu 1986).

Tohumdan direkt çoğaltma yönteminin yanında doku kültürü metotlarının orman ağaçlarında kullanılması tarım bitkilerine göre çok yenidir. Bunun başlıca nedeni ormanların yıllarca kendisini doğal olarak yenileyebilen kaynaklar olarak görülmesidir. Artık orman ağaçları da, korunmazlarsa tükenen ve üretilip çoğaltılması gereken bitkiler olarak ele alınmaktadır.

İlk çalışmalardan bu yana mikroüretim teknikleri birçok angiosperm ve gymnosperm ağaç türleri için geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Şu anda, yaklaşık 70 yapraklı ve 30 ibrelili ağaç türü için başarılı protokol geliştirilmiştir (Thorpe ve Harry 1990) Günümüzde kızılçam'ın halen devam etmekte olan ıslah çalışmalarına ek olarak mikroüretim tekniklerinin geliştirilmesi, elde edilen veya edilecek olan üstün genetik

özellikli bireylerin süratle çoğaltılmasına katkıda bulunacaktır. Türkiye’de, kızılçamın direkt veya indirekt organogenesis metotları kullanılarak *in vitro* üretimi konusunda yapılmış olan uluslararası literatüre girmiş herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sadece 1985 yılında İngiltere’de, Irak’tan tek bir kaynaktan toplanan tohumlar kullanılarak yapılmış bir çalışma mevcuttur (Abdullah vd 1985). *In vitro* olarak çoğaltma sisteminin kızılçamda geliştirilmesi ve optimize edilmesi, bu alanda diğer ağaç türleri üzerinde yapılacak uygulamalar için önemli bir bilgi birikimi sağlayacaktır.

Çalışmalarımız öncesi yapılan literatür taramasında farklı ağaç türleri ve bazı dikotiledon (özelikle sebze türlerinde) bitkilerde sürgün gelişimini hızlandırmak ve desteklemek amacıyla giberellik acid (GA_3) kullanıldığı ve başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. GA_3 normalde bitkilerde çiçek oluşumu, tohum büyümesi ve meyve gelişimini hızlandırıcı etkiye sahip organik bir bileşendir. Aynı zamanda bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovül kültürlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca bitkilerde gövdenin uzamasını ve çiçeklenmeyi artırır.

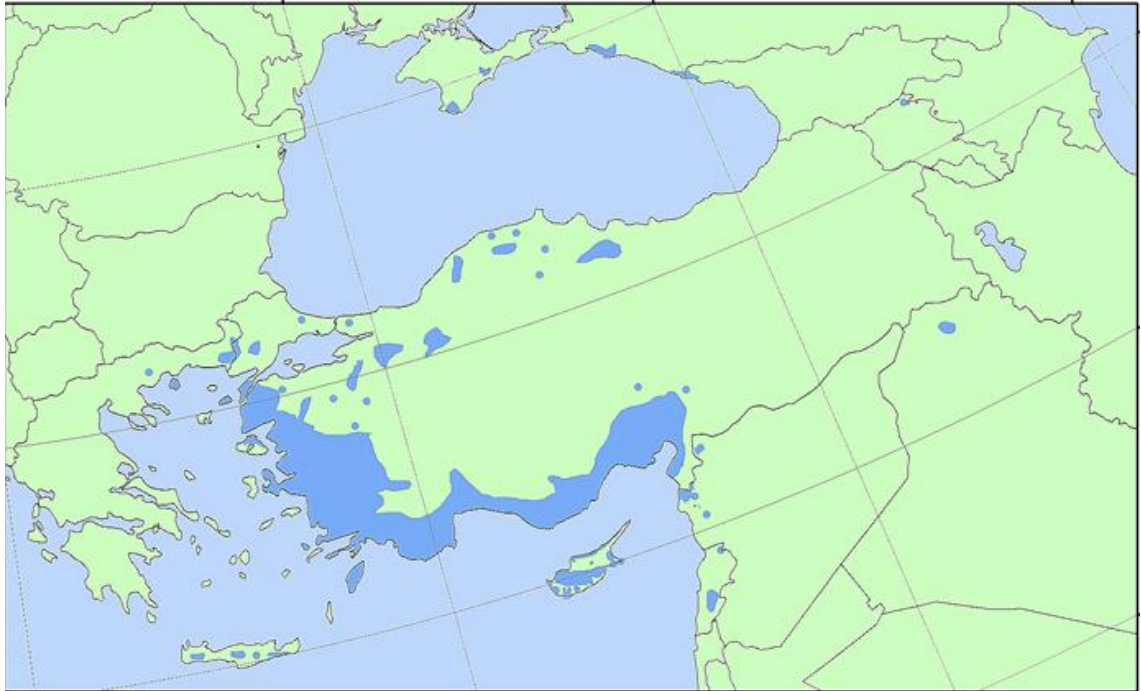
1926 yılında Japon bilim adamı Kurosawa tarafından keşfedilen GA_3 , bitkilerin çok çabuk uzayarak köklerinin zayıflamasına neden olan “aptal fide hastalığı” üzerinde yaptığı çalışmalarda mantarla hastalanan bitkilerde gibberellin adı verdiği maddenin çok fazla arttığını tespit etmiş ve bu mantarı *Gibberella fujikuroi* adını vermiştir. Kimyasal yapıları farklı olan 70 kadar gibberellinden en yaygın olarak kullanılan GA_3 (giberellik asit)’tür. Diğer sayılan etkilerinin yanında tohum çimlenmesini de teşvik edici etkisi bulunmaktadır (Karssen 1995, Karssen vd 1989, Sharma vd 2004). GA_3 çimlenmekte olan tohumlarda α -amilaz ve diğer hidrolitik enzimler ile büyüme ve gelişme için gerekli olan yapısal proteinlerin sentezini arttırarak çimlenmeyi sağlar. Tohum çimlenmesi sırasında embriyoda sentezlenen GA_3 , çimlenme olayının başlayabilmesi için endospermdeki nişastayı şekerlere dönüştürebilen α -amilaz enziminin sentez ve aktivasyonunu arttırarak tohum rezervlerinin harekete geçmesini sağlamaktadır (Fincher 1989). Şu ana kadar GA_3 , kazein (casein hydrolysate) ve makroelement oranlarının kızılçamın *in vitro* olarak çoğaltılmasında kullanıldığına dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı Kızılçam’da direkt organogenez yöntemi ile çoğaltılmasında GA_3 ’ün, kazeinin ve makroelementlerin değişik oranlarının sürgün gelişimi ve elde edilen sürgün sayısı üzerindeki etkilerini belirlemektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMASI

2.1 *Pinus brutia*'nın Sistematik Bilgileri

Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) sistematikte Magnoliaphyta bölümü, Pinophytina alt bölümü, Coniferae sınıfı, Pinidae alt sınıfı, Coniferales takımı, Pineceae ailesi ve *Pinus* cinsi içerisinde yer alan bir türdür (Davis 1965). Dünya’da en yaygın olarak Doğu Akdeniz’de yayılış göstermekle birlikte ülkemizde en çok Marmara, Ege ve Akdeniz bölgeleri ile birlikte lokal olarak Karadeniz bölgesinde de görülmektedir. (Şekil 2.1) Genel olarak 0-1000 m yüksekliklere kadar yer bulan bir türdür. Ülkemizde doğal olarak yetişen *Pinus* cinsine ait türler şunlardır (Öner ve Buğday 2005):

1. *Pinus brutia* Ten. (Kızılçam)
2. *Pinus nigra* J. F. Arnold (Karaçam)
3. *Pinus pinea* L. (Fıstık çamı)
4. *Pinus halepensis* Mill. (Halep çamı)
5. *Pinus sylvestris* L. (Sarıçam)



Şekil 2.1 Kızılçam Anadolu’daki Dağılışı (EUFORGEN 2009)

2.2. Kızılçam'ın (*Pinus brutia* Ten.) Ekolojik İstekleri

Kızılçam Batı Karadeniz, Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgelerinde sahile kadar inebilmektedir. Üst sınır ise güneyden kuzeye gidildikçe azalmaktadır. Bulunduğu bölgelerde dağların genel olarak denize kıyısı olan tarafları seçer. Işığın bol, buna karşın büyüme döneminde suyun kıt olduğu kızılçam ormanlarında daha serin ve daha nemli olan kuzey bakılarda yetişen kızılçamlardan daha iyi bir gelişme gösterdikleri belirlenmiştir (Zech ve Çepel 1972).

Kızılçam Akdeniz iklim bölgesinin ılıman ve sıcak iklim bölgelerinin bir ağacıdır ve bu bölgelerde iklim optimumunda bulunur. Kızılçam sıcaklık isteği yüksek olan ve dondan ender etkilenen bir türdür. Yayıldığı bölgelerde yıllık sıcaklık ortalaması 10-25 °C arasında değişmektedir. 1 ve 2 yaşındaki kızılçam fidanları, ocak ayında -14 °C kadar düşen sıcaklıklardan etkilenmeden sağlıklı büyümelerine devam edebilmektedirler (Özyiğit 1974).

Kızılçam ağaç türünün yayıldığı bölgelerin en başta gelen yağış özellikleri, yağışların yıl içerisinde düzensiz oluşu ve yağışın genellikle sağanaklar biçiminde düşmesidir. Örneğin, Batı Akdeniz bölgesinde yağışların yarıdan fazlasının (%65) kış aylarında düşmesine karşılık yaz aylarında düşen yağışların oranı toplam yağışın %2'si kadardır (Çölaşan 1960). Sonuçta ekolojik açıdan önemli ve sınırlayıcı durumlardan birincisi kızılçam ormanlarında 3-5 ay süren şiddetli bir kuraklık döneminin varlığıdır. İkincisi ise oldukça yüksek sayılabilecek yıllık yağış miktarının çok kısa bir dönemde (Ekim-Nisan aralığı; yaklaşık 930 mm) şiddetli sağanaklar şeklinde düşmesidir.

