

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROÇOĞALTILMIŞ OLGUN ERKEK VE
DİŞİ ANTEPFISTIĞI (*PISTACIA VERA* L.)
AĞAÇLARININ KARYOTİP ANALİZLERİ

Emine AYAZ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
HAZİRAN 2009

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MİKROÇOĞALTILMIŞ OLGUN ERKEK VE DİŞİ
ANTEPFISTIĞI (*PISTACIA VERA* L.)
AĞAÇLARININ KARYOTİP ANALİZLERİ**

Emine AYAZ

**DOKTORA TEZİ
DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Süreyya NAMLI
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR
HAZİRAN 2009**

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DIYARBAKIR

Emine AYAZ tarafından yapılan "Mikroçoğaltılmış Olgun Erkek ve Dişi Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) Ağaçlarının Karyotip Analizi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

	<u>Unvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>
Başkan	:	
Üye	:	
Üye	:	
Üye	:	
Üye	:	

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 24/06/2009

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../.../...

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ
(MÜHÜR)

ÖZ

Bu çalışmada öncelikle, 25-30 yıllık olgun dişi ve erkek antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarının apikal tomurcuklarından bir *in vitro* klonal mikroçoğaltım metodu geliştirilmiş, sonrasında ise klonal çoğaltılan erkek bireyler ile *in vitro* çimlendirilen tohumlardan elde edilen kök uçlarından, erkek ve dişi cinse ait karyolojik bulgulara ulaşılmıştır.

Aksenik kültürler, ekplantların %15'lik NaOCl içinde (40 dk.) çalkalanması sonrasında 1.0 mg l^{-1} BA ilave edilmiş MS besisi ortamında başlatılmış, sürgün proliferasyonu için yine 1.0 mg l^{-1} BA'nın optimum sonuç verdiği tespit edilmiştir. *In vitro* çoğaltılan erkek bireye ait sürgünlerin, yoğun hormon çözeltilerine daldırma ile köklendirilme çalışmalarında, sürgünler için optimum köklenme parametre ve süresinin 1 gr l^{-1} IBA – 20 sn. olduğu belirlenmiştir.

İkinci aşamada, *in vitro* üretilen tüm köklere uygulanmak üzere başarılı bir karyotip analiz tekniği geliştirilmiştir. Kromozomların morfolojik analizlerinde türe ait diploit kromozom sayısının $2n=30$ olduğu, ploidisi seviyesine rastlanmadığı, kromozomların metasentrik, submetasentrik, subtelosentrik ve telosentrik sentromer yapısında oldukları belirlenmiş, kromozomların kollarına bağlı herhangi bir satellite rastlanmamıştır. Komplementteki en büyük kromozom çiftinin metasentrik sentromerli olduğu, bu kromozom çiftinin, erkek çöğürleri verecek olan tohumlarına ve olgun erkek antepfıstığına ait metafaz plaklarda heteromorf, antepfıstığının dişi çöğürlerini verecek olan tohumlarına ait metafaz plaklarda ise homomorf yapı gösterdiği ve bu kromozomların türe ait cinsiyet kromozomları oldukları belirlenmiştir. Çalışmada, *Pistacia vera* L. için genel karyotip formülü, $K(2n:28+XX/Xy): 8sm+3m+2st+1t+XX/Xy$ olarak hesaplanmış ve sonuçlar antepfıstığında cinsiyet belirleme mekanizmaları açısından tartışılmıştır.

ABSTRACT

First, in this study methods are described for the micropropagation of mature apical shoot tips of male and female *Pistacia vera* L., then only the root tips of male micropropagated shoots and *in vitro* germinated seeds were used for karyological studies and the karyotyping of male and female *Pistacia vera* L.

Before the axenic cultures were initiated on a MS medium supplemented with 1.0 mg l^{-1} BA, the explants were disinfested in 15% NaOCl (40 min.). BA again at 1.0 mg l^{-1} as this gave the best results for shoot multiplication studies. It was determined that the optimum dipping concentration and time are: 1 g l^{-1} and 20 s. for rooting studies conducted by dipping the basal-cut-ends of *in vitro* micropropagated shoots into a dense IBA solution.

Second, a successful karyotype analysis was developed for the whole root tips propagated *in vitro*. The conclusions obtained from the morphological analyses of the chromosome studies determined the chromosome complement as $2n = 30$ with metacentric, submetacentric, subtelocentric and telocentric pairs. Neither polyploidy nor satellite were detected on any of these chromosome plaques.

It was found that the biggest chromosome pairs on the complement have metacentric centromer, and these chromosome pairs were heteromorph in the male metaphase plaque; whereas they were homomorph in the female plaques. It was also determined that they are the sex chromosomes for *Pistacia vera* L. The karyotype formula for this can be stated as: $K(2n:28+XX/Xy): 8sm+3m+2st+1t+XX/Xy$. These results are then discussed for the sexual determination strategies of *Pistacia vera* L.

ÖNSÖZ (ve/veya TEŞEKKÜR)

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Süreyya NAMLI'nın danışmanlığında yürütülmüştür. Bu olanağı sağladıklarından ve her türlü bilgi ve tecrübesinden yararlandığım sayın hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan ve deneysel çalışmalarım sırasında değerli yardımlarını, sıcaklık ve desteğini gördüğüm, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Çiğdem IŞIKALAN'a teşekkür ederim. Biyoteknoloji laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan Biyoteknoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Davut BAŞARAN'a teşekkür ederim.

Beni bu seviyeye getiren her türlü ihtiyaç ve yardımına koşan ve her şeyimi borçlu olduğum, sürekli yanımda hissettiğim babam Mehmet Nezir AYZAZ'a, annem Rafia AYZAZ'a, canım ablam Sabahat ve kardeşlerim Vahdettin, Mahmut ve Fatma AYZAZ'a sonsuz teşekkür, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince ve tezin yazım aşamasında çok değerli katkı ve yardımlarını gördüğüm, tezin oluşturulmasında maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Dr. Engin TİLKAT'a da teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ (VE/VEYA TEŞEKKÜR)	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ	1
KAYNAKLAR.....	5
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	6
2.1. DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	6
2.1.1. Mikroçoğaltma Çalışmaları	6
2.1.1.1. Organogenezis çalışmaları.....	10
2.1.2. Somatik Embriyogenezis Çalışmaları	11
2.1.3. Mikroaşılama Çalışmaları.....	11
2.2. SİTOGENETİK ÇALIŞMALAR.....	13
KAYNAKLAR.....	19
3. MATERYAL VE METOT.....	26
3.1. MATERYAL	26
3.1.1. Antepfıstığı Hakkında Genel Bilgiler.....	26
3.1.1.1. Kültür tarihi ve dünya üzerindeki yayılışı	26
3.1.1.2. Bitki sistematığındeki yeri	27
3.1.1.3.Genel morfolojik ve biyolojik özellikleri	27
3.1.1.4. Döllenme biyolojisi	28
3.1.1.5. Ekolojik istekleri	29
3.1.1.6. Sağlık açısından önemi	29
3.2. METOT	31
3.2.1. Mikroçoğaltım Çalışmaları	31
3.2.1.1. Kültüre alınacak eksplantın seçimi ve hazırlanması	33

3.2.1.2. Besi ortamlarının içeriği ve hazırlanması.....	33
3.2.1.2.1. Büyüme düzenleyicilerinin (hormonlar) stok solüsyonlarının hazırlanması.....	34
3.2.1.2.2. Stok Solüsyonlardan Yararlanarak Besi Ortamının Hazırlanması.....	35
3.2.1.3. Sterilizasyon teknikleri.....	35
3.2.1.3.1. Çalışma alanının sterilizasyonu.....	36
3.2.1.3.2. Kullanılacak alet, ekipman, kapların ve besin ortamlarının sterilizasyonu.....	36
3.2.1.3.3. Yüze sterilizasyon tekniklerinin belirlenmesi ve bitki materyalinin sterilizasyonu.....	37
3.2.1.6 Kültür başlatma çalışmaları.....	38
3.2.1.7 Sürgün proliferasyon çalışmaları.....	38
3.2.1.8. Köklendirme çalışmaları.....	38
3.2.2. Sitogenetik Çalışmalar.....	40
3.2.2.1. Preparatın hazırlanışı.....	45
3.2.2.1.1. İlk işlem.....	45
3.2.2.1.2. Fiksasyon.....	46
3.2.2.1.3. Depolama.....	46
3.2.2.1.4. Hidroliz.....	46
3.2.2.1.5. Boyama.....	47
3.2.2.2. Preparatın yapılışı.....	49
3.2.2.3. Devamlı preparatların hazırlanışı.....	49
3.2.2.4. Karyotip analizinin yapılışı.....	50
3.2.2.5. Karyogramların yapılışı.....	51
3.2.2.6. İdiogramların yapılışı.....	51
3.2.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ (VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ).....	52
ÇİZELGE VE ŞEKİLLER.....	53
KAYNAKLAR.....	60
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	63
4.1. IN VİTRO KLONAL MİKROÇOĞALTIM ÇALIŞMALARI İLE İLGİLİ GENEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	64

4.1.1. Materyalin Sterilizasyonu ile İlgili Genel Bulgular	64
4.1.1.1. NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının yüzey sterilizasyonuna etkisi.....	64
4.1.1.2. NaOCl'in farklı immersiye sürelerinin yüzey sterilizasyonuna etkisi ...	65
4.1.2. Materyalin Sterilizasyonu ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma	66
4.1.3. Kültür Başlatma Çalışmaları ile İlgili Genel Bulgular	69
4.1.4. Kültür Başlatma Çalışmaları ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma .	70
4.1.5. Sürgün Proliferasyon Çalışmaları ile İlgili Bulgular.....	74
4.1.6. Sürgün Proliferasyon Çalışmaları ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma.....	75
4.1.7. Köklenme Çalışmaları ile İlgili Bulgular	78
4.1.7.1. IBA'nın farklı konsantrasyonlarının kök oluşumu üzerine etkisi.....	78
4.1.7.2. IBA'nın farklı immersiye sürelerinin kök oluşumu üzerine etkisi	78
4.1.8. Köklenme Çalışmaları ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma	79
4.2. SİTOGENETİK ÇALIŞMALAR İLE İLGİLİ GENEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	83
4.2.1. Karyolojik Çalışmalar ile İlgili Bulgular.....	83
4.2.2. Karyolojik Çalışmalar ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma.....	84
4.2.3. Kromozomların Morfolojik Analizi ile İlgili Bulgular	86
4.2.4. Kromozomların Morfolojik Analizi ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma	88
4.2.5. Karyotip analizi ile İlgili Bulgular	90
4.2.6. Karyotip Analizi ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma	91
4.2.7. Karyogram Çalışmaları ile ilgili Bulgular	92
4.2.8. Karyogram Çalışmaları ile ilgili Değerlendirmeler ve Tartışma	92
4.2.9. İdiogram Çalışmaları ile İlgili Bulgular	92
4.2.10. İdiogram Çalışmaları ile ilgili Değerlendirmeler ve Tartışma.....	92
4.2.11. Cinsiyet Kromozomları ile ilgili Genel Değerlendirme ve Tartışma .	93
ÇİZELGE VE ŞEKİLLER	99
KAYNAKLAR.....	118
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	125
ÖZGEÇMİŞ.....	128

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.1.2. Antepfıstığı (*P.vera* L.)’nın bitki sistematigindeki yeri

Çizelge 3.1.1.6. 100 gr Antepfıstığı (*P.vera* L.)’nın bileşenleri

Çizelge3.2.1. Organogenesis çeşitleri

Çizelge 3.2.1.2. MS (Murashige ve Skoog) besi ortamlarının içeriği ve hazırlanması

Çizelge 3.2.1.2.1. Büyüme düzenleyicilerinin (hormonlar) stok solüsyonlarının hazırlanması

Çizelge 3.2.1.2.2. Stok solüsyonlardan yararlanarak besi ortamının hazırlanması

Çizelge 3.2.2. Kromozomların sentromer pozisyonlarına göre adlandırılması

Çizelge 3.2.2.1.1.Sitogenetik çalışmalarda kullanılan ilk işlem solüsyonları

Çizelge 3.2.2.1.2. Sitogenetik çalışmalarda kullanılan fiksatifler ve hazırlanışları

Çizelge 3.2.2.1.4. Sitogenetik çalışmalarda kullanılan hidroliz parametreleri ve hazırlanışları

Çizelge 3.2.2.1.4. Sitogenetik çalışmalarda kullanılan boya tipleri

Çizelge 4.1.1.1^a. Dişi antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) apikal tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl’in farklı konsantrasyonlarının etkisi

Çizelge 4.1.1.1^b. Erkek antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl’in farklı konsantrasyonlarının etkisi

Çizelge 4.1.1.2^a. Dişi antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) apikal tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl’in farklı immersiyon sürelerinin etkisi

Çizelge 4.1.1.2^b Erkek antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) apikal tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl’in farklı immersiyon sürelerinin etkisi

Çizelge 4.1.3^a. Dişi antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) apikal sürgünlerinin kültür başlatılmasına sitokininlerin (BA, Kin) etkisi

Çizelge 4.1.3^b. Erkek antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) apikal sürgünlerinin kültür başlatılmasına sitokininlerin (BA, Kin) etkisi

Çizelge 4.1.5^a. Dişi antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) sürgünlerinin proliferasyonuna BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

Çizelge 4.1.5^b. Erkek antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) sürgünlerinin proliferasyonuna BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

Çizelge 4.1.5^c. Dişi antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) sürgünlerinin proliferasyonunda, BA konsantrasyonuna (1 mg l⁻¹ BA), GA₃'ün farklı konsantrasyonlarının etkisi

Çizelge 4.1.5^d. Erkek antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) sürgünlerinin proliferasyonunda, BA konsantrasyonuna (1 mg l⁻¹ BA), GA₃'ün farklı konsantrasyonlarının etkisi

Çizelge 4.1.7.1^a Dişi antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) sürgünlerinin köklendirilmesinde IBA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

Çizelge 4.1.7.1^b. Erkek antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) sürgünlerinin köklendirilmesinde IBA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

Çizelge 4.1.7.2. Erkek antepfıstığı sürgünlerinde, IBA'nın farklı immersiyon sürelerinin kök oluşumu üzerine etkisi

Çizelge 4.2.5^a. Olgun erkek antepfıstığının (*Pistacia vera* L.) karyotip analizi

Çizelge 4.2.9^a. Olgun erkek antepfıstığının (*Pistacia vera* L.) idiogramı

Çizelge 4.2.5^b. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin dişi çöğürlerini verecek olan tohumlarının karyotip analizi

Çizelge 4.2.9^b. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin dişi çöğürlerini verecek olan tohumlarına ait idiogram

Çizelge 4.2.5^c. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin erkek çöğürlerini verecek olan tohumların karyotip analizi

Çizelge 4.2.9^c. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nın erkek çöğürlerini verecek olan tohumlarının idiogramı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.1.3. 25-30 yaşında dişi (a) ve erkek (b) antepfıstığı ağaçlarının genel görünüşü.