Tipik bir ışık ağacı olan kızılçamın tohumlarının çimlenme yüzdesi üzerinde ışığın belirgin bir olumlu etkisinin olduğu saptanmıştır. Gençlikte daha az ışıkla yetinen kızılçamın ışık isteği yaşlandıkça artar. Özellikle ilk yıllarda ışık kızılçamın büyümesi üzerinde etkili olmaktadır. Toprak konusunda son derece kanaatkar olan kızılçam hemen her toprakta yetişebilme yetisine sahiptir. Kökün madeni toprağa ulaşmasına izin veren bir yarık, kızılçamın kayalık arazilerde bile yetişmesi için yeterlidir (Hoffman 1939). Kızılçam, yayılış alanındaki başlıca orman tahrip faktörü olan yangınlara karşı da uyum sağlamış bir türdür (Neyişçi 1987, Thanos ve Marcou 1991). Bu özellikleriyle kızılçam “tanrının Türk ormancısına lütfettiği bir ağaç türü” olarak nitelendirilmiştir (Saatçioğlu 1976).

2.3. Kızılçam'ın (*Pinus brutia* Ten.) Morfolojik Özellikleri ve Biyolojisi

Pinaceae familyasına dahil olan Kızılçam 20-25 m boy ve 60 cm'ye kadar çap yapabilen, kalın dallı ve genellikle düzgün olmayan gövdeye sahip önemli bir orman ağacıdır (Şekil 2.2). Kızılçamda genç sürgünler tüysüz, çoğunlukla önceleri kırmızımsı daha sonraları ise yeşilimsi kahverengi, nadiren de kurşuni boz renklidir. Bu tür, ismini taze sürgünlerinin kırmızı renginden alır.



Şekil 2.2 Kızılçamın gövde ve kabuk yapısı



Şekil 2.3 Kızılçam ibre ve kozalakları (Genç 2009)

Gençlikte sivri yapıdaki tepe ve boz renkli düzgün yüzeyli kabuk ileri yaşlarda geniş dağınık tepeli ile derin çatlaklı esmer kırmızımsı renkli kalın kabuğa dönüşür. Düzgün dalları gövdeden dik bir açıyla çıkarlar ve uçlarında genellikle kısa sürgünler bulunur. Tomurcuklar genel olarak yumurta biçiminde ve 15-20 mm uzunlukta olup tomurcuk pulları aşağı yöne bakar ve kenarları kirpiklidir (Şekil 2.3). İğne yapraklar 10-18 cm ve daha yukarı boyutlarda olup yumuşak yapıda ve açık yeşil renkte, kenarları ince dişlidir. Çok kısa saplı kozalaklar bir arada dik durumlu veya yatık halde bulunurlar ve hiçbir zaman sürgün üzerinde eğik olarak durmazlar (Şekil 2.4) (Davis 1965, Gökmen 1973, Kayacık 1980, Selik 1963).



Şekil 2.4 Kızılc m kozalakları ve ağaçtaki pozisyonları

Kızılc m bir cinsli, tek evcikli, tozla ması rüzgarla olan bir a a  türüdür. Erkek  i ek tomurcukları mart-nisan ayı ba larında  i meye, bir hafta sonra tomurcuklar patlamaya ve 7-10 gün sonra da tomurcuk pulları dökülmeye ba lar. Bunu takiben 10-15 gün sonra polen sa ımı ba layarak 15-20 devam ettikten sonra rakıma bağlı olarak Nisan –Mayıs aylarında sona erer (Alpacar 1981). Döllenme olayı 13-14 ay sonra meydana gelir. Konelet (kozalak ık) renginin kahverengiden boz ye ile dönmeye ba laması döllenmenin belirtisidir. Kozalak ve tohum 2 yılda olgunla ır. İlk yıl Temmuz Ağustos aylarında kozalaklar bir ya ında ve fındık b y kl  ndedir. İki yaşındaki kozalaklar parlak kiremit kırmızısı rengindedir.    yaşındaki kozalaklar ise normal büyüklükte, kırmızı renkte ve güneşe bakan tarafları boz renktedir (Genç 2009).



Şekil 2.5 Kızılc m tohumları

2.4. Kızılçam'ın (*Pinus brutia* Ten.) *In vitro* Çoğaltılması İle İlgili Çalışmalar

Pinus türleri ile ilgili çalışmalardan; *Pinus pinaster* (Ait). türünde adventif sürgünden üretim teknikleri denenmiştir (Calixto ve Pais 1996). *Pinus heldreichii* (Christ.) türünde aksiller sürgün üretiminde sitokinin etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur (Stojicic ve Budimir 2004). Ancak *P. brutia* türüyle ilgili literatürde çok az sayıda çalışma olmakla birlikte *in vitro* çoğaltımı konusundaki tek çalışma Abdullah, Grace ve Yeoman'ın 1985'de yaptığı araştırmada mevcuttur. Bu çalışmada kızılçamdan alınan embriyo ve kotiledon eksplant olarak kullanılmış ve *in vitro* koşullarda SH besin ortamında adventif sürgün üretimi sağlanmıştır. Daha sonra Yıldırım (2011) tarafından yapılan bir çalışmada daha önce yapılan bir çalışmada (Abdullah vd 1985) kullanılan SH, GD besin ortamlarına ilave olarak DCR, WV3 ve LM besin ortamları olmak üzere beş farklı ortam test edilmiştir. Bunların içerisinde en yüksek sürgün ortalamasına DCR besin ortamında ulaşılmış ve bu besin ortamının kızılçamın sürgün gelişimi için en uygun besin ortamı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada sürgün uyartımı için yapılan testlerde de 3mg/L BAP'ın sürgün uyartımı için en uygun konsantrasyon olduğu tespit edilmiştir.

Bitki rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan teknikler arasında Giberellik asit (GA_3) kullanımı da mevcuttur. GA_3 , salgılanan bitkide çiçek oluşumu ve meyve büyümesinde etkilidir. Aynı zamanda *in vitro* çalışmalarda meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılmasında, sürgünlerin boylarının uzatılmasında, embriyo ve ovül kültürlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca bitkilerde gövdenin uzamasını ve çiçeklenmeyi artırır.(Babaoğlu vd 2001)

Pinus türleri dışında dikotil bitkilerde de GA_3 'ün kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan biri Saharan (2010) 0.2mg/L GA_3 ilaveli besin ortamında *Asparagus officinalis* L. türünde optimal sürgün uzamasını elde ettiği çalışmadır. Diğer bir çalışmada *Jatropha curcas* L. türünde çalışan Purkayastha vd (2010) partikül bombardımanı yöntemiyle gen transferi yaptıkları bitkide en iyi sürgün uzamasını 0.5 μ M GA_3 ilave edilmiş besin ortamından elde etmişlerdir.

Elwan (2009) *Capsicum annuum* L. üzerinde yaptığı çalışmada en yüksek sürgün uzamasını 14.43 μ M GA_3 kullanarak elde etmiş ve yine bu konsantrasyon ile sürgün sayısı ve bunu takip eden köklendirme deneyinde de kullanılan diğer

konsantrasyonlardan daha iyi bir sonuç elde etmiştir. Negi vd (2008) çilek bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada en yüksek sürgün uzunluğu ve en yüksek sürgün sayısı ortalamasına 0.5 mg/L IBA ve 1.0mg/L GA₃ konsantrasyonunda ulaşmışlar.

Ağaçlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise Joshi vd (2002) *Eucalyptus tereticornis* (Sm.) türünde yaptıkları araştırmada MS besin ortamında uyguladıkları 1.0 mg/L BAP ve 0.04 mg/L GA₃ uygulaması ile optimal sürgün gelişimini elde etmişlerdir. Nas (2003) çalışmasında *Corylus avellana* L. türünde MS besin ortamında 10 mg/L GA₃ uygulaması ile en yüksek sürgün ortalamasını elde etmiştir. Vengadesan ve Pijut (2009) *Quercus rubra* L. üzerine yaptıkları çalışmalarında 4.4 µM BA, 0.29 µM GA₃ ve 500 mg/L CH uygulamalarıyla WPM besin ortamında en yüksek sürgün üretimini elde etmişlerdir.

Besin ortamında kullanılan BBD'ler kadar besin ortamını oluşturan makro ve mikroelementlerin de oranları çok önemlidir. Gerek sürgün uyartımı esnasında, gerekse uyartım sonrası safhalarda kullanılan bu makro ve mikroelementler sürgün gelişimi üzerinde oldukça etkili olmaktadır. Ancak kullanılan mikroelementler genellikle çalışmalarda sabit tutulmuş ve makroelementlerin oranları değiştirilerek sürgün gelişimleri izlenmiştir. Bu bileşen oranları testlerinde ise; Fadel vd (2010) *Mentha spicata* L. türü üzerinde yaptıkları çalışmada üç farklı besin ortamını (1/4, 1/2 ve tam kuvvet) test etmişler, en yüksek sürgün ortalamasını 1/2 MS ortamında elde etmişlerdir. Diğer bir çalışmada, Ganasan ve Huyop (2010) *Citrullus lanatus* Thunb. türünde yaptıkları çalışmada köklendirmeye aldıkları sürgünleri çeşitli BBD'ler eklenmiş 2 farklı konsantrasyondaki (1/2 ve tam) MS besin ortamında test etmişler ve en yüksek başarıya tam kuvvet MS ortamında ulaşmışlar. Başka bir çalışmada Hidayah vd. (2012) *Pogostemon cablin* (Patchouli veya paçuli) türü üzerinde yaptıkları çalışmalarda çeşitli BAP ve NAA (naftalin asetik asit) konsantrasyonlarını iki farklı MS ortamında (1/2 ve tam kuvvet) kullanmışlar ve besin ortamı testlerinde tam kuvvet MS besin ortamından elde edilen sürgün ortalamalarının 1/2 MS ortamına kıyasla daha uzun ve sayıca daha fazla oldukları tespit edilmiştir.

Kazeinin hidrolizi sonucu elde edilen ve yapısında aminoasit, tuz ve mineral maddeler bulunduran, doku kültürü çalışmalarında sürgün uzamasını destekleyici olarak kullanılan bir madde olan kazein hidrolizatın kızılçam üzerindeki etkileri de test edilmiştir. *Pinus radiata* türünde apikal meristemden tam bitki üretimi üzerine çalışan

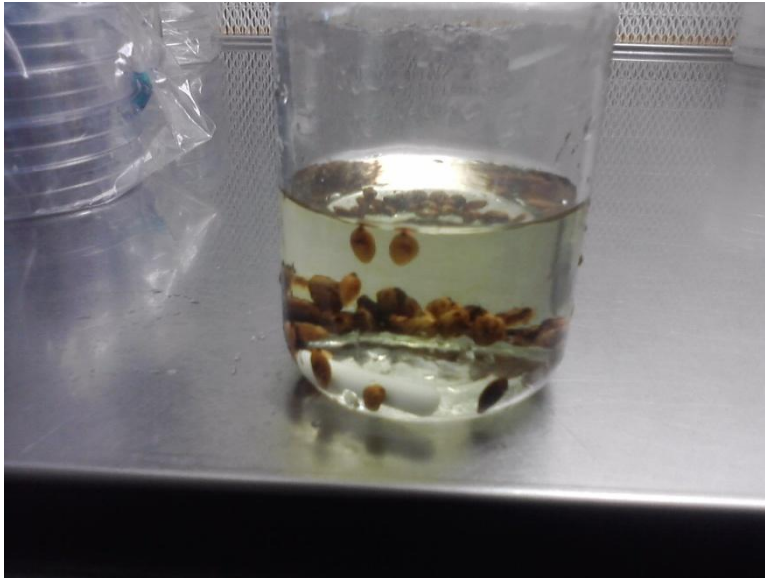
Prehn vd (2003), 30 mg/L CH konsantrasyonunda en yüksek sürgün ortalamasını elde etmişlerdir. *Pinus strobus* türünde yetişkin zigotik embriyolardan kallus kültürü ile rejenerasyon gerçekleştiren Tang ve Newton (2005) 500 mg/L CH uygulamasıyla en yüksek başarıyı elde etmişlerdir. *Populus tremula* türünde yapılan bir çalışmada sürgün rejenerasyonu çalışmasında, Vinocur vd (2000) 500 mg/L CH uygulaması ile en yüksek sürgün ortalamasını elde etmişlerdir. Vengadesan ve Pijut (2009) *Q. rubra* türünde yaptıkları araştırmada 500 mg/L kazein ile birlikte 4.4 µM BAP ve 0.45 µM TDZ (Thidiazuron) kombinasyonu ile maksimum sürgün verimi elde etmişlerdir. Diğer bir çalışmada Roy vd. (2004) çalışmalarında gül bitkisinin in vitro üretimi üzerinde 1.5mg/L BAP, 0.5 mg/L zeatin ve 100 mg/L CH'nin birlikte kullanımı ile en yüksek sürgün ortalamasını elde etmişlerdir.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Bitki Materyali

Bitki materyali olarak Antalya Asar bölgesinde bulunan Çameli-Göldağı orijinli kızılçam (*P. brutia* Ten.) klonal tohum bahçesinden toplanan tohumlar kullanılmıştır. Yapılan deneylerde 10 farklı klondan (ağaç) 10'ar gram alınarak oluşturulan tohum karışımı (bulk) kullanıldı. Boş tohumlar akan musluk suyu altında yüzdürme tekniği ile ayrıldıktan sonra 2-3 damla Tween-20 içeren seyreltilmemiş çamaşır suyu (ACE) ile 20 dakika süreyle sterilize edilmiş ve arkasından steril distile su ile 5'er dakika süreyle 3 defa yıkandı. (Şekil 3.1) Steril edilen tohumların kabukları forceps ve pens yardımıyla yatay hava akışlı kabin içerisinde açılarak embriyo içeren megagametofitler ayrıldı (Şekil 3.2).

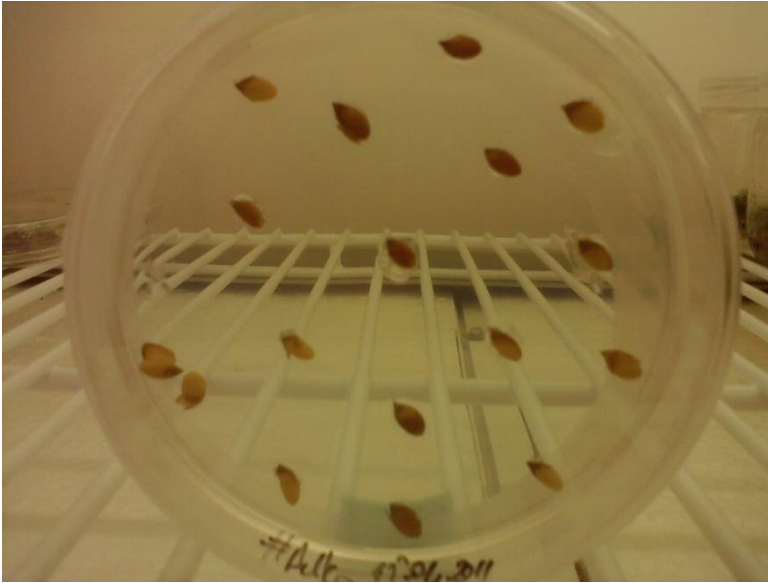
Daha sonra izole edilen megagametofitler ½ MS (Murashige ve Skoog 1962) besin ortamında çimlenmeye bırakıldı (Şekil 3.3). Çimlenen tohumların radikula uzunluğu 5-10mm uzunluğa ulaştığında yatay hava akışlı steril kabin içerisinde embriyolar megagametofitlerden ayrıldıktan sonra 2-4 mm uzunluğundaki kotiledonlar stereo mikroskop altında bistüri ile kesildikten sonra eksplant olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Kızılçam tohumlarının sterilizasyona hazırlanması



Şekil 3.2 Megagametofitlerin kabuklarından ayrılması



Şekil 3.3 Çimlenme besin ortamına alınan megagametofitler

3.2. Deneylerde Kullanılan Besin Ortamlarının Hazırlanması

Deneylerde DCR besin ortamı kullanıldı. Besin ortamlarında kullanılan stok solüsyonlar ve vitamin solüsyonları tabloda gösterildiği şekilde hazırlandı (Çizelge 3.1). Besin ortamlarının tümünde 30 g/L sukroz ve 7 g/L plant agar kullanılıp agar eklenmeden önce ortamların pH'ı 5.8 olarak 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl kullanılarak ayarlandı. Agar ilave edildikten sonra besin ortamları otoklavda 121°C de 20 dakika süre ile steril edildikten sonra yatay hava akışlı kabin içerisinde steril petri kaplarına (9 cm çaplı) döküldü. Stok besin ortamlarının hazırlamak için kullanılan tüm kimyasallar Duchefa Biochemie B.V. (Hollanda) firmasından temin edildi.

Çizelge 3.1 Besin ortamlarında kullanılan bileşenler ve kullanılan miktarları

İNORGANİK MADDELER (mg/L)	MS	DCR
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	556.00
KNO ₃	1900.00	340.00
NH ₄ NO ₃	1650.00	400.00
(NH ₄)H ₂ PO ₄	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.250
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00	370.00
K ₂ SO ₄	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	8.60
H ₃ BO ₃	6.20	6.20
KH ₂ PO ₄	170.00	170.00
NaH ₂ PO ₄	-	-
Na ₂ HPO ₄	-	-
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.250
CaCl ₂ .2H ₂ O	439.59	85.00
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025
NiCl ₂ .6H ₂ O	-	0.025
KCl	-	-
KI	0.83	0.83
Fe-EDTA		
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	27.80
Na ₂ EDTA	-	-
FeNaEDTA	36.70	37.30
VİTAMİNLER		
Myo-inositol	100.00	500.00
Nicotinic acid	0.50	0.50
Pyridoxine.HCl	0.50	0.50
Thiamine.HCl	0.10	1.00
Glycine	2.00	2.00

3.3. Sürgün Gelişimi İçin Yapılan Deneyler

Aşağıda ayrıntıları verilen deneylere başlanmadan önce eksplantların tümü sürgün uyartımı için 3 hafta süre ile 3 mg/L BAP (benzylaminopurine) içeren DCR besin ortamında tutuldu. Çimlenen bir tohumdan elde edilen kotiledonlar aynı petri kabına yerleştirildi. Bu sayı 7-12 arasında değişmektedir. Kültürlerin hepsi 23 ± 2 °C de 16/8 saat (aydınlık/karanlık) fotoperyotta kültür odasında tutuldu. Bu odada ışıklandırma için soğuk-beyaz 36 W flüoresan lambalar ışık şiddeti yaklaşık $50 \mu\text{m}^2/\text{s}$ olacak şekilde kullanıldı. Sürgün gelişimi için yapılan deneyler aşağıda sırasıyla 4 başlık altında açıklandı.