Şekil 3.2.1.1. Kültüre alınacak eksplant tipi: apikal tomurcuk (a), tohumlar (b)

Şekil 3.2.2. Genel bir kromozom (a) ve heteromorf bir cinsiyet kromozomu (b) şekli

Şekil 4.1.1. Dişi (a) ve erkek (b) antepfıstığı tomurcuklarının MS besi ortamında genel görünüşleri

Şekil 4.1.3. 1.0 mg l^{-1} BA içeren besi ortamında dişi (a) ve erkek (b) antepfıstığı apikal tomurcuklarından kültür başlatılması

Şekil 4.1.5^a. 1.0 mg l^{-1} BA içeren besi ortamında dişi (a) ve erkek (b) antepfıstığının sürgün proliferasyonu

Şekil 4.1.5^b. 1 mg l^{-1} BA ve $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ GA₃ içeren besi ortamında dişi (a) ve erkek (b) antepfıstığı sürgünlerinin uzaması

Şekil 4.1.7. Olgun erkek antepfıstığı sürgünlerinin (a) ve antepfıstığı tohumlarına ait sürgünlerin (b) köklendirilmesi

Şekil 4.2.3^a. Olgun dişi antepfıstığının (*Pistacia vera* L.) metafaz düzlemindeki mitotik kromozomları

Şekil 4.2.3^a. Olgun erkek antepfıstığının (*Pistacia vera* L.) metafaz düzlemindeki mitotik kromozomları

Şekil 4.2.7^a Olgun erkek antepfıstığının (*Pistacia vera* L.) karyogramı

Şekil 4.2.3^b. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nın dişi çöğürlerini verecek olan tohumlarına ait metafaz düzlemindeki mitotik kromozomlar

Şekil 4.2.7^b. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nın dişi çöğürlerini verecek olan tohumlarının karyogramı

Şekil 4.2.3^c. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nın erkek çöğürlerini verecek olan tohumlarına ait metafaz düzlemindeki mitotik kromozomlar

Şekil 4.2.7^c. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nın erkek çöğürlerini verecek olan tohumlarının karyogramı

SİMGELER VE KISALTMALAR

MS	: Murashige ve Skoog
BA	: 6-Benzilaminopürin
Kin	: Kinetin
TDZ	: Thidiazuran
NAA	: Naftalen asetik asit
IBA	: Indol bütirik asit
GA ₃	: Gibberellik asit
2IP	: İzopentil adenin
gr	: Gram
gr/l ⁻¹	: Gram / Litre
w/v	: Ağırlık / Hacim
v/v	: Hacim/Hacim
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
mg/l ⁻¹	: Miligram / Litre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicileri
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
PCR	: Polymerase chain reaction
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat Marker
SSR	: Simple Sequence Repeat Markers
HCl	: Hidroklorikasit
rpm	: Bir dakikadaki devir
dk	: Dakika
sn	: Saniye
K	: Karyotip formülü
m	: Metasentrik

Sm	: Submetasentrik
St	: Subtelosentrik
t	: Telosentrik
AC	: Adenin-Sitozin
CG	: Sitozin-Guanin
TA	: Timin-Adenin
cM	: Centi Morgan
STS	: Sequence Tagged Sites
PhG	: Phloroglucinol

1.GİRİŞ

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.), *Anacardiaceae* familyasının bir üyesi olarak sistematikte yerini almaktadır. *Pistacia* cinsi içerisinde yer alan 11 türden, ekonomik olarak yetiştiriciliği yapılan ve meyvesi yenebilen tek türüdür¹. Dioik ve odunsu bir bitki olup erkek ve dişi çiçekler farklı ağaçlarda yer alır. Antepfıstığının dünyada yaklaşık 15 ülkede tarımı yapılmaktadır. Bununla birlikte İran, Türkiye, ABD, Suriye, Çin, Yunanistan, Afganistan ve İtalya'da ekonomik olarak üretilmektedir. *Pistacia* türleri dünyada kuzey ve güney yarımkürelerinin 30–45° paralelleri arasında mikro klima olarak ifade edilebilen alanlarda yetiştirilmektedir². Türkiye, antepfıstığı gen merkezi içerisinde yer alması, yabani ağaç miktarı yönünden zengin bir potansiyele sahip oluşu nedeniyle özel bir konumdadır. Ülkemizde yaklaşık olarak 56 ilimizde antepfıstığı yetiştiriciliği yapılmaktadır. Gaziantep, Şanlıurfa, Adıyaman, Siirt, Kahramanmaraş, Mardin ve Diyarbakır illerinde yetiştirilen antepfıstığı ile ülke çapındaki üretimin %94 ü Güneydoğu Anadolu bölgesinden karşılanmaktadır³.

Antepfıstığı periyodisite (ağacın bir yıl ürün vermesi bir yıl daha az vermesi ya da hiç vermemesi) eğilimi olan bir türdür ve çoğaltılması zor olan bitkiler grubunda yer alır. Günümüzde antepfıstığı anaçları, çeliklerin köklenme zorlukları nedeniyle tohumları aracılığıyla üretilmekte iken, antepfıstığı'nın çoğaltımı ise genellikle *P.vera* çöğürleri üzerine seçkin kalemlerin aşılmasıyla yapılır. Geleneksel üretimde ortaya çıkan problemler (heterozigot yapıda olması, dioik yapıya sahip olması, çapraz tozlaşma nedeniyle yabani popülasyonlarla etkileşerek açılım göstermesi, çeliklerin köklendirilmesinde karşılaşılan zorluklar, ticari çeşitlerin gençlik kısırlığı (juvenilite) süresinin uzunluğu nedeniyle, anaçların üzerine

Çeliklerin aşılması işlemlerinin pahalı olması, ancak yılın belirli bir döneminde yapılabilir olması, anaç-kalem uyumsuzluklarının sık sık ara-aşı gerektirmesi), antepfıstığının üretiminin iyileştirilmesinde bitki doku kültürü yöntemlerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir.

Antepfıstığı dış döllenme gösteren bir tür olduğu için tohumdan gelişen her fert genetik olarak değişkendir. Tohumdan gelişen her fertte görülebilen bu genetik değişkenlikler, anaç-elik uyumunu da etkileyen, türe özgü gözlenebilen özelliklerin gittikçe daha güç ortaya çıkması ve nesiller arasında belirgin morfolojik farkların oluşması açık bir biçimde görülmektedir. Bundan dolayı erkek ve dişi ağaçlar mutlaka üstün nitelikli kültür eşitleri ile aşılmalıdır. Ancak, aş uyumsuzluklarından dolayı sık sık ara aşının gerekli olması, çoğaltımın uzun yıllar sürmesine ve üretimde maliyet artışlarına neden olmaktadır. Ana ve aş kalemlerinin ıslahı için araştırma programlarının yetersizliği, antepfıstığının çoğaltımını sınırlayan önemli etkenlerden biridir.

Antepfıstığının odunsu yapısı ve vejetatif olarak üretilmesinde ortaya çıkan tüm bu problemler, antepfıstığının üretiminin iyileştirilmesinde bitki doku kültürü yöntemlerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir.

Doku kültürü teknikleri, bitki materyalinin elde edilmesinde birçok avantajlara sahiptir. Doku kültürü, bitkiden izole edilen doku (eksplant) parçasını yapay besi ortamında süresiz yaşatma tekniğidir. Aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (eşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesini sağlar⁵. Yaygın kullanılan doku kültürü tekniklerinden biri olan

mikroçoğaltım; organogenezis, somatik embriyogenezis ve mikroaşılama olmak üzere üç gruba ayrılır. Geleneksel bahçecilikte çoğu bitki türleri çelikle çoğaltılır fakat mikroçoğaltımda doğal üretim döngüsü için gerekli olan zamandan çok daha kısa bir sürede ana bitkinin özelliklerini taşıyan daha fazla sayıda bitki elde edilebilir. Sahip olduğu ekonomik değeri nedeniyle, altın ağacı veya yeşil altın ağaç olarak bilinen antepfıstığının, uzun zamanlardan beri doku kültürü ile çoğaltıldığı bilinmektedir. 1982 yılından itibaren antepfıstığında doku kültürü ile ilgili çalışmalar başlamış, *P.vera*, *P.atlantica*, *P.integerrima* ve *P.terebinthus* türleri üzerinde araştırmalar halen devam etmektedir^{6.7.8.9}.

Antepfıstığı ve bunun gibi ekonomik ve ekolojik önemi olan bitkilerin genetik yönden düzenlenmesi, eşey durumunun fark edilmesi, bitki ıslahı açısından önemli bir rol oynamaktadır¹⁰. Bitki doku kültürü teknikleri, bitki ıslahı ve genetik çalışmalar başta olmak üzere, fizyolojik, biyokimyasal ve biyolojik çalışmalar bakımından önemlidir. Günümüzde giderek geliştirilen doku kültürü yöntemleri, kaynakların optimum kullanımı ve gelecek araştırmalara yön verecek niteliklere sahip olması açısından, her zaman güncelliğini korumaktadır.

Bitki ıslahında temel prensip, ekonomik öneme sahip olan genotipi tespit edebilmektir. Bu bakımdan, kromozomal veriler kullanışlı karakterlerdir. Ancak kromozom ile ilgili bütün karakterlerin ortaya çıkarılabilmesi için karyotip analizlerin yapılması gerekir. Karyotip analizleri sonucu genomun sitolojik fenotipi çıkarılır ve homolog kromozomlar bir düzlem üzerinde gösterilir. Analizlerin, güvenilirliği en fazla olan kök uçlarında gözlemlenen kromozom sayısı ve morfolojileri ile yapılması dikkat çekicidir.

Ancak, şimdiye kadar antepfıstığının dioik yapısına ait cinsiyet

kromozomlarına ilişkin hiçbir çalışma rapor edilmemiştir. Antepfıstığında, eşey kromozomlarının aydınlatılması, sadece tür üzerinde yapılacak olan bitki ıslahı ve genetik çalışmalara ışık tutmakla kalmayacak, aynı zamanda çoğaltılması zor bir bitki olan antepfıstığının *in vitro* klonal çoğaltılması çalışmalarına da katkı sağlayacaktır.

Bu nedenle, bitki doku kültür teknikleri sayesinde üstün nitelikleri bilinen donör bitkiler ile aynı özelliklere sahip fertlerin klonlanması ve daha sonra klonlanan bu bitkilerin kök uçlarından kromozom analizlerinin yapılması, antepfıstığının geleneksel olarak çoğaltılmasında karşılaşılan birçok soruna çözüm teşkil edecek olması bakımından önemlidir.

Sonuç olarak, tez kapsamında ilk kez, antepfıstığının (*Pistacia vera* L.), doku kültürü ile çoğaltılmış olgun erkek ağaçlarına ve tohumlarına ait cinsiyet kromozomlarına ilişkin verilere değinilmiştir.

KAYNAKLAR

- 1- Zohary, M. *A monographical study of the genus Pistacia*, *Pal. Jour. Bot*, **1952**, 5, 187–228.
- 2- Tekin, H.; Arpacı, S.; Atlı, S.; Açar, İ.; Yaman, A.; Yükçeken, Y.; Karadağ, S. *Antepfıstığı Yetiştiriciliği*. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No: 13, 132 s. 2001.
- 3- Tunalıoğlu, R.; Taşkaya, B. *Antepfıstığı*, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü-*Bakış*, Sayı:2, Mart, Ankara, 2003.
- 4- Onay, A. *In vitro organogenesis and embryogenesis of Pistachio, Pistacia vera L.* PhD Thesis, University of Edinburgh, UK, 1996.
- 5- Mansuroğlu, S.; Gürel, E. *Mikroçoğaltım*. Edt; Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. *Bitki Biyoteknolojisi: I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*, s: 262–281, 2001.
- 6- Pontikis, C.A. *In vitro propagation of Pistacia terebenthus L*, *Plant Prop.*, **1984**, 30: 14–15.
- 7- Barghchi, M.; Alderson, P.G. *In vitro propagation of P.vera L. and commercial varieties of Ohadi and Kelleghochi*. *Journ of Hort. Sci*, **1985**, 60. 423–440.
- 8- Ahmad Z.; Zaidi, N.; Shah, F.H. *Callus formation from the mesocarp tissue of Pistacia vera L*. *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, **1989**, 32: 549–550.
- 9- Abousalim, A. *Multiple shoots formation from in vitro germinating P.vera L. and P.atlantica*. Dest seeds. *Actes de l' Institut Agronomique et Veterinaire Itassian II*, **1992**, 11(4) 5–8.
- 10- Scarano, M. T.; Abbate, L.; Ferrante, S.; Lucretti, S.; Tusa, N. *ISSR-PCR technique: A useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of Mandarin*, *Plant Cell Rep*, **2002**, 20: 1162- 1166.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

2.1.1. Mikroçoğaltma Çalışmaları

İstenilen nitelikte ürün veren antepfıstığı ağaçlarından alınan eksplantlardan klonlanarak yeni antepfıstığı bahçelerinin kurulması için doku kültürü araştırmaları 1980'lerin ilk yıllarında başlatılmıştır¹.

Antepfıstığında (*P.vera* L.) şimdiye kadar yapılan rejenerasyon çalışmalarının çoğu, tohumlardan ya da genç dokulardan başlatılan çalışmalardır^{2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12}.

Farklı antepfıstığı çeşitlerine ait ('Ohadi' ve 'Kalleghochi') tohumların *in vitro* çoğaltımı konusunda yapılan çalışmalarda, tohumdan yetiştirilen yaklaşık 2 yaşındaki fidanlardan alınan, apikal ve nodal tomurcuklar, eksplant olarak kullanılmıştır. Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında sürgünlerin çoğaltımının, BA, Kin, NAA ve GA₃ hormonlarının varlığında test edildiği ancak, en iyi sonucun 4 mg l⁻¹ BA'nın verdiğini rapor etmiştir. Elde edilen sürgünler ise 2.5 mg l⁻¹ IBA ile destekli MS besi ortamından üretilmiştir^{2,3,4}.

Tohumdan yetiştirilen antepfıstığı fidanlarına ait lateral tomurcuklar 0.1 mg l⁻¹ BA ve IBA ile destekli MS besi ortamında çoğaltılarak, 1.5–2.5 mg l⁻¹ IBA destekli ½ MS besi ortamında ise köklendirilmiştir⁵.

Farklı antepfıstığı türlerine ait (*P.atlantica* x *P.integerrima*) bir hibrit olan UCB–1 ve dişi bir çeşit olan Kerman tohumlarından elde edilen 1–3 yaşındaki fidanların *in vitro* çoğaltımı konusunda yapılan çalışmalarda, en iyi sonucun 0.1 mg l⁻¹ TDZ destekli bir modifiye MS besi ortamından (1 mg l⁻¹ BA + 0.02 mg l⁻¹ IBA) elde edildiği bildirilmiştir⁶.

Antepfıstığı çeşitleri olan Kerman ve Stewart'a ait genç (juvenil) materyaller üzerinde yapılan çalışmada, sürgün çoğaltım oranını 1 mg l^{-1} BA ilave edilen MS besisi ortamından, köklenme oranını ise 0.2 mg l^{-1} IBA destekli MS besisi ortamından elde edildiği bildirilmiştir⁷.

Antepfıstığı genç dokuları üzerinde yapılan somatik embriyogenezis çalışmalarında, 2 mg l^{-1} BA eklenmiş MS besisi ortamında kültüre alınan zigotik embriyolardan, somatik embriyolar elde edildiği rapor edilmiştir^{8,9}. Genç antepfıstığı fidanlarından alınan apikal ve lateral uçlardan elde edilen somatik embriyoların BA ve ABA içeren MS besisi ortamında olgunlaştırıldığı rapor edilmiştir¹⁰.

Pistacia vera L.'nin Kırmızı çeşitlerine ait tohumlarından *in vitro* üretilen nodal eksplantlar kullanılarak, sürgünlerin büyümesi ve farklılaşması üzerine BAP'ın, Kinetinin, GA_3 'in ve gümüş nitratin farklı konsantrasyonları ve kombinasyonları test edilmiş, en iyi rejenerasyon kapasitesi gösteren ortamın 2 mg l^{-1} BA, 0.5 mg l^{-1} GA_3 ve $2-4 \text{ mg l}^{-1}$ AgNO_3 kombinasyonu ile desteklenen MS besisi ortamı olduğu bildirilmiştir¹².

Meyve veren olgun ağaçlardan alınan sürgünlerden başlatılan organogenezis çalışmaları ise; az sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir^{14,15,11,16,17}.

Yetişkin materyalde (4 yaş) kültür başlatılması için genellikle; budama, aşılama, BA ve GA_3 püskürtme yöntemlerinin, olgun ağaçlardaki sürgünlerin yeniden büyümelerini teşvik ettiğini ve bu sürgünlerin kültür başlatma için uygun materyaller oldukları rapor edilmiştir^{14,15}.

Olgun fıstık ağaçlarının eksplantlarından gerçek aksiller sürgün oluşumu üzerine yapılan araştırmada, *in vitro* çoğaltılmış sürgünlerden alınan sürgün

uçlarından 1 mgL⁻¹ BA ve Gamborg vitamini içeren katı MS ortamında kültüre alınarak, çok sayıda sürgün elde edilmiştir. Mikro sürgünlerin köklendirilmesi ise, 2 mgL⁻¹ IBA ile destekli MS besi ortamında gerekleřtirilmiřtir¹¹.

25 yıllık olgun erkek antepfıştığı (*Pistacia vera* L. cv. ‘Atlı’) ağaçlarından alınan apikal tomurcuklar kullanarak kültür başlatılması için BA’nı mutlaka gerekli olduğu ve sürgün proliferasyonu için 0.5–2.0 mgL⁻¹ aralığında BA içeren MS besi ortamının sonuç verdiği bildirilmiştir. *In vitro* rejenere edilen sürgünlerin kklendirilme çalışmalarında ise, 1.0 mgL⁻¹ BA içeren MS besi ortamında 4 cm uzunluğundaki sürgünlerin 2.0 mgL⁻¹ IBA içeren MS besi ortamında kültüre alınmasıyla sağlanmıştır^{16.17}

retimi yapılan türlerden zıyade, yabani olan diğer fışık türlerinin genç dokularından itibaren bitki rejenerasyonu konusunda da çeşitli çalışmalar bulunmaktadır^{3.18.19.20.21.22}.

Bazı antepfıştığı anaçları (*P.khinjuk* Stocks) ile bazı antepfıştığı eşitlerinin (Ohadi ve Kalleghochi) *in vitro* mikroçoğaltılması çalışmalarında, kullanılan sürgün uçlarının, genellikle 1.5–2 cm boyuna ulaşmış, 2–4 yaşına kadar yetiştirilmiş sürgün uçları olduğunu, rapor etmişlerdir. Aynı araştırıcılar, genç ağaçlardan aldıkları sürgün uçlarının çoğaltımını 2–4 mgL⁻¹ Kin, 0.25–1 mgL⁻¹ NAA ve PhG içeren MS besi ortamında gerçekleştirdiklerini, kültüre alınan sürgün uçlarının kklendirilmesini ise modifiye edilmiş 2.5 mgL⁻¹ IBA destekli MS besi ortamında gerçekleştirdiklerini rapor etmiřlerdir³. Yapılan başka bir çalışmada ise, *P.atlantica*’da BA için optimal değerin 1 mgL⁻¹ olduğu, alt kültür için optimum şartlarda sürgün üretiminin, iki haftada bir BA+GA₃+IBA ile desteklenmiş besi

ortamına taze uçların orjinal nodlarıyla birlikte transfer edilmesiyle başarılabileceği bildirilmiştir¹⁸.

Antepfıstığı anaçlarından (*P.mutica* Fisch., & C.A. Mey., *P.khinjuk* Stocks., *P.atlantica* Desf. ve *P.palaestina* Boiss.) alınan apikal ve nodal sürgün uçlarının kültüre alınması ve bu eksplantlardan *in vitro* kültür başlatılması sırasında birçok sorunla karşılaşıldığı ve bunlardan en önemlisinin kahverengileşme olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada, 28 günlük inkübasyon sonunda test ettikleri sitokinin tiplerinin (BA, Kin), kültüre alınan eksplantların organogenez potansiyelleri üzerine belirgin bir etki yaptıkları, kültürlerin başlatılmasından sonra 5 günlük bir süre içerisinde sürgün uzaması ve proliferasyonun görülebilir duruma geldiği ve inokülasyondan 1–2 hafta sonra 1.5 cm uzunluğuna ulaşan sürgünlerde sürgün ucu nekrozunun yaygın olarak tespit edilmiştir¹⁹.

100 mg l⁻¹ hidrolize-kazein, 100 mg l⁻¹ l-askorbik asit ve BA (0.5–4 mg/l) ile desteklenen sıvı MS besi ortamında kültüre alınan *Pistacia atlantica*'nın tohumlarından embriyogenik doku rejenere edildiği rapor edilmiştir. Olgunlaşmamış somatik embriyo gruplarının olgunlaştırılması için agarla katılaştırılmış MS besi ortamına aktarıldığı ve olgunlaştırılan somatik embriyoların besi ortamında çimlendirilmesiyle fidanların elde edildiği rapor edilmiştir²⁰.

Antepfıstığının bir anacı olan buttum'un (*Pistacia khinjuk* Stocks) *in vitro* çoğaltılması için yapılan çalışmada, sürgün proliferasyonunun 0.5–4 mg l⁻¹BA ile destekli MS besi ortamından, %100 köklenme oranının ise 0.5 mg l⁻¹ IBA ile destekli MS besi ortamından elde edildiği rapor edilmiştir^{21,22}.

Ayrıca, *in vitro* mikroaşılama yöntemi ile de antepfıstığının rejenerasyon potansiyeli araştırılmıştır^{23,24,25}.

4 yaşına kadar yetiştirilmiş antepfıstığı *P.vera* L. cv ‘Mateur’a ait sürgünleri, *in vitro* olarak yetiştirdikleri çöğürler üzerine aşlanarak, başarılı bir *in vitro* mikroaşılama metodu geliştirilmiştir²³.

Antepfıstığı *P.vera* L. cv. Mateur’a ait sürgünleri, *in vitro* olarak yetiştirdikleri aynı çeşide ait çöğürler üzerine hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak başarılı bir şekilde aşıladıklarını bildirmişlerdir²⁴.

İstenilen niteliklerde ürün veren seçkin antepfıstığı ağaçlarının *in vitro* klonal çoğaltımı için, mikro aşılama ile rejenerasyonu ya da ara aşılama ile temel kültür basamaklarını tanımlayarak, mikroçoğaltma ile yeni rejenerantların eldesi için bir protokol geliştirdiklerini rapor etmişlerdir²⁵.

Tüm bu çalışmaların yanı sıra, son yıllarda antepfıstığının rejenerasyon potansiyeli adventif organogenezis yöntemi ile de araştırılmaya başlanmıştır²⁶. Yapılan çalışmada, *Pistacia vera* L. cv. Siirt’in *in vitro* kökenli yapraklarından direk bitki oluşumunun, 1 mgL⁻¹ IAA ve 2 mgL⁻¹ BA ile Gamborg vitaminleri eklenmiş MS besisi ortamında gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. 3 cm ve üzeri uzunluğa sahip olan gelişmiş sürgünler 2 mgL⁻¹ IBA ilave edilmiş MS besisi ortamında % 80 oranında köklendirilmiştir²⁶.

2.1.1.1. Organogenezis çalışmaları

Organogenez farklı zaman periyotlarında kök ve sürgünlerin farklılaşmalarını kapsar. Genellikle sürgünler dokularda bulunan sitokinin ile teşvik edilir.

Bu aşamada *Pistacia* cinsi üzerine şimdiye kadar yapılan tüm organogenezis çalışmaları derlenmiştir. Birçok araştırmacı, gerek kültürü yapılan *Pistacia vera* L. 2.3.4.27.5.7.28.29.30 13.11.31.32.17.26. gerekse de yabani antepfıstığı anaçlarının; *Pistacia khinjuk*^{1.27.22}; *Pistacia mutica*¹, *Pistacia atlantica*^{1.27}. *Pistacia palaestina*^{1.27} ve

Pistacia terebinthus^{34,35} üzerinde *in vitro* çoğaltılması için organogenezis çalışmaları yürütmüşlerdir. Ancak bu çalışmaların çoğu^{2,3,4,27,5,7,28,29,12,30} ya bu türlerin tohumlarından ya da gençlik dönemine kadar büyütülen fidanlarından alınan eksplantlardan başlatılmış iken, sınırlı sayıdaki çalışma ise olgun ağaçlardan alınan eksplantlardan başlatılmıştır^{13,32,16,17,26}.

2.1.2. Somatik Embriyogenezis Çalışmaları

Somatik hücre veya dokulardan embriyo oluşumu somatik embriyogenezis olarak adlandırılır. Somatik embriyolar; embriyo benzeri yapılar, adventif veya vejetatif embriyo ya da embriyoid olarak da adlandırılır. Somatik embriyogenezisin iki tipi mevcuttur. Direkt somatik embriyogeneziste; embriyo kallus oluşumu olmadan direkt olarak somatik bir hücreden oluşur. Bu tip embriyogenezis için çok genç bitki doku ve hücreleri kullanılır. İndirekt embriyogeneziste; önce kallus daha sonra bu kallustan somatik embriyolar oluşur³⁶.

Günümüze kadar, antepfıstığında yapılan somatik embriyogenezis çalışmalarının çoğu olgunlaşmamış zigotik embriyolardan başlatılmıştır^{8,9,37,38}. Düşük başarı elde edilmesine rağmen *Pistacia vera* L. cv. 'Siirt' e ait olgun zigotik embriyolarından da somatik embriyogenezis çalışmaları yapılmıştır^{31,39}.

Bunun yanı sıra son yıllarda antepfıstığında somatik embriyoların çimlendirilmesi ve olgunlaştırılması çalışmaları yapılmaktadır^{10, 38,39}.

2.1.3. Mikroaşılama Çalışmaları

Aşılama, iki canlı bitki dokusunun birleştirilmesidir. Aşının iki unsurundan biri; bir veya birkaç tomurcuk içeren bir sürgün parçası, diğeri ise çimlendirilmiş tohum, köklendirilmiş çelik ya da daldırılmış bitkiden elde edilen anaç kısmıdır.

Mikro aşılama, ya *in vivo* ya da *in vitro* yapılabilir. *İn vivo* mikro aşılamada çoğaltılması istenilen anaç, bitkiden alınan küçük bir çeliğin, sera şartlarında veya bahçelerde yetiştirilen bir anaç üzerine aşılmasından oluşur. Diğer taraftan *in vitro* mikro aşılamada, mikropropagasyon ile çoğaltılan mikro çeliklerin aseptik olarak çimlendirilen tohumlardan elde edilen anaçların üzerine aşılama söz konusudur.

Antepfıstığının *in vitro* mikraşılanması için Siirt antepfıstığı (*Pistacia vera* L. cv. Siirt) çeşidinin budanmış ağaçlarının, köke en yakın kısımdaki yeni apikal sürgünlerden alınan eksplantlarını, 1 mgL⁻¹ BA, 100 mgL⁻¹ kazein hidrolizat, içeren MS besi ortamında rejenere etmişlerdir. Çalışmada *in vitro* mikro aşılama metodunun, dar meristemli yarma mikro aşı olduğu belirlenmiş, en yüksek mikro aşı başarısının, %56.85 tutma oranı ile 2–4 mm uzunluğundaki mikro çeliklerden elde edildiği rapor edilmiştir. Doğrudan kullanılan sürgün uçlarına göre *in vitro* destekli sürgün uçlarında daha iyi bir mikro çelik gelişimi görülmüş, mikro aşıların, köklenme ortamında kültüre alındığı zaman, zayıf bir aksiller sürgün gelişimi ve yavaş bir gelişme gözlenmiştir²⁵.

2.2. SİTOGENETİK ÇALIŞMALAR

Bu bölümde antepfıstığı ile ilgili şimdiye kadar ülkemizde ve yurt dışında yapılan sitogenetik çalışmalar derlenmiştir. *Pistacia* cinsinin ıslah tarihi incelendiğinde, ıslah ve genetik çalışmaların hem sitogenetik hem de moleküler düzeyde açılım gösterdiği görülmektedir.