3.3.1. Giberellik asit miktarının sürgün gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Sürgün uyartımı sonrasında kotiledonlar literatür taramasına göre belirlenen kontrol, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 2.0 mg/L, 4.0 mg/L ve 8.0 mg/L GA ilave edilmiş DCR besin ortamlarına aktarılmış ve 12 hafta boyunca ilgili besin ortamlarında tutuldu (4 haftalık periyotlarla 3 alt kültür). Bütün GA uygulamaları her birinde 10 petri kabı olmak üzere 3 defa tekrarlandı. Deneylerde 3 tekrar halinde 10'ar petriden oluşan 6 uygulama için toplamda 180 adet petri kabı/kavanoz kullanıldı. 12 haftalık GA₃ uygulamasının sonunda elde edilen sürgün sayıları belirlendi.

3.3.2. Giberellik asit uygulamaya başlama zamanlarının sürgün gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

Bu deneylerde sürgün uyartımı sonrasında farklı zamanlarda başlanılan GA₃ uygulamalarının etkisi araştırıldı. Deneylerde kullanılan GA₃ konsantrasyonları literatür taramasına göre kontrol (0 mg/L), 0.1 mg/L, 0.5 mg/L ve 1.0 mg/L olarak belirlenmiştir.

Sürgün uyartımı sonrasında gruplar 3, 6, 9 hafta süreyle BBD içermeyen DCR besin ortamında tutulduktan sonra 12 haftalık GA₃ uygulamasına tabi tutuldu. Bu deneyde 10 petriden oluşan 4 grup olmak üzere 3 tekrar oluşturuldu ve toplamda 120 kavanoz kullanıldı.

3.3.3. Besin ortamında bulunan makroelement miktarlarının sürgün gelişimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi

Bu deneyde uyartım sırasında ve sonrasında besin ortamında bulunan makroelement miktarlarının sürgün gelişimi üzerindeki etkileri araştırıldı. Bunun için 5 farklı grup belirlendi, her bir grupta 8 adet petri kabı kullanıldı ve her deney 3 defa tekrar edildi. Besin ortamında kullanılan diğer bileşenlerin miktarları sabit tutuldu. Test edilen oranlar aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Makroelement uygulama miktarları ve uygulanma şekilleri

<u>Uygulama kodu</u>	<u>Uyartım sırasında</u>		<u>Uyartım sonrasında</u>
A	$\frac{1}{2}$	→	$\frac{1}{2}$
B	$\frac{3}{4}$	→	$\frac{3}{4}$
C (kontrol)	1	→	1
D	1	→	$\frac{1}{2}$
E	1	→	$\frac{3}{4}$

3.3.4. Kazeinin sürgün gelişimi üzerinde etkisinin belirlenmesi

Bu deneyde uyartım sonrasında kazein (casein hydrolysate) kullanılmasının sürgün gelişimi üzerindeki etkileri araştırıldı. Deneylerde kontrol (0 mg/L), 100 mg/L ve 500 mg/L olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda kazein kullanıldı ve deneyler 3 defa tekrar edildi. Bu deneyde 10 petriden oluşan 3 grup ve her grubun da 3 tekrarı yapılarak toplam 90 petri kabı kullanıldı.

3.3.5. Verilerin toplanması ve analiz edilmesi

Yapılan deneylerin sonunda bir eksplant üzerinde meydana gelen 1cm'den uzun sürgünler sayılarak kaydedildi. Elde edilen veriler GLM'e (General Linear Model) göre analiz edilmiş olup uygulamalar arasında istatistiksel önemde farklılıkların olup olmadığı ise Tukey's HSD çoklu karşılaştırma yöntemiyle belirlendi. Bütün istatistiksel analizler MINITAB 15 istatistik paket programıyla yapıldı.

4. BULGULAR

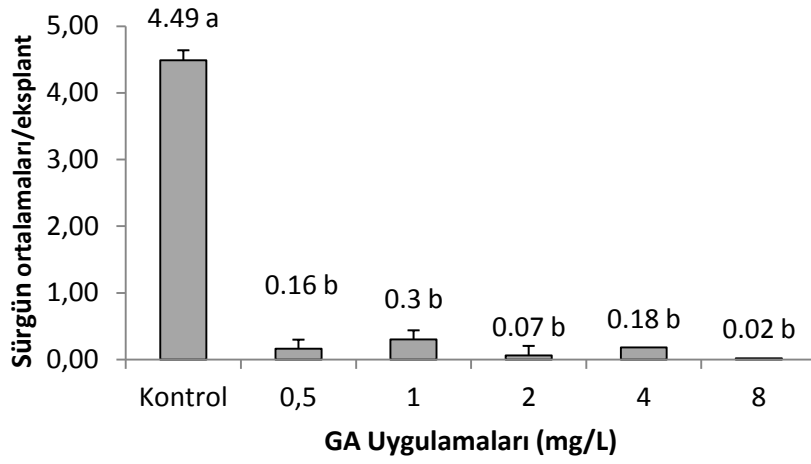
4.1. Giberellik Asit Miktarının Sürgün Gelişimi Üzerindeki Etkisi

Sürgün gelişimi gözlenen 928 eksplattan elde edilen genel sürgün ortalaması 1.35 olup bir kotiledondan en fazla 17 sürgün elde edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre test edilen GA₃ konsantrasyonları arasında istatistiksel önemde farklılıklar vardır (Çizelge 4.1).

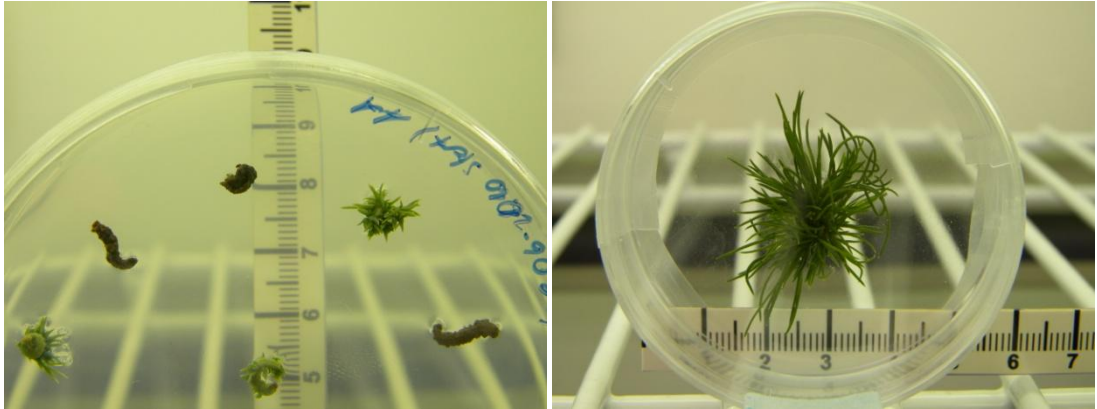
Çizelge 4.1 Giberellik Asit Deneyinin Tek Yönlü Varyans Analizi

Varyasyon kaynağı	sd	Kareler ortalaması	F değeri
Uygulama	5	448.53	145.61***
Hata	916	3.08	
sd: Serbestlik derecesi		***P<0.001	

Ortalama en yüksek sürgün sayısı 4.49 ile kontrol grubundan elde edilmiştir. GA₃ uygulandığında sürgün oluşumu ve gelişimi engellenmiş ve eksplant başına sürgün ortalamaları sırasıyla 0.16, 0.30, 0.07, 0.18 ve 0.02 şeklinde elde edilmiştir (Şekil 4.1). Tukey's HSD ile yapılan ikili karşılaştırmalarda kontrol grubunun tamamı GA₃ uygulamalarından farklı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1'de farklı harfi taşıyan ortalamalar $\alpha=0.05$ düzeyinde birbirinden farklıdır.). GA₃ uygulamalarından hiçbirisi bir diğerinden farklı değildir.



Şekil 4.1 Giberellik asit miktarının sürgün oluşumuna etkisi



Şekil 4.2 Sürgün uyartım aşamasındaki kotiledonlar ve kotiledon üzerinde oluşan sürgünler

4.2. Giberellik Asit Uygulamaya Başlama Zamanlarının Sürgün Gelişimi Üzerindeki Etkisi

Bu deneylerin tümünde sürgün gelişimi gözlenen 853 eksplanttan ortalama 1.86 adet sürgün elde edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına bakıldığında gecikme, GA₃ miktarı ve gecikme-GA₃ etkileşiminin istatistiksel olarak birbirinden farklı oldukları görülmektedir (Çizelge 4.2).