Tür üzerinde yapılan ilk sitogenetik çalışmalar türün kromozom sayısının tespiti yönündeki çalışmalardır^{40.41.13.42.43.44.45.46.47.48}. Bu anlamda bitkilerin kromozom veya ploidi düzeylerinin belirlenmesi amacıyla değişik çalışmaların yapıldığı ve değişik metotların kullanıldığı görülmektedir. Bunların başında, doğrudan kromozomların sayısının belirlendiği kök uçlarında ezme preparat yöntemi ile kromozom sayımları gelmektedir.

Zohary⁴⁰, *Pistacia* cinsine yönelik kromozom sayılarını tespit etme yönündeki ilk çalışmaları gerçekleştirmiş ve yaptığı çalışmada türlerin diploid kromozom sayılarını sırasıyla *P.lentiscus*'un $2n=24$, *P.atlantica*'nın $2n=28$ ve *P.vera*'nın ise $2n=30$ olduğunu saptamıştır.

Barghchi ve Alderson⁴¹ ile Ehsanpour⁴² ve ark.'nın yaptıkları çalışmada *P.vera*'nın diploid kromozom sayısının $2n=32$ olduğunu rapor etmişlerdir.

Onay¹³, materyal olarak *P.vera*'nın tohumlarından elde ettiği kökleri türün kromozom sayısını belirleyebilmek için kullanmış ve yaptığı uygulamada kök uçlarını öncelikle ilk işlem çözeltisi olarak 1-monobromonaftalen içerisinde 4 saat boyunca oda sıcaklığında bekletmiş, daha sonra fiksasyon işlemini Farmer fiksatifi içerisinde 24 saat oda sıcaklığında bekleterek gerçekleştirmiş, hidroliz işlemini 5 N HCl içerisinde birkaç dakika oda sıcaklığında bekleterek ve son olarak boyama işlemini ise %3'lük lacto propiyonik orsein içerisinde 5 dakika bekleterek

tamamlamıştır. İnceleme sonunda türün diploid kromozom sayısının $2n=30$ olduğunu ve ploidi seviyesine rastlamadığını da rapor etmiştir.

İran’da yetişen bazı antepfıstığı tür ve alt türlerinin ekolojik olarak dağılımları ve karyotipleri üzerine yapılan araştırmalarda sırasıyla diploid kromozom sayıları *P.vera* için, $2n=30$, *P.khinjuk* için $2n=24$ ve bir alt tür olan *P.atlantica* için $2n=28$ olarak belirlenmiştir^{43,44,45}.

Fasihi Harandi ve Ghaffari⁴⁶, türün mayotik ve mitotik özelliklerini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada, mayoz bölünme safhalarını incelemek amacıyla materyal olarak, İran’da yetişen *P.vera*’ya ait çiçek tomurcuklarını, mitotik analizler için ise kök uçlarını kullanmışlardır. Çalışmada, mikrosporlarda mayoz bölünme başladıktan sonra, tomurcuklar 24 saat oda sıcaklığında Piennar solüsyonunda (6br %96’lık etanol: 3br kloroform: 2br propiyonik asit) fiske edilmiş, daha sonra asetokarmin boyasında ezme preparat yöntemi kullanılarak inceleme yapılmıştır. Kök uçları ise önce %0.5 kolşisin içerisinde ön muameleye bırakılmış, ardından 3 saat Piennar solüsyonunda fiske edilmiş ve 1N HCl içerisinde 12 dk. hidroliz edildikten sonra %2’lik asetokarmin boyasında ezme preparatlar haline getirilmiştir. Sonuç olarak mayotik ve mitotik analizlerin türün diploid kromozom sayısını $2n=30$ olarak doğruladığını bildirmişlerdir.

Ghaffari ve Fasihi-Harandi⁴⁷, İran’da yetişen *P.atlantica*’nın alt türü olan cabulica, kurdica ve mutica ile *P.khinjuk* ve *P.vera* türleri üzerinde yaptıkları kromozom sayımı ve karyotip analizi çalışmalarında; *P.khinjuk*’un $2n=24$ kromozom içerdiğini, bu kromozomların 7 çiftinin submetasentrik, 5 çiftinin ise metasentrik sentromerli olduğunu bildirmişlerdir. *P.atlantica*’nın incelenen alt türlerinin tümünde kromozom sayısının $2n=28$ olduğunu, bunlardan 3 çiftinin metasentrik 10

çiftinin submetasentrik ve 2 çiftinin ise akrosentrik sentromerli olduğunu rapor etmişlerdir. Son olarak *P.vera*'nın ise $2n=30$ kromozom taşıdığını bunlardan 4 çiftin metasentrik, 8 çiftin submetasentrik ve 3 çiftin de akrosentrik sentromer yapısında olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan incelemelerin tümünde metasentrik çiftlerden birinin heterokromatin yapı gösterdiğini ve bu kromozomların cinsiyet kromozomları olabileceğini de belirtmişlerdir. İncelenen tür ve alt türlerin karyolojik incelemesinde kök uçlarını eksplant kaynağı olarak kullanmışlardır. Kök uçlarını %0.5'lik kolşisin ile 3 saat 20°C 'de muamele ederek 24 saat Piennar solüsyonunda oda sıcaklığında fiske etmişlerdir. Boyama işlemini Fulgen ile yaparak %2'lik asetokarmin ile ezme preparat hazırlanmıştır.

İla ve ark⁴⁸, *Pistacia* cinsine ait türlerin kromozom sayımını belirleyebilmek amacıyla bir protokol geliştirmiş ve çalışmalarında cinse ait 4 türün (*P.vera*, *P.terebinthus*, *P.atlantica* ve *P.eurycarpa*) kök uçlarından kromozom sayılarını $2n=30$ olarak tespit etmişlerdir. Çalışmada, *Pistacia* cinsine ait yukarıda belirtilen 4 türün tohumlarından elde edilen kökler, ilk işlem çözeltisi olarak 1-bromonaftalen içerisinde (22 saat- 24°C) bekletilmiş, fiksasyon işlemi için Karnoy fiksatif (24 saat – 24°C) kullanılmış, hidroliz işlemi 1 N HCl içerisinde (25 dk. – 60°C) yapılmış ve boyama işlemi ise Fuelgen içerisinde 2 saat karanlıkta bekletilerek yapılmıştır.

Ghaffari ve ark⁴⁹, *P.atlantica*, *P.khinjuk* ve *P.vera* ya ait kök uçlarından kromozom sayılarını belirlemek amacıyla yaptıkları bir diğer çalışmada, daha önceki çalışmalarında geliştirdikleri yöntemi⁴⁷ kullanarak, bu türlere ait diploid kromozom sayılarını, *P.atlantica* için $2n=28$, *P.khinjuk* için $2n=24$ ve *P.vera* için ise $2n=30$ olarak bildirmişlerdir.

Pistacia cinsi üzerinde moleküler düzeyde yapılan çalışmalar ise daha çok filogenetik (türler arasındaki akrabalıkları belirleme) ve morfolojik seviyede türü tanıma amaçlı olarak yapılan çalışmalardır^{50,51,52,53,54,55,56,57}. Bu çalışmalara göre, moleküler çalışmaların kaynağını üretildikleri bitkilerin DNA'ları oluşturmaktadır. Moleküler markörler PCR temelli ve hibridizasyon temelli olmak üzere ikiye ayrılırlar. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SSR (Simple Sequence Repeats) teknikleri PCR temelli olup, son yıllarda yaygın olarak tercih edilen moleküler markör teknikleridir.

Louskas ve Pontikis⁵⁰, *P.lentiscus*, *P.terebinthus* ve *P.vera* türlerine ait 10 farklı enzimin polen izozim örneklerini filogenetik ilişkilerini belirlemek amacıyla çalışmışlardır. Sonuç olarak *P.terebinthus* ile *P.vera* arasındaki benzerliğin *P.lentiscus* ile *P.vera* arasındaki benzerlikten daha yakın olduğunu belirlemişlerdir.

Parfitt ve Badenes⁵¹, *Pistacia* cinsine ait 10 türü ilk defa RFLP tekniğini kullanarak moleküler düzeyde inceleyerek sınıflandırmışlardır. Kloroplast DNA profillerini baz alarak cinsi 2 seksiyon üzerinde karakterize etmişlerdir. Terebinthus seksiyonuna *P.atlantica*, *P.chinensis*, *P.khinjuk*, *P.integerrima*, *P.terebinthus* ve *P.vera*'yı; Lentiscus seksiyonuna ise *P.lentiscus*, *P.mexicana*, *P.texana* ve *P.weinmannifolia* türlerini dâhil etmişlerdir.

Kafkas ve ark.⁵², morfolojik veri ve RAPD tekniğini kullanarak yabani *Pistacia* türlerinin taksonomik akrabalıkları ve genetik varyasyonlarını araştırmışlardır. Moleküler düzeydeki çalışmalar sonucunda *P.terebinthus*'un cins içinde en irak tür olduğunu, *P.atlantica* ve *P.eurycarpa*'nın ise birbirine en yakın tür çifti olduğunu bildirmişlerdir.

Kafkas ve Perl-Treves⁵³, RAPD tekniğini baz alarak *P.atlantica*, *P.eurycarpa*, *P.khinjuk*, *P.lentiscus*, *P.mexicana*, *P.palaestina*, *P.integerrima*, *P.terebinthus* ve *P.vera* türlerinin DNA parmak izi analizini gerçekleştirmişlerdir. Türleri, filogenetik analizleri sonucunda 2 ana gruba ayırarak ilk gruba; *P.eurycarpa*, *P.khinjuk*, *P.integerrima* ve *P.vera* türlerini, ikinci gruba ise *P.lentiscus*, *P.mexicana*, *P.palaestina* ve *P.terebinthus* türlerini dâhil etmişlerdir. Ayrıca, *P.palaestina*'nın *P.terebinthus*'un bir çeşidi olduğunu bildirmişlerdir.

Kafkas ve ark.⁵⁴, RAPD, ISSR ve AFLP yöntemlerini kullanarak Türkiye'nin gen kaynaklarında bulunan 69 antepfıstığı çeşidini tanımlamışlar ve bunlar arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Çalışmada, antepfıstığı çeşit ve genotipleri bakımından gruplara ayrılmıştır.

Kafkas ve ark.⁵⁵, 17 yabani antepfıstığı (*P.vera*) ve 3 kültür çeşidinin moleküler karakterizasyonunu AFLP tekniğini kullanarak yapmışlardır. Çalışmadan elde edilen verilerde 17 yabani Afgan antepfıstığı çeşidi bölgelerine göre gruplanmış ve 3 kültür formundan ayrılmıştır.

Afzadi ve ark.⁵⁶ yaptıkları çalışmada AFLP tekniğini kullanarak antepfıstığına ait 45 genotipi genetik farklılıkları bakımından değerlendirmiştir. Analiz sonuçlarına göre, antepfıstığı genotiplerinin 4 grup altında toplandığını ve ticari kültürü yapılan genotiplerin I. ve II. gruplarda toplanarak, yabani tiplerden ayrıldığı rapor edilmiştir.

Basha ve ark.⁵⁷, Suriye'de yetişen 37 bahçeden topladıkları 114 antepfıstığında morfolojik ve moleküler düzeyde analiz yapmışlardır. Moleküler analiz için AFLP yöntemini uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, 25 dişi antepfıstığı

çeşidi tespit edilmiş ve bunlardan bazılarının daha önce tespit edilen çeşitler arasında yer almadığı bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

- 1- Barghchi, M. *In vitro Propagation of Pistacia Species*. PhD Thesis, Nottingham University, UK, 1982.
- 2- Barghchi, M.; Alderson, P.G. *In vitro Propagation of Pistacia vera L. From Seedling Tissues*. *J. Hort. Sci.*, **1983a**, 58, 435–445.
- 3- Barghchi, M.; Alderson, P.G. *In vitro Propagation of Pistacia Species*. *Acta Hort.*, **1983b**, 131, 49–60.
- 4- Barghchi, M.; Alderson, P.G. *In vitro Propagation of P.vera L. and Commercial Varieties of Ohadi and Kelleghochi*. *J. Hort. Sci.*, **1985**, 60, 423–440.
- 5- Yang, Z.; Ludders, P. *In vitro Propagation of Pistachio (Pistacia vera L.)*. *Gartenbauwissenschaft*, **1993**, 59 (1), 30–34.
- 6- Parfitt, D.E.; Almehdi, A. *Use of High Co₂ Atmosphere and Medium Modifications For The Successful Micropropagation of Pistachio*. *Sci. Hort.* **1994**, 56, 321–329.
- 7- Dolcet Sanjuan, R.; Claveria, E. *Improved Shoot-Tip Micropropagation of Pistacia vera L. and The Beneficial-Effects of Methyl Jasmonate*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **1995**, 120, 938–942.
- 8- Onay, A; Jeffree, C.E.; Yeoman, M.M. *Somatic Embryogenesis in Cultured Immature Kernels of Pistachio, Pistacia vera L.*, *Plant Cell Rep.*, **1995**, 15, 192–195.
- 9- Onay, A.; Jeffree, C.E.; Yeoman, M.M. *Plant Regeneration From Encapsulated Embryoids and an Embryogenic Mass of Pistachio*. *Plant Cell Rep.*, **1996**, 15, 723–726.
- 10- Onay, A; Jeffree, C.E; Theobald, C; Yeoman, M.M. *Analysis of The Effects of Maturation Treatments on The Probabilities of Somatic Embryo Germination and*

Embling Development in Pistachio, Pistacia vera L. Using a Logistic Regression Method. Plant Cell Tiss. Org. Cult., **2000**, 60 (2), 121–129.

11- Onay, A. *Micropropagation of Pistachio From Mature Trees*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **2000a**, 60, 159–162.

12- Ozden-Tokatlı, Y.; Ozudogru, E.A.; Akcin, A. *In vitro Response of Pistachio Nodal Explants to Silver Nitrate*. *Sci. Hort.*, **2005**, 106, 415–426.

13- Onay, A. *In vitro Organogenesis and Embryogenesis of Pistachio, Pistacia vera L.* PhD Thesis, University of Edinburgh, UK, 1996.

14- Barghchi, M.; Martinelli, A. *In vitro Propagation of Mature Pistacia vera Varieties of Kerman (Female) and Peter's (Male) Pistachio*. 41st Easter School Symp. *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Univ. of Nottingham, Abst 75. 1984.

15- Gonzales, A.; Frutos, D. *In vitro Culture of Pistacia vera L. Embryos and Aged Tree Explants*. *Nato Asi Series A.*, **1990**, 186, 335–338.

16- Tilkat, E. *Erkek Antepfıstığı Pistacia vera L. cv. 'Atlı' Ağaçlarının Mikroçoğaltılması*, Doktora Tezi. Dicle Üniversitesi. 144 sayfa, Diyarbakır-Türkiye, 2006.

17- Tilkat, E.; Onay, A.; Yıldırım, H.; Ozen, H.C. *Micropropagation of Mature Male Pistachio Pistacia vera L.* *J. Hort. Sci. & Biotech.* **2008**, 83(3), 328–333.

18- Bustamante-Garcia, M.A. *Micropropagation and Rejuvenation of Pistacia Species and The Mechanism by Which Light Influences Root Initiation*. PhD Thesis, University of California, Davis, USA. 1984.

19- Barghchi, M. *In vitro Micropropagation of Pistacia Rootstocks*, *Proceeding of The International Plant Propagators Society*, **1986a**, 35, 334–337.

- 20- Onay, A. *Histology of Somatic Embryo Initiation and Development in Pistachio (Pistacia vera L.)*. *Turkish Jour. Bot.*, **2000c**, 24, 91–95.
- 21- Tilkat, E. *Buttum (Pistacia khinjuk Stocks)’un in vitro mikroçoğaltılması*, Yüksek Lisans Tezi. Dicle Üniversitesi. 73 sayfa. Diyarbakır-Türkiye, 2003.
- 22- Tilkat, E.; Isikalan, Ç.; Onay, A. *In vitro Propagation of Khinjuk Pistachio (Pistacia Khinjuk Stocks) Through Seedling Apical Shoot Tip Culture. Prop. Orn. Plants*, **2005**, 5(3), 124–128.
- 23- Abousalim, A. *Micropropagation and Micrografting of Pistachio (P.vera L. and P. atlantica Desf.)*. PhD Thesis, Department of Horticulture, Wye College, University of London, UK. 1990.
- 24- Chatibi, A.; Kchouk, M.L.; Mliki, A.; Ghorbel, A. *Micrografting of Pistachio (Pistacia vera L.) cv. Mateur*, In: 10. Grempa Seminar, Meknes (Morocco), 14-17 Oct 1996, Publisher: Ciheam-Iamz, Zaragoza (Spain). 1998.
- 25- Onay, A.; Piring, V.; Tilkat, E.; Akturk, Z.; Yıldırım, H. *Somatic Embryogenesis of Pistachio From Female Flowers*, *J. Hort. Sci. & Biotech.* **2004**, 79 (6), 960–964.
- 26- Tilkat, E.; Onay, A. *Direct Shoot Organogenesis From In vitro Derived Mature Leaf Explants of Pistachio. In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, **2009**, 45, 92–98. DOI: 10.1007/S11627–008–9168–4.
- 27- Barghchi, M. *Control of in vitro Shoot Tip Necrosis in Pistachio (Pistacia vera L.)*. In: Plant Physiology Division Biennial Report. Palmerston North Department of Scientific and Industrial Research (D.S.I.R). Pp.52. 1986b.
- 28- Ozden-Tokatlı, Y.; Ozudogru, E.A.; Akcin, A. *Enhancement of Regeneration in Pistachio (Pistacia vera L.) with Silver Nitrate*. In: *Fifth International Symposium in*

The Series "Recent Advances in Plant Biotechnology", September 7–13, 2003, Abstract, p.20, High Tatras, Slovak Republic.

29- Ozden-Tokatlı, Y.; Ozudogru, E.A.; Akcin, A. *In vitro Regeneration of Pistachio (Pistacia vera L.) through Organogenesis: Effect of Silver Nitrate, Polyvinylpyrrolidone and Citric Acid.*, *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **2004**, 40, 46-A.

30- Ozden-Tokatlı, Y.; Ozudogru, E.A.; Akcin, A. *Optimization of an Efficient Micropropagation Protocol and Assessment of Plant Genetic Fidelity by RAPD Markers in Pistachio (Pistacia vera L.)*. *Adv. Hort. Sci.* **2006**, 20(2), 162–169.

31- Onay, A. *Somatic Embryogenesis in Cultured Kernels of Pistachio, Pistacia vera L. cv Siirt*. Proceedings of The 2nd Balkan Botanical Congress. Volume II, Istanbul, 2000b, 109–115.

32- Onay, A.; Işıkalın, Ç.; Adıyaman, F. *Micropropagation of Pistachio*. Edt: By R.E. Litz In: *Biotechnology of Fruit and Nut Crops.*, 2003.

33- Mederos Molina, S.; Lopez Carreno I. *Control of Organogenesis In vitro of Pistacia atlantica Desf. Rootstock*. *Acta Hort. (ISHS)*, **1991**, 289, 135–136.

34- Pontikis, C.A. *Propagation of Pistacia terebinthus L. Plant Propagator*. **1984**, 30(3), 14–15.

35- Gannoun, S.; Lionakis, S.M.; Gerasopoulos, D. *Aspects of in vitro Culture of Pistacia terebinthus and Pistacia vera.*, *Acta Hort.*, **1995**, 419, 201–206.

36- Hatipoğlu, R. *Bitki Biyoteknolojisi*. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190, Ders Kitapları Yayın No: A–58. 176 S. Adana, 1999.

37- Onay, A.; Jeffree, C.E. *Somatic Embryogenesis in Pistachio*. Edt: S. Mohan Jain, Pramod K. Gupta, Ronald J. Newton (Forestry Sciences In: *Somatic Embryogenesis*

- in Woody Plants*). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. Chapter 10, Section B, **2000**, 6, 361-390.
- 38- Onay, A.; Tilkat, E.; Yıldırım, H.; Suzerer, V. *Indirect Somatic Embryogenesis From Mature Embryo Cultures of Pistachio, Pistacia vera L. Prop. Orn. Plants*, **2007a**, 7(2), 68-74.
- 39- Onay, A.; Tilkat, E.; Yıldırım, H. *Effect of Genotype on Somatic Embryogenesis in Pistachio (Pistacia vera L.). Prop. Orn. Plants*, **2007b**, 7(4), 204-209.
- 40- Zohary, M. *A Monographical Study of the Genus Pistacia*, *Pal. J. Bot.*, **1952**, 5, 187- 228.
- 41- Barghchi, M.; Alderson, P.G. *Pistachio (Pistacia vera L.)*. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.5. Trees II*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989, p. 68-98.
- 42- Ehsanpour, A.A; Tavassoli, M.; Arab, L. *Sex Determination of Pistacia vera L. Using ISSR Markers. Malays. Appl. Biol.* **2008**, 37(2), 25–28.
- 43- Fasihi Harandi, O. *Genetic Studies of Wild and Cultivated Pistachio in Iran*. Msc Thesis in Plant Breeding, College of Agriculture, Azad University of Karaj, 1996.
- 44- Fasihi Harandi, O.; Behboodi, B.; Abd-Mishani, C.; Ghaffari, M. *The Cytogenetic Studies and Isozyme Analysis of Iranian Pistachio*. In: *Proc. 5th Iranian Biology Congress*, College of Sciences, University of Tabriz, Tabriz (Iran), 28–30 August, 1996.
- 45- Fasihi Harandi, O. and Shahsavan Behboodi, B. *Botany, Distribution and Ecology of Pistacia Genus in Iran*. In: *Proc. 6th Iranian Biology Congress*, College of Sciences, University of Kerman, Kerman (Iran), 25–27 August **1997**.

- 46- Fasihi Harandi, O.; Ghaffari, S.M. *Chromosome Studies on Pistachio (Pistacia vera L.) from Iran. Cahiers Options Méditerranéennes*, **2001**, 56, 35–40.
- 47- Ghaffari, S.M.; O. Fasihi Harandi. *Chromosome Counts and Assessment of Two Heterochromatic Chromosomes in Some Species of Pistacia L. From Iran, Acta Hort.*, **2002**, 591, 389–393.
- 48- İla, H.B.; Kafkas, S.; Topaktas, M. *Chromosome Numbers of Four Pistacia (Anacardiaceae) Species. J. Hort. Sci. & Biotech.*, **2003**, 78, 35-38.
- 49- Ghaffari, S.M.; Shabazaz, M.; Behboodi, B.S. *Chromosome Variation in Pistacia Genus* 13. Meeting of the Mediterranean Research Group for Almond and Pistachio, Mirandela(Portugal), 1-5 June, 2003.
- 50- Louskas, M.; Pontikis, C.A. *Pollen Isozyme Polymorphism in Types of Pistacia vera and Related Species as Aid in Taxonomy, J. Hortic. Sci.*, **1979**, 54, 95–102.
- 51- Parfitt, D.E.; Badenes, M.L. *Phylogeny of the Genus Pistacia as Determined from Analysis of the Chloroplast Genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 7987–7992.
- 52- Kafkas, S.; Cetiner, S.; Perl-Treves R. *Development of Sex-Associated RAPD Markers in Wild Pistacia Species., J. Hortic. Sci & Biotech.*, **2001**, 76, 242–246.
- 53- Kafkas, S.; Perl-Treves, R. *Interspecific Relationship in Pistacia Based on RAPD Fingerprinting, Hort. Sci.*, **2002**, 37, 168–71.
- 54- Kafkas, S.; Özkan, H.; Ak, B.E.; Acar, I.; Atli, H.S.; Koyuncu, S. *Detecting Dna Polymorphism and Genetic Diversity in a Wide Pistachio Germplasm: Comparison of AFLP, ISSR and RAPD Marekers. Journal of American Society for Horticultural Science.*, **2006a**, 131(4), 522–529.

- 55- Kafkas, S.; Kaska, N.; Wassimi, A.N.; Padulosi, S. *Molecular Characterisation of Afghan Pistachio Accessions by Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs)*. *J. Hort. Sci. & Biotech.*, **2006b**, 81(3), 864–868.
- 56- Afzadi M.A, Tabatabaei, S.B.E.; Mohammadi, A.M.; Tajabadipur, A. *Comparison of Genetic Diversity in Species and Cultivars of Pistachio (Pistacia Sp. L.) Based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Markers*, *I.J.B.*, **2007**, 5(3), 147–152.
- 57- Basha, I.A.; Padulosi, S.; Chabane, K.; Hadj-Hassan, A.; Dulloo, E.; Patnotta, M.A.; Porceddu, E. *Genetic Diversity of Syrian Pistachio (Pistacia vera L.) Varieties Evaluated by AFLP Markers*. *Genet Resour Crop Evol.* **2007**, 54, 1807–1816.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

Bu çalışma 2005-2009 yıllarında Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada antepfıstığının Siirt çeşidine ait erkek ve dişi antepfıstığı sürgünleri ve dişi antepfıstığına ait tohumları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan materyaller 2005 yılında Mayıs-Haziran ayları arasında Gaziantep Fıstık Araştırma Enstitüsü araştırma bahçelerinden alınmıştır.

3.1.1. Antepfıstığı Hakkında Genel Bilgiler

3.1.1.1. Kültür tarihi ve dünya üzerindeki yayılışı

Dünyanın en eski sert kabuklu meyvelerden biri olan Antepfıstığı'nın kökeni, ilk olarak Etiler'in yerleştiği Güney Anadolu'ya kadar uzanmaktadır. Antepfıstığının tohumları 1. yüzyılın başlarında, en önemli doğal yetiştirme alanlarından biri olan Suriye'den İtalya'ya götürülmüş ve diğer Akdeniz ülkelerine de yayılarak yetiştirilmiştir. Besin değerinin yüksek olmasının yanında lezzeti; bu ürünün tarih boyunca, dünyanın birçok ülkesine yayılmasına ve farklı bölgelerde yetiştirilmesine neden olmuştur. İlk kez 19.yy.'ın başlarında ise Kaliforniya ve ABD'ye götürülen antepfıstığının farklı fıstık çeşitleri kültüre alınmıştır^{1,2}. Vavilov'a göre, Antepfıstığı'nın iki gen merkezi bulunmaktadır. Bunlar; Hindistan'ın kuzeyi, Afganistan, Tacikistan ve Pakistan'ı içine alan Orta Asya Gen Merkezi ile Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkmenistan'ı kapsayan Yakın Doğu Gen Merkezi'dir³. Ülkemiz özellikle de Güneydoğu Anadolu Bölgesi, yakın doğu gen merkezi içerisinde yer almaktadır.

3.1.1.2. Bitki sistematikiindeki yeri

Antepfistikiğinin üyesi bulunduğı *Anacardiaceae* familyası 82 cins ve 700'den fazla türü kapsamaktadır⁴. Cins kategorisinde detaylı bir taksonomik çalışma ilk kez Zohary⁵ tarafından yapılmıştır. Araştırmacı, 11 *Pistacia* türü tanımlamış ve *Pistacia* türlerini 4 seksiyona (*Lentiscella*, *Lentiscus*, *Butmela* ve *Terebinthus*) bölmüştür (Çizelge 1). *P.mexicana* HBK, ile *P.texana* Swingle türlerini *Lentiscella*; *P.lentiscus* L., *P.sapote* Burnat., ile *P.weinmannifolia* Poisson türlerini *Lentiscus*; *P.atlantica* Desf. türünü *Butmela* ve *P.chinensis* Bge., *P.khinjuk* Stocks, *P.palaestina* Bois., *P.terebinthus*, ile *P.vera* L. türlerini de *Terebinthus* seksiyonları altında toplamıştır.

3.1.1.3.Genel morfolojik ve biyolojik özellikleri

Antepfistikiği 8–10 m.'ye kadar yükselebilen, tek gövdeli yayvan tür bir taç teşkil eder (Şekil 3.1.1.3). Kök kazık şeklinde, çok dallı, uzunluğu 5-6m ye kadar varabilir. Dallar; gri renkli ve seyrek. Bu meyve türünde başlıca üç dal şekline rastlanır:

—Odun Dalları: Üzerinde sadece sürgün tomurcuğı bulunur. Ağacın büyümesini ve taç oluşumunu sağlar.

—Meyve Dalları: Uç bölümünde sürgün, yan bölümünde meyve tomurcuğı bulunur. Bu dallar verimlilik bakımından oldukça önem taşır.

—Karışık Dallar: Yan bölümünde hem sürgün hem de meyve tomurcuğı bulunur.