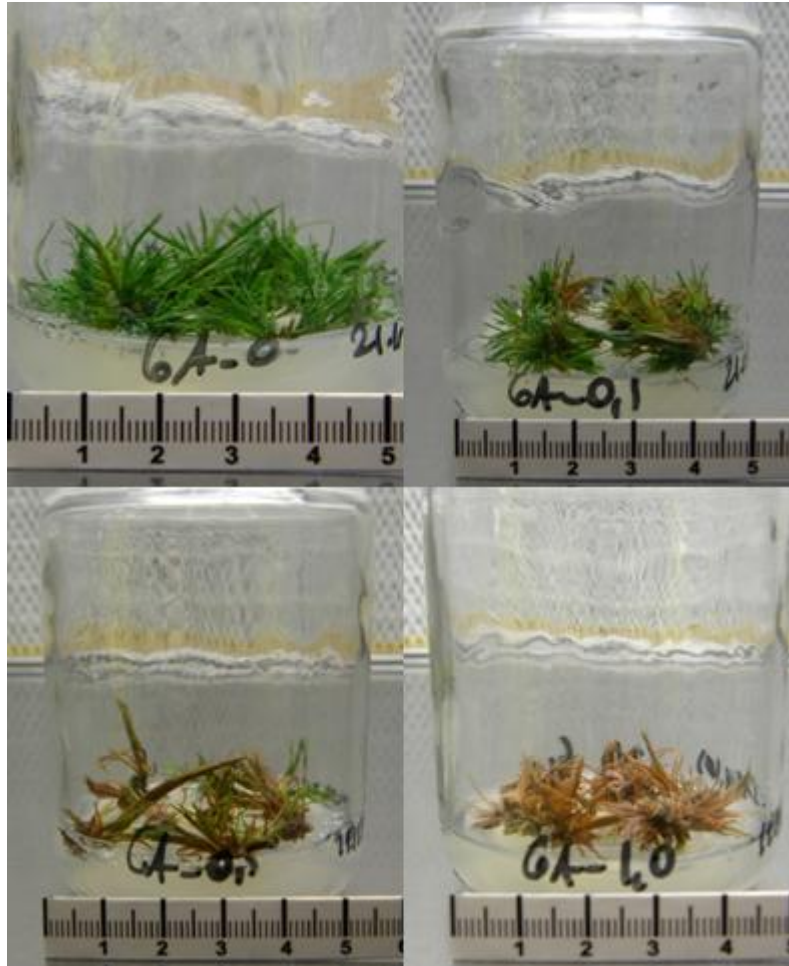
Çizelge 4.2 Giberellik asit uygulamaya başlama zamanı deneyinin tek yönlü varyans analizi

Varyasyon kaynağı	sd	Kareler ortalaması	F değeri
Gecikme	2	4.8437	9.62***
Uygulama	3	19.0326	37.79***
Gecikme*Uygulama	6	4.7913	9.51***
Hata	841		

sd: Serbestlik derecesi

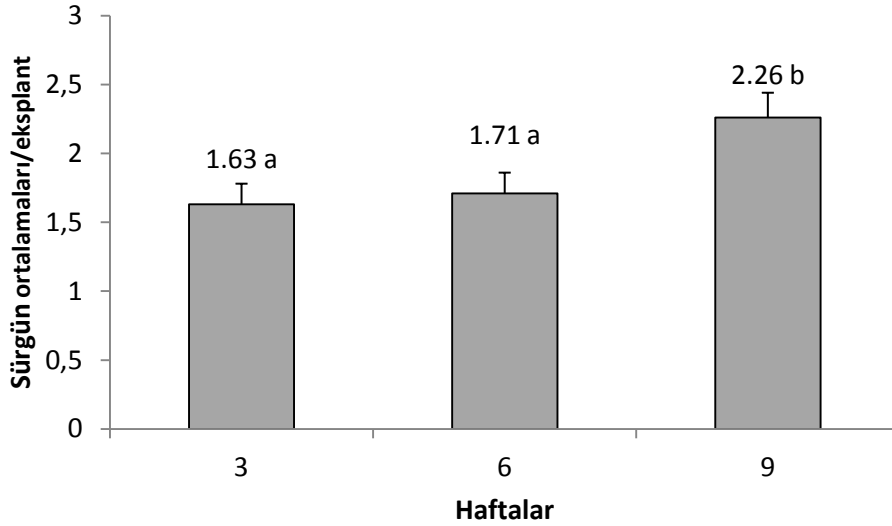
***p<0.001

Gecikmeli olarak uygulanan GA₃ oranları ve bunların sürgün gelişimi üzerindeki etkileri de Şekil 4.3'deki gibi gözlenmiştir. GA₃ konsantrasyonu artışı ile sürgün kayıpları da belirginleşmiştir.



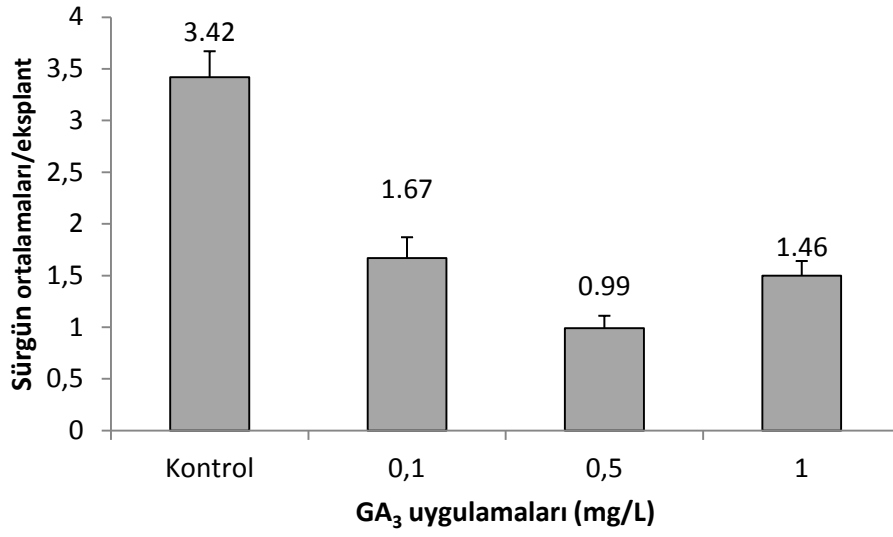
Şekil 4.3 GA₃ uygulamasının sürgünler üzerindeki etkisi

Gecikme zamanlarına bakıldığında GA₃ uygulamasına indüklemeden 9 hafta sonra başlandığında sürgün sayısının en yüksek ortalama olan 2.26'ya ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.4). Tukey HSD testinde 9 haftalık ortalama, 3 ve 6 haftalık gecikme sürelerinden elde edilen ortalamalardan $\alpha=0.05$ düzeyinde farklıdır.



Şekil 4.4 Haftalar bazında sürgün ortalamaları

Test edilen GA₃ konsantrasyonlarına bakıldığında en yüksek ortalama 3.42 ile kontrol grubundan elden edilmiştir. Test edilen GA₃ konsantrasyonları için ortalama sürgün sayıları 1.67, 0.99 ve 1.46 olarak bulunmuştur. Tukey's HSD ile ortalamalar ikili olarak karşılaştırılmalarına bakıldığında kontrol grubunun, bütün GA₃ uygulamalarından ve GA₃ miktarları arasında ise 0.5mg/L GA₃ uygulamasının diğer konsantrasyonlardan farklı olduğu görülmektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Uygulamalar bazında sürgün ortalamaları

Gecikme süreleri içerisinde GA₃ konsantrasyonlarının etkisine bakıldığında 3 haftalık gecikme dışında kontrol gruplarında ortalama sürgün sayılarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Tukey's HSD ile yapılan ikili karşılaştırmaların çoğunluğunun kontrol ile GA₃ uygulamaları arasında olduğu gözlemlenmektedir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Haftalar ve uygulamalar bazında sürgün ortalamaları

Haftalar	Uygulamalar	Sürgün ortalamaları ve standart hatalar	Grup benzerlik ilişkileri
3 Hafta	Kontrol	2.01 ± 0.37	ak
	0.1mg/L	3.12 ± 0.62	ac
	0.5mg/L	0.64 ± 0.14	bh
	1.0mg/L	1.65 ± 0.21	agh
6 Hafta	Kontrol	3.72 ± 0.38	ce
	0.1mg/L	0.72 ± 0.17	dhk
	0.5mg/L	0.78 ± 0.17	dfhk
	1.0mg/L	1.18 ± 0.19	adfh
9 Hafta	Kontrol	4.84 ± 0.50	e
	0.1mg/L	2.00 ± 0.33	afg
	0.5mg/L	1.61 ± 0.28	adfh
	1.0mg/L	1.49 ± 0.30	adfh

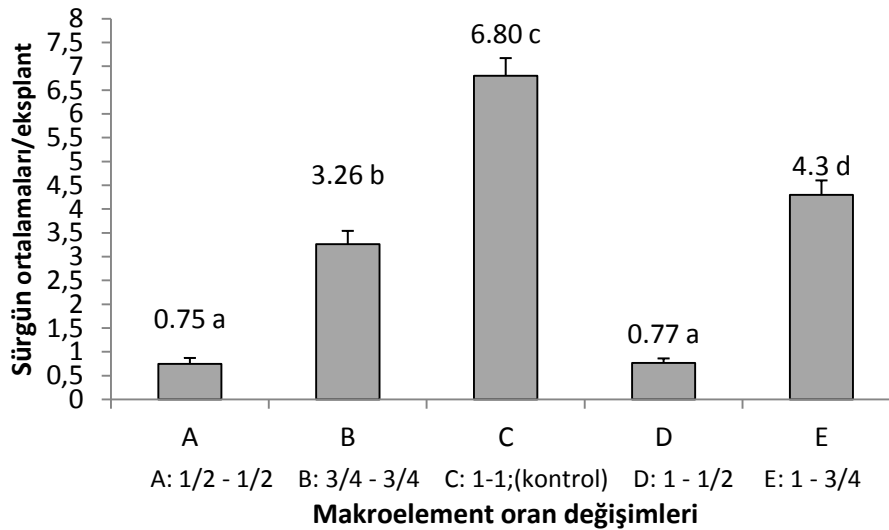
4.3. Besin Ortamında Bulunan Makroelement Miktarlarının Sürgün Gelişimi Üzerindeki Etkisi