Yaprak; bileşik, 3–5 bazen 7 yaprakçıktan oluşur. Karşılıklı dizilmiş olan yapraklar tüysüz ve etli, mızrağımsı-oval şeklinde ve kenarları düzdür. Çiçekler dioik ve brakte ile birlikte bileşik salkımlar üzerinde yer alır. Dişi çiçekte salkım

daha büyük, seyrek yapılı, geniş, kısa saplı, 120–150 adet bir arada bulunurken, 1 pistilli olup, stıgması büyüktür. Erkek çiçekte ise salkım daha küçük, sık yapılı, dar, çok kısa saplı, topak görünüşlü ve 200–600 adet bir arada olup, 5–6 stamen birlikte bulunur. Meyve sert çekirdekli (drupa) olup, bir yıllık dalda oluşur. Ekzokarp açık krem, mezokarp başlangıçta etlimsi sulu, olgunlaştıkça derimsi, endokarp ise sert ve fildişi rengindedir^{1,2}.

Erkek ve dişi antepfıstığı ağaclarının birbirinden ayırt edilmesi konusunda kesin bir yargı bulunmamasına rağmen ayırt etmede yararlanılan bazı hususlara değinilebilir;

—Dişi ağaçta taç sistemi yanlara doğru genişlemektedir. Dalcıklar ile dallar arasındaki açı geniştir. Erkek ağaçlarda ise, bu açı daha dar olup dikine gelişen bir dal sistemi oluşur.

—Dişi ağacların yaprakları, genellikle 3–5 bazen 7 yaprakçıktan oluşur. Erkek ağacların yaprakları ise daha çok 5–7 yaprakçıktan oluşur. Ender olarak bir yaprağın 3 yaprakçıktan oluştuğı erkek fertlere de rastlamak mümkündür.

—Dişi ağacların çiçek gözleri, erkek ağacların çiçek gözlerine oranla yaklaşık olarak 2–3 kat daha küçüktür.

—Dişi çiçek salkımları seyrek yapılı, daha uzun ve daha geniştir. Erkek çiçek salkımları ise, daha sıkı yapılıdır. Genel olarak 5–6 erkek organ (stamen) bulundurulur⁶.

3.1.1.4. Döllenme biyolojisi

Antepfıstığı dioik bir bitkidir. Eşey organlarında dikogami olduğu için yabancı tozlaşma gözlenir. Protandri (tezerlik) yaygındır. Bu nedenle, dişi çiçekler döllenmeye hazır duruma gelmeden, erkek çiçeklerde anterler patlayarak polenleri

saçarlar. Anemofil olduğundan tozlaşma şekli rüzgâr ile olmaktadır ve dölleme, tozlaşmadan yaklaşık olarak 20–28 saat sonra meydana gelmektedir^{1,2}.

3.1.1.5. Ekolojik istekleri

Sıcak ılıman iklim bitkisidir. Antepfıstığı yetiştiriciliği çok özel bir iklim gerektirir. Bu ağaçların, yazın 98–110 gün boyunca 30°C ve üstü, soğuk kış günlerinde ise en az 1000 saat 7°C ve altındaki sıcaklıkta soğuklamaya ihtiyaçları vardır. Bu nedenle dünyada fıstık yetiştiriciliği yapılan yerler sınırlıdır. Akdeniz kıyısında yetersiz soğuklanmadan zarar görebilir. Çiçeklenmeden meyvenin olgunlaşmasına kadar sıcaklık toplamı yetersiz olursa içi dolmaz, böylece sert kabuk çıtlamaz ve dış kabuk zor ayrılır. İlkbaharda yağışın az olduğu yerde sulama, meyveleri irileştirir, verimi artırır. Sıcak ve kuru rüzgâr (Samyeli), dışı tepesini kurutur, döllemeyi azaltır. Ağır ve killi toprak hariç her toprakta yetişebilir. İran ve A.B.D.’deki yetiştiriciliğin tamamı sulu koşullarda ve verimli taban arazilerde yapılmaktadır. Buna karşın ülkemizde antepfıstığı yetiştiriciliğinin sadece % 37,5’u sulanabilir koşullarda, geri kalan % 62,5’u ise tamamen kuru şartlar altında yapılmaktadır⁷.

3.1.1.6. Sağlık açısından önemi

Antepfıstığı gerek üretim gerekse dış satım kapasitesi yönünden ülkemizin önem arz eden ürünlerinden birisidir. Günde 10–12 adet yenilen iç antepfıstığı, vücudun günlük yağ ihtiyacını karşılayabilmektedir. 100 gr antepfıstığı vücudun günlük protein, vitamin B₁ ve fosfor ihtiyacının %35’ini karşılayabilmektedir (Çizelge 3.2.1.2.). Antepfıstığında kolesterol yoktur. Kandaki kolesterol seviyesini düşürür. Protein yönünden 2 kat, fosfor yönünden 4 kat sığır etinden daha üstündür. Vitamin E, B, C kompleksi bakımından zengindir. İnce bağırsakta glikoz emilimini

azaltır ve kan şekerinin yükselmesini önler. 100 gr antepfıstığında 4.0 gr posa bulunur. Posa miktarı yönünden pirinç, patates ve buğdaydan (0.3 gr) daha üstündür⁸.

3.2. METOT

Çalışma temel olarak mikroçoğaltım uygulamaları ve sitogenetik çalışma şeklinde iki grup olarak planlanmıştır. Mikroçoğaltım çalışmalarında, erkek ve dişi antepfıstığı apikal tomurcuklarından kültür başlatılması, sürgün çoğaltımı ve köklendirme aşamaları araştırılmaya çalışılmıştır. Sitogenetik çalışmalarda ise; elde edilen kökler aracılığı ile erkek ve dişi bireylerin genetik farklılıkların belirlenmesi, kromozom sayımları, kromozomal yapı farklılıklarının ortaya çıkarılması amacıyla karyotip analizi çalışmaları yapılmıştır.

3.2.1. Mikroçoğaltım Çalışmaları

Bitkiyi meydana getiren canlı hücrelerden herhangi biri uygun koşulların sağlanması halinde, tekrar bölünerek ve farklılaşarak tüm bitkiyi oluşturabilecek genetik bilgiye ve rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Bitkisel dokularda gözlenen bu özel yetenek, totipotensi olarak adlandırılmaktadır. Bitki doku kültürü işlemlerinde ve ıslah çalışmalarında kullanılan bitki rejenerasyonu yani bitkinin hücre, doku ve organ gibi kısımlarının klonlanması, doku kültürünün en önemli kısmını oluşturur. Organize meristemlerden, henüz olgunlaşmamış veya olgunlaşmasını tamamlamış somatik hücrelerden direkt (organogenesis veya somatik embriyogenesis) veya indirekt (kallus, protoplast vb.) yollarla bitkilerin çoğaltılması ve köklendirilmesi işlemine ise, genel olarak mikroçoğaltım denilmektedir. Çoğunlukla eksplant olarak tepe (apikal) ve koltuk altı (aksiler) tomurcuklar seçilmekle birlikte, farklı organlar da eksplant olarak kullanılabilir⁹. Mikroçoğaltımın genel olarak bitki yetiştiriciliği ve genetiği bakımından önemi ve avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- a) Hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi
- b) Kitlesel üretimde aşağıdaki yararların sağlanması:

- üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik (homojenite)
- alışlagelen yöntemlerden daha kısa kültür süresi
- zor üretilen türlerin daha kolay üretimi
- seçilen belirli /üstün genotiplerin hızlı üretimi
- üretimde daha az anaç kullanılması

c) Somaklonal varyasyondan dolayı yeni çeşitlerin/ genotiplerin elde edilmesi

Mikroçoğaltım yöntemlerinden biri olan organogenesis, dokulara veya kallus hücrelerine baskı uygulanarak değişikliklerin meydana gelmesi, sürgün veya kök primordiyumu olarak adlandırılan tek kutuplu, yeni dokuların ve vasküler sistemin oluşması olayıdır. Direkt veya indirekt yollarla uygulanabilir (Çizelge 3.2.1.). *In vitro* organogenesis üzerine yapılan araştırmaların büyük bir kısmında etkin bir çoğaltımın oluşabilmesi için en önemli koşullardan biri uygun bir eksplant kaynağının seçilmesidir⁹.

Tez araştırmasının mikroçoğaltım aşamasında yapılan çalışmalar 6 ana başlık altında sıralanabilir. Bunlar;

- a) Kültüre alınacak eksplantın seçimi ve hazırlanması,
- b) Besi ortamlarının içeriği ve hazırlanması,
 - Büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonlarının hazırlanması,
 - Stok solüsyonlardan yararlanarak besi ortamının hazırlanması,
- c) Sterilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi,
- d) Kültür başlatma çalışmaları,
- e) Sürgün proliferasyon çalışmaları,
- f) Köklendirme çalışmaları.

3.2.1.1. Kültüre alınacak eksplantın seçimi ve hazırlanması

Araştırmada bitki materyali olarak, Gaziantep Fıstık Araştırma Enstitüsü araştırma bahçelerinde yetişen dişi ve erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarının genellikle sürgün tepelerinde bulunan apikal tomurcuklar ile dişi ağaçlara ait olgun tohumlar kullanılmıştır. Apikal sürgün tomurcuğundan itibaren 20 cm boyunda kesilen çelikler, nemli temiz bezlere sarılarak plastik kaplar içinde karanlık bir ortamda laboratuara getirilerek deney gününe kadar +4  C’de buzdolabında, olgun tohumlar ise kuru şartlar altında muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Besi ortamlarının içeriği ve hazırlanması

Her bitki türü için kullanılan besi ortamları benzer maddeleri içermektedir. Fakat kültür amacına ve bitki özelliğine bağlı olarak ortam bileşimi ve konsantrasyonlarında değişiklik olabilmektedir. Hücre, doku ve organlar ancak uygun besin maddelerini içeren ortamda gelişebilir. Bütün besin ortamlarının temeli gerekli makro ve mikro elementlerin mineral tuzları ile karbon kaynağı olarak şekerin belirli miktarlarda karıştırılmasıdır. Ancak, her bitki ve uygulanacak kültür türü için bu temel elementlere çeşitli organik ve inorganik bileşiklerde ilave edilmektedir. Çeşitli araştırıcılar tarafından hazırlanmış olan ve onların adları ile anılan besin ortamları bulunmakta olup, MS, B5 ve LS bunlara örnek olarak verilebilir. Bu araştırmada kültür başlangıcı ve sürgün çoğaltımı aşamalarında yapılan literatür araştırmaları sonucunda besi yeri olarak MS (Murashige ve Skoog)¹⁰ ortamı kullanılmıştır. MS ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları  izelge 3.2.1.2. ’de gösterilmiştir.

Tartılacak madde çeşidinin çok sayıda ve tartılacak madde miktarlarının az olması nedeniyle her çalışma anında maddelerin tek tek tartılması hem zor hem de

çok zaman kaybına yol açacağından çeşitli konsantrasyonlarda stok çözeltiler hazırlanmış ve besin ortamı hazırlanırken bu stok çözeltilerinin ortamın gerektirdiği konsantrasyonu içerecek miktarları kullanılmıştır. Bu nedenle MS Ana solüsyonu, Mikro Elementler-1 ve Demir Kelatör karışımlarından 1000cc; Mikro Elementler-2, Vitamin Karışımı ve B1 Vitamini karışımlarından ise 100cc hazırlanmıştır. Bileşenlerin karışımında bulunması gereken miktarları hassas terazide tartılmıştır. 1000 cc'lik bir balon jöje içerisine 100 ml bidistile su ilave edilmiş ve içerisine bir magnet atılıp magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra karışımı oluşturacak olan elementler sırası ile balon jöje içerisine ilave edilmiştir. Çözeltideki elementler iyice çözündükten sonra, ölçü silindiri yardımı ile çözeltinin hacmi bidistile su ile 1000cc'ye tamamlanmıştır. 100cc'lik karışımların da ayrı ayrı stok solüsyonları balon jöje içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler, bozulmalarını önlemek için renkli cam şişelere konulup ağzıları dışarıdan hava girişini önleyecek biçimde sıkıca kapatılmış ve üzerlerine kullanılan madde, formülü, konsantrasyonu ve hazırlama tarihi yazılı etiketler yapıştırılarak +4 C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.1.2.1. Büyüme düzenleyicilerinin (hormonlar) stok solüsyonlarının hazırlanması: Besi ortamları için gerekli olan BA, Kinetin, GA₃ ve IBA hormonlarının stok solüsyonları, besi ortamlarının stok çözeltisi gibi hazırlanmıştır. Çalışmamızda kullanılan büyüme düzenleyicilerinin (hormonlar) stok solüsyonlarının hazırlanması Çizelge 3.2.1.2.1. de verilmiştir. Hazırlanan stok solüsyonların pH'sı dikkatli bir şekilde 5.0'a ayarlanarak pyrex şişe içinde buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2.2. Stok Solüsyonlardan Yararlanarak Besi Ortamının Hazırlanması:

Araştırmada kullanılan standart MS besi ortamının hazırlanmasında Çizelge 3.2.1.2.2. deki yöntemler izlenmiştir. Kültür başlangıcı ve sürgün proliferasyonu aşamasında 1/1 MS oranında besi yeri hazırlanmıştır. Köklendirme çalışmalarında ise sürgünler 1/2 MS oranında besi yerine aktarılmıştır.

Kültür başlangıcı ve sürgün çoğaltımı aşamalarında kullanılmak üzere bir litre standart MS besi yeri hazırlamak için 1 litrelik erlenmayer içerisine 750 cc bidistile saf su bırakılmıştır. +4°C’de muhafaza edilen stok solüsyonlar Çizelge 3.2.1.2.2’de belirtildiği miktarlarda alınarak erlenmayere ilave edilmiştir. Karışımın hacmi bidistile su ile 1000 cc’ye tamamlanmış ve önceden kalibrasyonu yapılmış olan pH metrede, 1 N NaOH ve 1 N HCl yardımı ile karışımın pH’sı 5.8’e ayarlanmış ve takiben bitki büyüme düzenleyicileri eklenmiştir. Ortamın katılaştırılması için 5.650g agar ilave edilmiş ve alimünyum folyo ile sıkı bir şekilde sarılmıştır. Karışım otoklavda 121 °C ‘de 1.2 bar basınç altında 20 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Besi ortamı steril laminar flow kabin içerisinde Magenta GA7 kaplarına aktarılmış ve besi ortamının sıcaklığı oda sıcaklığına düşüp katılaştığında, kapakları kapatılarak kullanılmak üzere bekletilmiştir.