Sürgün gelişimi gözlenen 1013 eksplattan elde edilen genel sürgün ortalaması 2.23 olup bir kotiledondan en fazla 19 sürgün elde edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre test edilen makroelement oranlarının, sürgün gelişiminde etkili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Makroelement oranları deneyinin tek yönlü varyans analizi

Varyasyon kaynağı	sd	Kareler ortalaması	F değeri
Uygulama	4	1346.9	99.86***
Hata	1008	13.5	
sd: Serbestlik derecesi		***P<0.001	

Her bir makroelement oranı uygulamasından elde edilen ortalama sürgün sayısına göre C uygulamasının (1-1; kontrol) en başarılı uygulama olduğu (6.8 sürgün/eksplant) ve bu sayıyı azalan sıra ile E, B, D ve A uygulamalarının izlediği görülmektedir (Şekil 4.6). Yapılan Tukey's HSD ikili karşılaştırma testine göre uygulama grupları arasında istatistiksel açıdan fark tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 Makroelement oran değişimlerine göre sürgün ortalamaları

4.4. Kazeinin Sürgün Gelişimi Üzerinde Etkisinin Olup Olmadığının Belirlenmesi

Sürgün elde edilen 454 eksplanttan ortalama 3.7 sürgün elde edilmiştir. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı 19 adet olarak sayılmıştır. Varyans analizi sonucuna bakıldığında test edilen uygulamaların istatistiksel düzeyde benzerlikleri yoktur (Çizelge 4.5). Uygulamaların ortalamalarına bakıldığında kontrol, 100mg/L kazein ve 500mg/L kazein için sırasıyla 3.89, 3.83 ve 3.42 adet sürgün elde edilmiştir (Şekil 4.7).

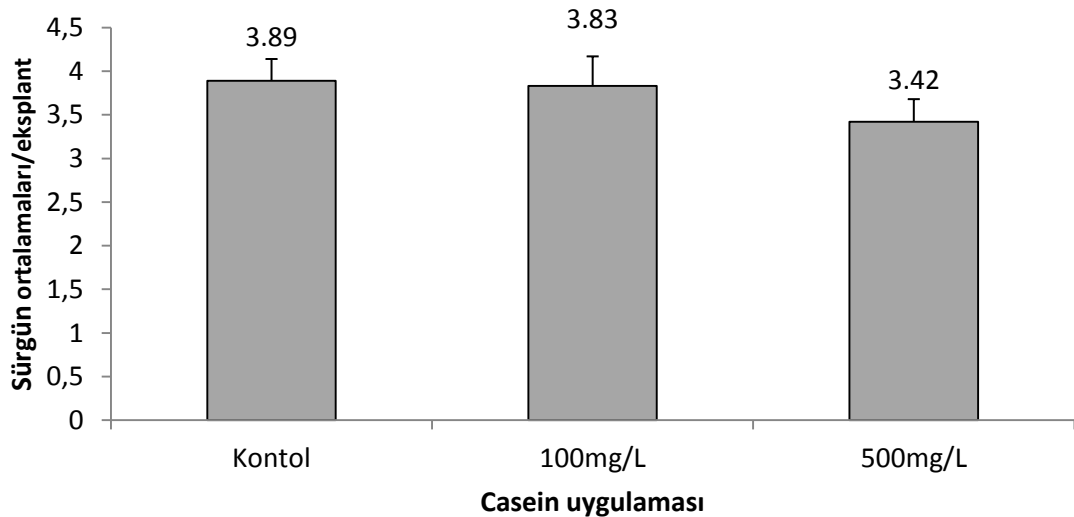
Çizelge 4.5 Kazein deneyinin tek yönlü varyans analizi

Varyasyon kaynağı	sd	Kareler ortalaması	F değeri
Uygulama	2	10.24	0.83fd
Hata	451	12.31	

sd: Serbestlik derecesi

fd:Farklı değil

Besin ortamında kullanılan kazein miktarı artışının çok az da olsa elde edilen sürgün sayısında düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Tukey's HSD çoklu karşılaştırma yöntemine göre kazein uygulamaları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli değildir.



Şekil 4.7 Kazein uygulaması sürgün ortalamaları

5. TARTIŞMA

Kızılçamda GA₃ miktarının sürgün gelişimi üzerindeki etkilerinin incelendiği bu deneyde en yüksek sürgün ortalaması kontrol grubundan elde edilmiştir. GA₃ uygulanan gruplara bakıldığında da en yüksek sürgün ortalaması 1 mg/L GA₃ konsantrasyonundan elde edildiği görülmüştür. GA₃ uygulamasının denendiği ağaçlar arasında *Morus cathayana* türü üzerinde çalışan Pattnaik ve Chand (1996) en iyi sonuca 0.2 mg/L ve 0.4 mg/L GA₃ konsantrasyonunda elde ettiği tespit edilmiştir. Yine benzer bir çalışmada Vengadesan ve Pijut (2008) *Q. rubra* üzerinde yaptıkları çalışmada 0.29 µM GA₃ ile en iyi sürgün verimine ulaşmışlardır. Nas (2003) *Corylus avellana* L. türünde sürgün uzaması için 10mg/L GA₃ kullanmış ve en uygun uzamayı elde etmiştir. Bir diğer çalışmada Joshi vd (2002) *Eucalyptus tereticornis* türünde yaptıkları araştırmada 1mg/L BAP ve 0.04 mg/L GA₃ konsantrasyonundan en iyi sürgün gelişimini elde etmişlerdir. Çalışmalarımızda bu araştırmalarda test edilen konsantrasyonlara bakılarak, bir alt ve üst sınır belirlenerek bir desen oluşturulmuştur. Bu aralık ilk aşamada 0 – 8.0 mg/L olarak tespit edilmiş, 1.0 mg/L üzerindeki GA₃ konsantrasyonlarda sürgün kayıplarının çok daha hızlı ve yoğun olduğu belirlenmiştir. Kızılçamda bu çalışma kapsamında yaptığımız deneylerin geneline bakıldığında ise GA₃ uygulamasının sürgün gelişimini olumsuz yönde etkilediği, gelişmiş sürgünlerin de karardığı ve öldüğü tespit edilmiştir. Çalışmalar neticesinde elde edilen veriler test edilen GA₃ konsantrasyonlarının Kızılçam'da direkt organogenesis yöntemiyle elde edilen sürgünlerin gelişiminde/uzamasında uygun olmadığını göstermektedir.

GA₃ uygulamaya başlama sürelerinin test edildiği çalışmada ise sürgün uyartımı sonrası GA₃ uygulamasına hemen geçilmesi ile uygulamaya geç başlama arasında fark olup olmadığı incelenmiştir. Literatürde benzer örneği olmayan bu çalışmada aynı zamanda daha önce gerçekleştirilen çalışmalardaki GA₃ konsantrasyonları nispeten başarılı aralığa çekilmiş (0.1 mg/L - 1.0 mg/L) ve uygulamaya başlanmadan önce belirlenen sürelerde BBD içermeyen besin ortamında bekletilmiştir.

Bekleme süresi deneyiyle sürgün gelişiminin başlamasının ardından GA₃ uygulamasının nasıl etki edeceği ve GA₃ uygulamasının sürgün gelişimini baştan mı, yoksa sürgünler geliştikten sonra mı etkilediği, ayrıca böyle bir durumda sürgünlerin kaçınıcı haftalarda bu uygulamadan etkilendikleri araştırılmıştır.

Çalışma sonunda en yüksek sürgün ortalaması kontrol grubundan elde edilmiş, GA₃ uygulamaları arasında da en iyi sonuç 0.1 mg/L GA₃ uygulamasından elde edilmiştir. Sürgünlerin uyartım sonrasında belli bir gelişmişlik göstermesinin ardından BBD içermeyen besin ortamında belirlenen sürelerde gelişmesi beklenmiş, ardından GA₃ uygulamasına tabi tutulmuş, ancak gelişim süresinin uzunluğuna bakılmaksızın GA₃ uygulamasının kızılçamda sürgün gelişimini olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. Haftalar bazında bakıldığında 3 ve 6 haftalık uygulamaların arasında fark olmadığı, ancak 9 haftalık uygulamanın bunlardan istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonunda GA₃ uygulamasına katılan eksplantların bekleme süreleri fark etmeksizin öldüğü, uzunlukları arasındaki farkların ise GA₃ uygulaması öncesi geçirdiği süreye bağlı olarak oluştuğu, bekleme süresinin artmasıyla sürgünlerin daha uzun gelişme fırsatı buldukları ve uzunlukların da arttığı belirlenmiştir. İleride yapılacak çalışmalarda GA₃'ün 0.1 mg/L den daha düşük miktarlarda test edilmesi uygun bir seçenek olabilir.

Besin ortamında kullanılan makroelement miktarlarının test edildiğimiz çalışmada en yüksek sürgün ortalaması 6.8 ile kontrol grubu olan tam kuvvet makroelement kullanılan besin ortamından elde edilmiştir. Bunu takiben 4.3 ile uyartım sonrası tam kuvvetten $\frac{3}{4}$ kuvvete alınan eksplantlardan elde edilmiştir. Bu oranlar, besin ortamında kullanılan makroelement miktarlarının azalması ile düşmüştür. Benzer çalışmalardan Fadel vd (2010) *Mentha spicata* (yeşil nane/bahçe nanesi) türünde yaptıkları çalışmada üç farklı besin ortamını ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ ve tam kuvvet) test etmişler, en yüksek sürgün ortalamasını $\frac{1}{2}$ MS ortamında elde etmişlerdir. Diğer bir çalışmada Ganasan ve Huyop (2010) *Citrullus lanatus* türünde yaptıkları çalışmada köklendirmeye aldıkları sürgünleri çeşitli BBD'ler eklenmiş 2 farklı konsantrasyondaki ($\frac{1}{2}$ ve tam) MS besin ortamında test etmişler ve en yüksek başarıya bizim de çalışmamızda alınan sonuçlarla örtüşür nitelikte tam kuvvet MS ortamında ulaşmışlardır. Yine benzer bir sonuç alınan Hidayah vd (2012) *Pogostemon cablin* türü üzerine yaptıkları çalışmada $\frac{1}{2}$ ve tam kuvvet kullanılan besin ortamlarından en yüksek sürgün ortalamasına tam kuvvet besin ortamında ulaşmışlardır. Benzer çalışmalarda da tespit edildiği üzere bu çalışmada da tam kuvvet makroelement kullanılan besin ortamlarında elde edilen sürgün ortalaması daha yüksek olup miktarın azalmasıyla ortalamaların düştüğü tespit edilmiştir.

Kazein uygulamasının sürgün gelişimine etkisinin araştırıldığı çalışmamızda CH uygulamasının iki konsantrasyonu uygulanmış ve CH uygulamalarının kendi arasında sürgün gelişiminde en başarılı konsantrasyonun 100 mg/L olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda BBD kullanılmayan besin ortamında geliştirilen sürgünlerin (kontrol grubu) CH uygulamasına nazaran daha iyi bir gelişim gösterdiği, CH konsantrasyonunun artmasıyla bu gelişimin az da olsa düştüğü tespit edilmiştir. Başka bir çam türünde yapılan bir çalışmada *Pinus strobus* türünde yapılan bir çalışmada yetişkin zigotik embriyolardan kallus kültürü ile rejenerasyon gerçekleştiren Tang ve Newton (2005) 500 mg/L CH uygulamasıyla en yüksek başarıyı elde etmişlerdir. Bu konudaki benzer bir çalışmada Vengadesan ve Pijut (2008) *Q. rubra* üzerinde yaptıkları çalışmalarda en iyi sürgün gelişimine WPM ortamında 4.4 µM BA, 0.29 µM GA₃ ve 500 mg/L kazein uygulamasında ulaşmışlardır. Bir diğer çalışmada Ainsley vd (2000) *Prunus dulcis* Mill. (Badem) türünde yaprak dokusundan adventif sürgün gelişimi çalışmasında % 0.1m/w CH, 9.8 µM IBA ve 6.8 µM TDZ kombinasyonu ile en yüksek sürgün ortalamasına ulaşmışlardır. Çalışma sonunda kazein uygulamasının, istatistiksel olarak farklı olmamasına rağmen, sürgün gelişimini az da olsa olumsuz etkilediği ve sürgün gelişimini yavaşlattığı belirlenmiştir.

6. SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) türünde GA₃ uygulamasının uygun olmadığını, sürgün gelişimini yavaşlattığı ve çoğunlukla durdurup, gelişmiş olan sürgünleri de öldürdüğünü göstermiştir. Besin ortamında kullanılan GA₃'ün gecikmeli olarak verilmesinde geçen sürenin sadece sürgün gelişimi için fırsat yarattığı, ancak GA₃'ün olumsuz etkilerinin süreye bakmaksızın yine de görüldüğü tespit edilmiştir. Diğer taraftan kullanılan besin ortamındaki bileşenlerden makroelementlerin sürgün gelişimi için önemli olduğu, $\frac{3}{4}$ ve $\frac{1}{2}$ oranlarda kullanılan makroelementlerin tam kuvvete nazaran gelişimi olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. Son olarak CH (kazein hidrolizat) kullanımının sürgün gelişimini az da olsa olumsuz etkilediği tespit edilmiştir.

7. KAYNAKLAR

- ABDULLAH, A.A., YEOMAN, M.M. and GRACE, J. 1985. *In vitro* adventitious shoot formation from embryonic and cotyledonary tissues of *Pinus brutia* Ten. Plant cell *tissue* and organ culture. 5:35-44
- AINSLEY, P.J., COLLINS, G.G. and SEDGLEY, M. 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill.) Department Of Horticulture, Citiculture And Oenology, Plant Research Centre. 36. 470-474
- ALPACAR, K. 1981. Kızılçam'ın (*Pinus brutia* Ten.) Fenolojisi ve Bazı Tohum Özelliklerinin saptanması, ormancılık araştırma enstitüsü yayınları teknik bülten serisi no: 105 Şafak matbaası, Ankara
- AROUS, S., BOUSSAID, M. and MARRAKCHI M. 2001. Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chili (*Capsicum annuum* L.) J. Appl. Hort., 3(1):17-22
- ASLAN, S. ve UĞURLU, S. 1986. Kızılçam, Halepçamı ve *P. elderica* Tür ve Orijinlerinin Tohum, Fidecik ve Fidan Özelliklerinin Araştırılması. Orman Araştırmaları Enstitüsü Yayınları Teknik Bülten Serisi No: 165
- BABAOĞLU M, GÜREL E. ve ÖZCAN S. 2001. Bitki Biyoteknolojisi, Cilt I, Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Yayınevi.
- BEKTAS, İ., A. TUTUS ve EROĞLU, H. 1999. A study of the suitability of calabrian pine (*Pinus brutia* Ten.) for pulp and paper manufacture. Tr. J. Of Agriculture and Forestry. 23(1999) Ek sayı 3, 589-597 TUBİTAK
- BISHT, P., JOSHI, I., CHAUHAN, J. M.S. and SHARMA, V.K. 2002. *In vitro* clonal propagation of mature eucalyptus F₁ hybrid FRI-5 (*E. camaldulensis* Dehn. x *E. tereticornis* sm.) Indian journal of forestry vol:23 No:1 pp. 28-32
- BOZKURT, Y 1971. Onemli Bazı Ağac Türlerinin Tanımı, Teknolojik Özellikleri ve Kullanılış Yerleri., İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayın no. 177. İstanbul.
- BUNN, E., 1994. Final Research Report on the Australian Flora Foundation funded Project In vitro propagation of Australian Proteaceae (*Conospermum*), Kings Park and Botanic Garden, Kings Park West Perth 6005
- CALIXTO, F., PAIS, M.S. 1997: Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pinaster*, society for *in vitro* biology, 1071-269097
- ÇÖLAŞAN, Ü.E. 1960. Türkiye iklimi. T. C. Ziraat bankası matbaası, Ankara.
- DAVIS, P.H. 1965. Flora Of Turkey And East Aegean Island, Vol. I, P. 74-75 Univ. Of Edinburgh Pres, Edinburgh

- DHAKA, N. and KOTHARI, S.L. 2002. Phenylacetic acid improves bud elongation and in vitro plant regeneration efficiency in *Helianthus annuus* L. *Plant cell rep.* 21:29-34
- DPT, 1995. Ormancılık yedinci beş yıllık kalkınma planı özel ihtisas komisyonu ormancılık alt komisyon raporu. T.C. Başbakanlık Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığı, DPT: 2400 ÖİK: 461: 79-416, Ankara.
- ELWAN, M.W.M. , 2009. *In vitro* shoot regeneration, elongation and rooting of pepper (*Capsicum annuum* L.) Improving Of *In Vitro* Shoot Elongation And Subsequent Rooting Of Sweet Pepper Cv. California Wonder Using Ga³ And Tdz., Department Of Horticulture, Faculty Of Agriculture, Suez Canal University, Ismailia, Egypt
- ERTEN, P., 1986. Kızılçam (Pinus Brutia Ten.) ve Toros Sedirinin (*Cedrus libani* A. Richard) Çeşitli Yöntemlerle Emprenyesi. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları Teknik Bülten Serisi No: 161
- EUFORGEN 2009, <http://www.euforgen.org/>
- FADEL, D., KINTZIOS, S., ECONOMOU, A.S., . MOSCHOPOULOU, G., CONSTANTINIDOU, H. I. A 2010. Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxydant activity of spearmint (*Mentha spicata* L.) *The open horticulture journal*, 3:31-35
- FENG C.M., Q.R., ZHOU, L.L, XIE D.Y. and XIANG, Q.Y. 2009. Shoot Regeneration Of Dwarf Dogwood (*Cornus canadensis* L.) And Morphological Characterization Of The Regenerated Plants, Springer Science Business Media.
- FINCHER, G.B., 1989. Molecular and cellular biology association with endosperm mobilization in germination cereal grains. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology, 40, 305-346
- GANASAN, K. HUYOP, F. 2010. *In vitro* regeneration of *Citrullus lanatus* cv. Round Dragon *journal of biological sciences* 10(2):131-137
- GENÇ, M. 2009. Asli Ağaç Türlerimiz Silvikültürü “Kızılçam”, S.D.Ü Orman Fak. Sunum.
- GITONGA, L. KAHANGI, E., GICHUKI, S., NGAMAU, K., MUIGAI, A., NJERU, E., NJOGU, N., WEPUKHULU, S. 2008. Factors influencing *in vitro* shoot regeneration of *Macadamia integrifolia* *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (22), pp. 4202-4207.
- GOVINDARAJ, S., DIANA, R. K.B. 2006. Efficient *in vitro* micropropagation and regeneration of *Artemisia vulgaris* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7:117-124, 2007.