3.2.1.3. Sterilizasyon teknikleri

In vitro doku kültüründe en önemli nokta sterilizasyon işlemleridir. Isı, filtre, kimyasal ve diğer malzemeleri (steril eldiven, UV ışınları vb.) kullanarak mikroorganizmaları ve sporlarını öldürme işlemine kısaca sterilizasyon denir. Mikroorganizmalar en yaygın kontaminasyon kaynağıdır. Virüsler ve mikoplazma türü organizmalar ise kolay tespit edilemediklerinden en tehlikeli

olanlarıdır. Sterilizasyon, sterilize edilecek yer ve materyale göre 3 kısımda değerlendirilebilir:

- 1) Çalışma alanının sterilizasyonu
- 2) Kullanılacak alet, ekipman, kapların ve besin ortamlarının sterilizasyonu
- 3) Yüzey sterilizasyon tekniklerinin belirlenmesi ve bitki materyalinin sterilizasyonu

3.2.1.3.1. Çalışma alanının sterilizasyonu: Steril şartlar altında ekimin yapıldığı yer, laminar flow kabininin içerisidir. Kabin içi ve steril oda kullanılmadan önce %96'lık alkol ile silinmiştir. Kabinin UV-C lambası açılarak ekim işlemine kadar kabinin steril kalması sağlanmıştır. Zemin ve kabin çevresi %10'luk ticari sodyum hipoklorit (NaOCl) ile temizlenmiştir.

3.2.1.3.2. Kullanılacak alet, ekipman, kapların ve besin ortamlarının sterilizasyonu: Ekimde kullanılan Magenta GA7 kültür kapları iki katlı alüminyum folyo içine sarılmış ve otoklavda 121°C'de 25 dakika 15 PSI ısı basıncı altında sterilize edilmiştir. Kültür işlemleri esnasında kullanılan pens ve bistüriler, önce %96'lık etil alkol ile silinip 10'arlı gruplar halinde alüminyum folyolara sarılarak, etüvde 280-300°C'de yarım saat süre ile sterilize edilmiştir. Filtre kağıtları ise, iki kat ambalaj kağıtlarına sarılarak, etüvde 180°C'de iki saat süre ile sterilize edilmiştir.

Erlen, balon joje, beher gibi cam malzemelerin sterilizasyonu 180°C' lik etüvde 2 saat; mezür, pipet gibi ısıya dayanıksız cam malzemeler ise 60°C' lik etüvde 2 saat bekletilerek yapılmıştır. Kültür besi ortamları otoklavda 1atm. basınç

altında 121°C’de 25 dakika sterilize edilmiştir. Tohum ve eksplantları yıkamada kullanılan saf sular ise 180°C’ lik etüvde 3 saatte sterilize edilmiştir.

3.2.1.3.3. Yüzey sterilizasyon tekniklerinin belirlenmesi ve bitki materyalinin sterilizasyonu: Erkek ve dişi antepfıstığı tomurcuklarının dekontaminasyonu ve aksenik gelişmesine % 10, 15, 20, 25 ve 30’luk NaOCl’nin farklı konsantrasyonlarının ve farklı immersiyon sürelerinin (30, 35, 40, 45 ve 50dk) etkisi araştırılmıştır.

+4°C’de buzdolabında muhafaza edilen erkek ve dişi antepfıstığı ağaçlarından alınan tomurcuklar 2–3 cm boyunda gövde parçalarıyla birlikte musluk suyunda 3–5 dakika yıkandıktan sonra, %70’lik alkol içerisine alınarak 40 sn bekletilmiştir. Daha sonra NaOCl’nin farklı konsantrasyonları (% 10, 15, 20, 25 ve 30) içerisinde ve farklı immersiyon süreleri (30, 35, 40, 45 ve 50dk) denenerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. NaOCl’den çıkarılan tomurcuklar sterilant bulaşığından uzaklaştırılmak için saf su ile 5’er dakika 7 kez durulanmıştır. Steril edilen tomurcuklar, steril kabin içerisine bırakılan filtre kağıtları üzerine birer birer alınarak kurulanmıştır. 0.5–1 cm uzunluğunda gövde parçalı olacak şekilde kesilmiş ve fenolik bileşiklerinden arındırılmak için yaklaşık bir saat steril saf suda bekletilmiştir. Steril pens ve bistüri kullanılarak tomurcukların dış kabuğu soyulmuş, standart 1/1 MS besi ortamı bulunan Magenta GA7 kaplarına her bir kültür kabına 4 tomurcuk olacak şekilde inoküle edilmiştir. Besi ortamına ekilen tomurcuklar 25±2°C’de 16/8 saat fotoperiyot uygulamasında, 1500 lüks ışık altında 4 hafta muhafaza edilmiştir.

3.2.1.6 Kültür başlatma  alışmaları

Proliferasyon aşamasında kullanılacak apikal tomurcuklardan elde edilecek sürgünlerin bir kontrol grubu ile birlikte sitokinin tipi bakımından 1 mg l⁻¹ konsantrasyonlarında hazırlanmış BA ve Kinetin hormonlarının etkisi araştırılmıştır. Kültür başlatma çalışmaları süresince yapılan deneylerdeki her uygulama için 20 materyal kullanılmıştır.

Elde edilen apikal sürgünler 1 mg l⁻¹ konsantrasyonlarında hazırlanmış BA ve Kinetin hormonları içeren standart 1/1 MS besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Ekimi yapılan kültür kapları, 25 2 C'de 16/8 saat fotoperiyot uygulamasında, 1500 lüks ışık altında 4 hafta büyüme odasında muhafaza edilmiştir.

3.2.1.7 Sürgün proliferasyon  alışmaları

Erkek ve dişi antepfıstığı apikal tomurcuklarından elde edilen sürgün uçlarının proliferasyonuna BA'nın 0.25, 0.5, 1, 2 mg l⁻¹ konsantrasyonlarındaki etkisi araştırılmıştır. Alt kültür aşamasında elde edilen sürgünlerin gövde uzunluğunu arttırıcı etkisi bilinen gibberellik asitin (GA₃) farklı konsantrasyonlarını (0.25, 0.5, 1 ve 2 mg l⁻¹) içeren 1 mg l⁻¹ BA ile destekli kombinasyonların etkisi test edilmiştir. Alt kültüre alınan sürgün uçları steril kurutma kağıdı üzerinde kurutulduktan sonra her bir parametreye uygun şekilde hazırlanan standart 1/1 MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Ekimi yapılan kültür kapları, 25 2 C'de 16/8 saat fotoperiyot uygulamasında, 1500 lüks ışık altında 4 hafta inkübe edilmiştir.

3.2.1.8. Köklendirme  alışmaları

Erkek ve dişi antepfıstığı sürgünlerini köklendirme aşamasında, 15–20 alt kültür süresince sürgün boyu yaklaşık 3cm uzunluğa ulaşan sürgünler kullanılmıştır. Sürgünler kök oluşumu için farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış IBA

solüsyonlarında (0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10gr/l) farklı sürelerde (10, 20, 30, 40 ve 50sn) bekletilmiştir. Sürgünlerin kök oluşumunu stimüle amaçlı olarak daldırma yöntemi denenmiştir. Bütün denemelerde köklenme solüsyonlarına daldırılan sürgünler, 1/2 MS kuvvetinde ve hormonsuz besi ortamına aktarılmıştır. Ekimi yapılan kültür kapları, $25\pm2^{\circ}\text{C}$ 'de 16/8 saat fotoperiyot uygulamasında, 1500 lüks ışık altında 4 hafta inkübe edilmiştir.

3.2.2. Sitogenetik Çalışmalar

Silene latifolia (ballica), *Rumex acetosa* (kuzukulağı) gibi bitkiler de tıpkı *Pistacia vera* (antepfıstığı) gibi, çift evcikli (dioik) bitkiler grubunda yer aldığından, bu bitkilerin her bir cinsi üzerinde sadece tek bir cinsiyete ait (erkek veya dişi) olan çiçekler bulunmaktadır^{11,12}. Ancak *P.vera* ise tam bir dioik yapı gösterir. Dişi çiçekler stamen içermedikleri gibi olgun erkek çiçekler üzerinde de herhangi bir dişi yapıya rastlanmaz¹³. Evrimleşme süreci düşünüldüğünde henüz yeni olarak ortaya çıkmasına rağmen, dioik yapının çiçekli bitkilerde yaygın olarak görülen bir durum olduğu söylenebilir. Dünya üzerinde mevcut 240.000 angiosperm türünün % 6'sını, dioik türlerinde dâhil olduğu toplam 13.000 angiosperm cinsinin ise yaklaşık olarak % 7'sini dioik yapıya sahip bitkilerin oluşturması, dioikliğin çiçekli bitkilerin evrimi sırasında birçok kez ortaya çıktığını göstermektedir¹⁴. Angiospermelerin çoğu, çiçek yapıları üzerinde erkek (stamen) ve dişi organın (karpel veya pistil) birlikte bulunduğu hermafrodit yapıdadır. Çiçekli bitkilerin yaklaşık % 10'u ise tek tip çiçek üretirler. Örneğin; mısır (*Zea mays*)'da erkek ve dişi çiçekler ayrı ayrı çiçek yapılarını geliştirdiği için, tek evcikli (monoik) bir bitkidir. Bitki türlerinin çok az bir kısmı tek cinsiyetli bir yapıya sahiptir (bir ferdin yalnızca erkek ya da dişi gamet oluşturması). Çiçekli bitkilerde cinsiyet belirlenmesini kontrol eden mekanizmalar oldukça farklı ve çeşitlidir. Cinsiyetin belirlenmesi, tüm türlerde en çok genotipik karakterler tarafından kontrol edilir. Ancak cinsiyeti belirleyen mekanizmalar, bir kromozom üzerinde yer alan tek bir kontrol bölgesinden (lokus) (ör: incir, *Ficus carica*¹⁵), üzerlerinde cinsiyetin belirlenmesi için çeşitli bağlantı bölgeleri taşıyan cinsiyet kromozomlarına (ör: ballica, *Silene latifolia*¹⁶) kadar çeşitlilik gösterirler. Bununla birlikte bitkisel hormonlar da, türden türe değişmek kaydıyla cinsiyet

oluşumunu etkilemektedir¹⁷. Cinsiyet kromozomlarının tümünün, otozomlardan köken aldıklarına inanılır. Bu bağlamda ilk X ve y kromozomlarının, cinsiyet oluşumunda basit bir diallel yapı gösteren sisteme sahip oldukları da düşünülmektedir¹⁸.

Birbirinden oldukça değişik türlerde, heteromorf cinsiyet kromozom sistemlerinin evrimleşmesi, söz konusu tüm türlerde aynı veya benzer nedenlerden dolayı, aynı olayların gerçekleştiğini akla getirmektedir¹⁸. Genetik yapıyı oluşturacak şifrelerin cinsiyet kromozomları üzerinde toplanması, cinsiyet ile ilgili genlerin ise cinsiyet kromozomları üzerinde yoğunlaşmasına ve X ve y olarak adlandırılan bu kromozomların birçok bölgesinde rekombinasyonların kontrol ettiği bir seksüel dimorfizmin oluşmasına neden olmuştur^{19.20.21.22}.

Seksüel dimorfizm kısaca şu şekilde özetlenebilir:

(a) Cinsiyet oluşumu bir noktada birleşen bir değişim yoluyla ortaya çıkan, benzerlikler göstermektedir (ör: erkek heterogameti, yaygın seksüel dimorfizm ve X kromozom miktarının dengelenmesi gibi). Cinsiyet oluşumu, büyük bir olasılıkla, bitki gelişiminde aynı temel problemlere evrimin ürettiği bir dizi çözüm olarak ortaya çıkmıştır²³.

(b) Bitkiler, X ve y cinsiyet kromozomlarının oluşum sürecinin çok erken safhalarına erişebilme şansı sundukları için, cinsiyet oluşumunun evrimi çalışmalarında anahtar oyuncular¹⁸.

İki cinsiyet, birçok farklı biyolojik fonksiyonları görmelerine rağmen ortak bir gen havuzunu paylaşırlar. Memelilerde olduğu gibi, y kromozomunun varlığı ya da yokluğu, dişi ve erkek üreme (reproduktif) organlarının oluşumunu sağlayabilir.

Böylece, cinsiyet oluşumunda y kromozomunun dominant ve aktif kromozom olduğu söylenebilir¹⁸.

Dioik erkek genomunun genel olarak üç nükleer alt genomun birleşiminden oluştuğu söylenebilir: (1) otozomlar (cinsiyet kromozomu dışındaki kromozomlar), (2) X (dişi) kromozomu ve (3) y (erkek) kromozomu.

Bununla birlikte cinsiyet kromozomları ve dioikliğin, sadece otozomlara sahip olan hermafrodit atalardan türediği neredeyse kesin olarak bilinmektedir. Günümüze değin yapılan araştırmalar sonucu artan bulgular, hermafrodit olan bu ataların bazılarında, erkeklik ve dişilik fonksiyonlarından sorumlu genlerin ortaya çıkmış olmasını, önceleri bu genlerin epigenetik olarak baskılandığı, ancak daha sonraları ise evrimsel süreçte erkek ve dişi bireyler ile bunlara ait cinsiyet kromozomlarının oluştuğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır²⁴.

Xy cinsiyet sistemine sahip dioik bitkiler, modüler ve sekansal gelişim yeteneklerine sahip tipik çiçekli bitkilerdir ve aynı zamanda üreme şekilleri bakımından hayvanlara benzetilirler. Bu nedenle cinsiyet kromozomlarının evriminin (gelişiminin) tam olarak anlaşılması, dioik bitkilerin cinsiyet oluşturma mekanizmalarının, incelenmesi yoluyla mümkün olacaktır.

Kromozomların yapı ve kalıtımlarının çalışılması sitogenetik olarak adlandırılır. Kromozom analiz çalışmaları, bitkilerin gelişim basamaklarını belirlemede, varyasyonların tespitinde ve genel olarak bitki genetiğine ait pek çok soruyu aydınlatmada bize yardımcı olur. Kromozomların morfolojik görünimleri ve varsa sayıları, türler arasındaki evrimsel farklılıkları makro düzeyde görmemizi sağlar. Bir türe ait kromozomların sayısal ve morfolojik yönden tespit edilmesi,

türün, alt türlerinden ve/veya çeşitli ekolojik farklılıkların yarattığı varyasyonlarından farkını gösterir²⁵.