- GÖKMEN, H. 1973. Gymnospermae (açık tohumlular), or. Gn. Md. Yayın no: 523, s. 286-291, Ankara
- GUPTA, P.K. and DURZAN, D.J. 1985. Shoot Multiplication From Mature Trees of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports. 8: 177-179
- GURBOY, B. 2007. Kuzey Kıbrıs'ta Doğal Olarak Yetişen Kızılçam (*Pinus brutia* TEN.)'in Lif Morfolojisi *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* Seri: A, Sayı: 2, ISSN: 1302-7085, Sayfa: 119-127
- GÜLELÇİN, D. 2008. Gibberellik asit ve 24-epibrassinolid'in tuz stresi koşullarında çimlendirilen arpa (*Hordeum vulgare*) tohumlarında total dna ve protein içeriğine etkilerinin tespiti, yüksek lisans tezi, S.D.Ü, F.B.E.
- HIDAYAH, W. A. W. N, NORRIZAH, J. S., AMINAH, S. M. S, RUZAINA, S. A. S. FAEZAH, P. 2012. Effect of medium strength and hormones concentration on regeneration of *Pogostemon cablin* using nodes explant. *Asian journal of biotechnology* 4 (1): 46-52.
- HOFFMANN, A. 1939. Beitrage Zur Kenntnis Der Hertkiefer (*P. brutia* Ten) Zeitschrift Für Weltforstwirtschaft V1-4
- JOSHI, I., BISHT, P. , SHARMA V.K., UNİYAL, D.P. 2002. *In vitro* Clonal Propagation of Mature Eucalyptus F1 Hybrid (*Eucalyptus tereticornis* SM. x *E. grandis* HILL ex. MAIDEN) , Division of Genetics and Tree Propagation, Forest Research Institute, (ICFRE), Dehradun- 248006 (Uttaranchal), India.
- KARSSSEN, C.M., 1995. Hormonal Regulation Of Seed Development, Dormancy, Andgermination Studied By Genetic Control. In J Kigel, G Golili, Eds, Seed Developmentand Germination, Marcel Dekker, New York.
- KARSSSEN, C.M., ZAGORSKI, S., KEPCZYNSKI, J., GROOT, S.P.C., 1989. Key Role For Endogenousgibberellins in The Control Of Seed Germination. *Annals Botany*, 63, 71-80
- KAYACIK, H. 1965. Orman Ve Park Ağaçlarının Özel Sistematiği I. *Gymnospermae*. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayın No.98, Kutulmuş Matbaası, İstanbul, 390 ss.
- KAYACIK, H. 1980. orman ve park ağaçlarının özel sistematiği, gymnospermae (açık tohumlular), cilt I, s. 235-236, İ. Ü. Or. Fak. Yayını No: 281, İstanbul
- KOTSIAS, D. and ROUSSOS, P.A. 2000. An investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in in vitro shoot tip and node culture of lemon seedlings. Department of Pomology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Botanikos 118 55, Athens, Greece
- MURASHIGE T. and SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497

- NAS, M.N. 2003. Inclusion of Polyamines in the Medium Improves Shoot Elongation in Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Micropropagation, Kahramanmaraş Sütçüimam İmam University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Kahramanmaraş – TURKEY
- NEGI, M., SINGH, C.P. and SRIVASTAVA, R.K. 2008. In vitro multiplication of strawberry cv. Chandler, Department of Horticulture, College of Agriculture, G.B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar-263 145, U.S. Nagar, Uttarakhand.
- NEYİŞÇİ, T. 1987. Orman Yangınlarının Önlenmesinde Kullanılabilecek Yavaş Yanan Bitki Türleri Üzerinde Bir Çalışma. *Doğa Bilim Dergisi*, D2.
- OAE, 1987. Türkiye orman varlığı, Orman Araştırmaları Enstitüsü Muhtelif Yayınlar Servisi, 48, 135ss. Ankara.
- Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Müdürlüğü, 1999 Yılı Çalışma Raporu ve 2000 Yılı Çalışma Programı. Orman Bakanlığı Yayın No:102, Müdürlük Yayın No:12. Ankara.
- ÖKTEM, E. 1987. Kızılçam. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, El Kitabı Dizisi, No:2, Ankara. 182 s
- ÖZYİĞİT, A. 1974. Kızılçam gençleştirme çalışmalarında bir tatbikatçının gözlemleri. *Orman Mühendisleri Dergisi* Sayı: 3, 20-24 ss.
- PATTNAIK, S.K. and CHAND, P.K. 1996. Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *M. Ihou* Koiz. and *M. serrata* Roxb., through in vitro culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees, *Plant Cell Reports* 16:503-508
- PAUDYAL, K.P. and HAQ, N. 1999. In vitro propagation of pummelo (*Citrus grandis* L. osbeck) , Environmental Research Group, Lanchester Building, University of Southampton, Southampton UK
- PREHN, D., SERRANO, C., MERCADO, A., STANGE, C., BARRALES, L. and ARCE-JOHNSON, P. 2003. Regeneration of whole plants from apical meristems of *Pinus radiata* plant cell, tissue and organ culture 73: 91–94, 2003. 91 Netherlands
- PURKAYASTHA, J., SUGLA, T., PAUL, A., SOLLETI, S.K., MAZUMDAR, P., BASU, A., MOHOMMAD, A., AHMED, Z. and SAHOO, L. 2010. Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*, Center for Energy and Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Guwahati, Guwahati-781039, Assam, India Defence Agricultural Research Laboratory, Haldwani, Uttaranchal Pradesh, India

- ROY, P.K., MAMUN, A.N.K. and AHMED, A. 2004. *In vitro* Plantlets Regeneration of Rose Plant Tissue Cult. 14(2) : 149-154.
- SAATÇIOĞLU, F.,1971. Silvikültür II, Silvikültürün Tekniği. İ.Ü.Orman Fak. Yayınları, İ.Ü. Yayın No: 1648, O.F.Yayın No: 172, Sermet Matbaası, İstanbul
- SAATÇIOĞLU, F. 1976. Silvikültür 1. Silvikültürün biyolojik esasları ve prensipleri. İ. Ü. Orman Fakültesi Yayınları no:222.
- SAHARAN, V. 2010. Effect of gibberellic acid combined with saponin on shoot elongation of *Asparagus officinalis* , Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Maharana Pratap University of Agriculture and Technology, Udaipur-313001, Rajasthan, India
- SATIROPOULOS, T.E. and FOTOPOULOS, S., 2005. *In vitro* propagation of the PR 204/84 peach rootstock (*Prunus persica* x *P. amygdalus*): the effect of BAP, GA₃, and activated charcoal on shoot elongation. *European Journal of Horticultural Science*. 70 (5), 253-255.
- SELİK, M. 1963. Kızılçam (*P. brutia* Ten.)'ın Botanik özellikleri üzerine araştırmalar. Orman Genel Müdürlüğü Yayını No: 353, İstanbul.
- SHARMA, A.D., THAKUR, M., RANA, M. and SINGH, K., 2004. Effect of plant growth hormones and abiotic stresses on germination, growth and phosphate activities in *Sorghum bicolor* (L.) moench seeds. *African Journal of Biotechnology*, 3(6), 308-312.
- STOJICIC, D. and BUDIMIR, S. 2004. Cytokinin-mediated auxillary shoot formation in *Pinus heldreichii*, *Biologia plantarum*, 48, 477-479
- TANG, W. 2000. *In vitro* regeneration of loblolly pine and random amplified polymorphic DNA analyses of regenerated plantlets
- TANG, W., HARRIS, L.C. and OUTHAVONG, V. 2004. Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.) Department of Biology, Howell Science Complex, East Carolina University, Greenville, 22(12):871-7
- TANG, W. , NEWTON, R.J. 2005. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.) Springer-Verlag
- THANOS C.A. and MARCOU S. 1991. Post-fire regeneration in *Pinus brutia* forest ecosystems of Samos island (Greece): 6 years after. *Acta Oecologica/Oecologia Plantarum* 12: 633-642.
- THORPE, T.A., HARRY, I.S. 1990. Special problems and prospects in the propagation of woody species. pp. 67-74. In: R.Rodriguez et.al. (eds), *Plant Aging: Basic and applied approaches*. Plenum Press, New York.

- ÜRGENÇ, S. 1998. Genel Plantasyon ve Ağaçlandırma Tekniği, İ. Ü. Orman Fakültesi Yayın No: 3997/444, 547.s.
- VENGADESAN, G. , PIJUT, P.M. 2009. In vitro propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.) The Society for In Vitro Biology
- VINOCUR, B., CARMÍ, T., ALTMAN, A., ZIV, M. 2000. Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media
- YILDIRIM, T. 2011. Kızılçam'da (*Pinus brutia* TEN.) üstün genetik özelliklere sahip bireylerin in vitro yolla çoğaltılma özelliklerinin araştırılması. Akdeniz Üniversitesi BAP projesi sonuç raporu, Proje No:2006.01.0105.001
- ZECH. W, ÇEPEL 1972. Güney Anadoludaki bazı *Pinus brutia* meşcerelerinin gelişimi ile toprak ve relief özellikleri arasındaki ilişkiler. İ. Ü. Or. Fak. Yay. No: 1753/191

8. EKLER

EK-1: TERİMLER SÖZLÜĞÜ

Aseptik: Steril koşullar altında

Eksplant: Bitkiden alınan parçacık

Ex sitü: Canlının yaşadığı doğal ortam dışında

İn sitü: Canlının yaşadığı doğal ortam

İn vitro: Laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda

Mikroçoğlatım: Bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde ,sürgün, kök, kallus vb) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesidir.

ÖZGEÇMİŞ

Süleyman Alphan AKKUŞ 1985 yılında Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Isparta’da tamamladı. Lisans eğitimini 2009 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde başarıyla tamamladı. 2010 yılı Şubat ayında Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yüksek lisansa başladı ve 2013 yılı Şubat ayında lisansüstü eğitimini tamamladı.