20.yy'ın ilk çeyreğinden sonra bitkilerdeki kromozom sayılarının yanında morfolojik özellikleri konusunda da çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Böylece kromozomların uzunlukları, sentromerlerinin yeri, ikincil bağlantıları ve satellitlerinin varlığı veya yokluğu gibi özellikler bakımından değerlendirmeye alınmıştır²⁶. 1970'li yılların başında G-, R-, C- ve NOR (gümüş boyama) bantlama teknikleri başarılı uygulamalarda kullanılmaya başlanmış, bunu High-Resolution bantlama teknikleri ve Fleurosan In situ Hibridisation (FISH) teknikleri izlemiştir.

Kromozomlar, genetik bilginin aktarılmasında iş gören yapılardır. Mayoz ve mitoz bölünmelerinin metafaz safhasında belirgin bir hal alırlar. Normal vücut hücreleri biri anneden, diğeri babadan gelen birer kromozom takımına sahiptir. Bu eş kromozomların (eşey kromozomları hariç) şekil ve büyüklükleri birbirine eşittir. Böyle hücelere “somatik hücreler” denir. Bu hücreler kromozom sayısı bakımından diploid'tir ve “2n” şeklinde gösterilir. Eşey hücrelerinde, ergin gametlerde ve bazı ilkel canlılarda ise tek kromozom seti bulunur. Böyle hücelere ise “germinatif hücreler” denir, kromozom sayısı bakımından da haploid'tir ve “n” ile gösterilir. Haploid kromozom takımının ikiden fazla bulunduğu duruma ise “poliploidi” denir. Poliploidilerin adlandırılması, kromozom sayısına göre yapılmaktadır. 3n, triploit; 4n, tetraploit; 5n kromozom sayısı ise pentaploit şeklinde adlandırılır.

Kromozomlar bazı özel bölgelerden oluşmaktadırlar:

Kromatid: Kromatinlerin protein iskelete sarılması ile ortaya çıkan yapılardır ve kromozomun kolları gibi görünürler. Sentromerin her iki tarafındaki kromatidler

kromozom kolu olarak adlandırılırlar. Kardeş kromatidler birbiriyle tamamen aynı olan genetik bilgiyi taşırlar (Mayoz I'in krossingover'ına kadar).

Telomerler: Kromozomların uç kısımlarında bulunan özel DNA dizileridir. Kromozom uçlarında hem kendi üzerine katlanmasını hem de diğer kromozomlara yapışmasını engelleyerek kromozomun bütünlüğünde büyük rol oynarlar.

Replikasyon başlangıç noktası (Origins of Replication, ORI): Işık mikroskobu ile görülememesine rağmen, bütün kromozomlar en az bir tane DNA sentezinin başladığı bölge içerirler. Ökaryotik kromozomlarda birden fazla ORI bölgesi bulunur.

Sentromer: Spesifik proteinlerin bağlandığı DNA dizileridir. Bu proteinler arasındaki kinetokor proteinleri, mayoz ve mitoz bölünmelerin anafaz safhaları esnasında kromozomların iç ipliklerine tutunarak hücrenin kutuplarına doğru hareket etmelerini sağlarlar. Sentromer kromozomu iki kola ayıran ve sitogenetik bir belirleyici olarak görünen primer yapı (boğum) olarak tanımlanır. Bir kromozomun en önemli bölgesi sentromeridir.

Kromozomların morfolojileri, sentromerin tipi ve durumu ile geniş oranda belirlenebilir. Sentromerlerin bulunduğu yere göre kromozomlar medyan, submedyan veya subterminal olarak adlandırılır (Çizelge 3.2.2.). Medyan sentromerli kromozomda, sentromerin iki yanında bulunan kromozom kolları birbirine hemen hemen eşittir. Submedyan sentromerli kromozomda, sentromer kromozomu iki eşit kola bölmez, bir kol öteki koldan daha uzundur. Subterminal sentromerli (telosentrik) bir kromozomda ise, sentromer kromozomun sonunda yer alır. Ancak kromozomun sonunda bulunan sentromerden sonra çok küçük de olsa bir kromozom parçası bulunmaktadır²⁷.

Karyotip, karyogram ve idiogram kromozomların sayı ve morfolojilerine dayanan, kromozomları teşhis etmeye yarayan sitogenetik yöntemlerdir. Bir karyotip analizinin omurgasını kromozomların; toplam kol uzunlukları, kol oranları, nispi boyları ve sentromerik indeksleri oluşturmaktadır. Karyogram; kromozom çiftlerinin (homolog kromozomların) uzun boydan kısa boya kadar gittikçe küçülen bir sıraya konulmasıdır. İdiogram ise; karyogramın diagramatik şekilde çizilmesidir. Bir karyotip analizinin hesaplanması, mitotik kromozomların ölçülmesi işlemine dayanır. Mitotik kromozomların elde edilmesi ve ölçülebilir duruma gelmesi 5 adımda gerçekleştirilmektedir. Bunlar sırasıyla; ilk işlem, fiksasyon, hidroliz, %70'lik etil alkolde depolama ve boyama evrelerinden oluşmaktadır.

3.2.2.1. Preparatın hazırlanışı

Bu araştırmada, *in vitro* olarak yetiştirilen olgun erkek antepfıstığı fidanlarına ve *in vitro* ortamda çimlendirilen antepfıstığı tohumlarına ait kökler incelenmiştir. Sitogenetik çalışmalar için kullanılacak olan erkek antepfıstığı kökleri, mikroçoğaltım aşamaları sonucunda elde edilmiş ve eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Mitotik bölünme ve kromozom morfolojilerinin en iyi gözlemlenebildiği materyaller kök uçlarıdır. Bu nedenle materyal olarak kök uçları seçilmiştir. Çalışmamızda ayrıca, analiz sonuçlarının güvenilirliği açısından incelenen tüm plakların metafaz olmasına dikkat edilmiştir. Yapılacak inceleme için erkek antepfıstığı sürgünlerine ve tohumlarına ait köklerden yaklaşık olarak 2–3 cm uzunluğunda olanlar seçilmiştir.

3.2.2.1.1. İlk işlem: Karyotip analizinin ilk aşamasını ilk işlem oluşturmaktadır. Amaç, hücre bölünmesini metafazda durdurmaktır. Bu maddeler (P-diklorobenzen, kolşisin, α -monobromonaftalen, 8-hidroksikinolin vb.) iğ iplikçiklerinin yapısını

bozarak kromozomların ekvator bölgesinde toplanmasını engellemektedirler. Metafaz, karyotip analizlerinde önemli bir konuma sahiptir. Kromozom sayı ve morfolojilerinin en iyi gözlemlenebildiği evreyi oluşturur. Bu amaçla keskin bir jilet aracılığı ile kesilen erkek bireye ve tohumlara ait 1–2 cm'lik kök uçları farklı parametrelerin bulunduğu ortamlara alınmıştır. İlk işlem uygulamasında denenen parametreler ve hazırlanışı Çizelge 3.2.2.1.1.'de verilmiştir.

3.2.2.1.2. Fiksasyon: Sitogenetik araştırmalarda kullanılan fiksatif sayısı çok fazla değildir. Kromozomların canlılığının hayattaki durumuna mümkün olduğu kadar yakın bir durumda tespiti önem taşır. Bu amaçla ilk işlemde alınan kök uçları farklı fiksasyon parametrelerinde fiske edilmiştir. Denenen parametreler ve parametrelerin hazırlanışı Çizelge 3.2.2.1.2.'de verilmiştir.

3.2.2.1.3. Depolama: Fiksasyon işleminden sonra materyallerin hepsini bir günde inceleme olanağı bulunmadığından materyalin uzun süre bozulmadan saklanması gerekmektedir. Bu işlem için genellikle %70'lik alkolde bekletilerek depolama yapılmaktadır. Materyaller asetik asit çözeltisinden arındırılmak üzere %70'lik alkolde oda sıcaklık derecesinde 5'er dakika olmak üzere 2 defa yıkanmış ve daha sonra buzdolabında +4°C'de %70'lik alkol içerisinde uzun süre muhafaza edilmiştir.

3.2.2.1.4. Hidroliz: Alkolden çıkarılan kök uçları, alkol bulaşığından arındırılmak amacıyla bir müddet su ile yıkanmıştır. 1 ve 5 normalitelerde hazırlanmış HCl parametreleri ile hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidroliz, dokuların hücrelerini birbirinden ayırıp onların daha iyi gözlenmesi bakımından önemlidir. Böylece dokular aralarında birleştirici bir kuvvet bulunmayan hücreler yığılı durumunu alır. Hidroliz için zaman, sıcaklık derecesi ve HCl'in konsantrasyonuna dikkat edilmelidir. Hidroliz bütünüyle materyalden materyale değişiklikler gösterdiği gibi,

yapılan boyamalarda kromozomların optimum boyayı alması en önemli kurallarından birini oluşturmaktadır. Denenen parametreler ve parametrelerin hazırlanışı Çizelge 3.2.2.1.4.'te verilmiştir.

3.2.2.1.5. Boyama: Tekniğin son basamağını oluşturan boyama aşamasında Aseto-karmin, Fulgen, Hematoksilen, Aseto-orsein gibi boya parametreleri denenmiştir. Bu aşamada, kök uçlarındaki hücrelerin çekirdeği ve kromozomların boyandığı meristematik bölge yani kök uçlarının 1–3 mm kadar olan en uç kısmı daha koyu bir renk alır. Uygulanan boyaların hazırlanışı sırasıyla verilmiştir.

Aseto- karmin Boyasının Hazırlanışı:

- 55cc bidistile su ile 45cc glacial asetik asit karıştırılarak %45'lik asetik asit çözeltisi hazırlanır.
- 100cc, %45'lik asetik asit balon jöje içerisine bırakılır.
- Balon jöje, bir kapta kaynayan su içerisine oturtulur. 10dk. ısıtılır. Asetik asitin sıcaklığı kaynayan suyun derecesine ulaştırılır.
- 1 gr toz karmin alınır, kaynayan aside yavaş yavaş aktarılır.
- Boya soğutulur ve dibe çöken tortu alınmaksızın başka bir balon jöjeye aktarılır. 2 damla demir asetatın sudaki doymuş çözeltisinden damlatılır.
- 12 saat bekletilir. Boya süzülerek buzdolabında muhafaza edilir.

Fulgen Boyasının Hazırlanışı:

- 1gr kristal halinde fuksin bazik (parafuksin) alınır.
- Bu fuksin bazik, küçük bir havanda veya 8–10 cm çapında bir saat camı içinde ezilir.
- 500 cm³'lük bir erlenmayerin dip kısmına, kabın etrafına bulaştırmadan bu ezilmiş, toz haline getirilmiş fuksin bazik konulur.

- Bir başka erlenmayerde 200 cm³'lük damıtık su kaynatılır.
- Toz halindeki fuksin bazik üzerine bu kaynamış damıtık su, yavaş yavaş dökülür ve 50°C'ye soğuyana kadar devamlı olarak karıştırılır.
- 20 cm³ N HCl ilave edilerek oluşan karışım süzülür.
- 2 gr potasyum metabisülfid ($K_2S_2O_5$) ilave edilir.
- Boya ağzı iyice kapatılmış bir şişeye koyulur. En az bir gece olmak üzere 24 saat ışıktan almayan bir dolapta bekletilir. Böylece vişneçürüğü rengindeki boya, açık çay rengini alır. + 4°C'de buzdolabında muhafaza edilir (Elçi, 1982).

Hematoksilen Boyasının hazırlanışı:

- 4 gr Hematoksilen alınır.
- 1 gr demir alum [$FeNH_4(SO_4) \cdot 2.12H_2O$] ile birlikte oda sıcaklığında %45'lik asetik asit çözeltisi içerisinde çözündürülür.
- Homojen hale gelen karışım koyu renkli bir şişeye aktarılır.
- 1 hafta bekletilir. Süzülerek 4°C'de buzdolabında muhafaza edilir

Aseto Orsein Boyasının Hazırlanışı:

- 45 ml glasiyal asetik asit üzerine 55 ml saf su ilave edilir.
- Bu karışım yavaşça kaynatılır.
- Kaynatılan bu karışıma 2 gr orsein yavaş yavaş eklenir.
- Orsein eklendikten sonra 30 dk süre ile karıştırılır.
- Soğutulduktan sonra karışım filtre kâğıdı ile süzülür ve boyamada kullanılmak üzere buzdolabında depo edilir.

Hidrolizden çıkarılan kökler, bir müddet musluk suyu ile yıkandıktan sonra hazırlanan Aseto-karmin, Fulgen, Hematoksilen, Aseto-orsein boyalarının bulunduğu serilerden her uygulamada biri kullanılarak çok sayıda parametrenin

denendiği bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Boyadan ıkarılan kökler tekrar bir müddet musluk suyunda bekletilmiştir. Denenen boyama serileri izelge 3.2.2.1.4 ‘te verilmiştir.

3.2.2.2. Preparatın yapılışı

Preparat yapımında Eli²⁷,den yararlanılmıştır. nce temiz bir lamin ortasına yakın bir yere %45’lik asetik asitten bir damla damlatılmıştır. En iyi boyanmış kök ucu musluk suyundan alınarak lamin ortasına konulmuştur. Koyu renkli olan uç kısmından 1–1,5 mm uzunluğunda parçalar kesilmiştir. Kesilen kısım daha önce lam üzerine damlatılan %45’lik asetik asitten alınan küçük bir damla içerisinde bir bisturi ile çok küçük parçalara ayrılıp, sıvının tamamı içerisine iyice dağıtılarak üzeri lamelle düzgün bir şekilde kapatılmıştır. Temiz bir kurutma kâğıdı ikiye katlanmıştır. Henüz ezme işlemine geçmeden önce hazırlanmış preparat, katlanmış olan kurutma kğıdının arasına yerleştirilmiştir. Kurutma kğıdının üzerinden tutularak kurutma kâğıdı ve lamel oynatılmadan diğerkelle lamelin üzerine kurşun kalemin düz tarafı vurularak ezme işlemi yapılmıştır. Birkaç preparat yapıldıktan lamel üzerine kurşun kalemin arka kısmıyla hafif vuruşlar yaparak hücrelerin tek düzlem halinde dağılması sağlanmış ve preparat kurutma kâğıdı arasına alınarak başparmak ve işaret parmağıyla iyice sıkıştırılmış, böylece oluşan hava kabarcıkları alınmıştır. Hazırlanan preparatlar immersion yağı damlatılarak incelenmiş ve sayılabilen kromozomları olan hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.2.3. Devamlı preparatların hazırlanışı

Bu metodun uygulanmasında alkol buharı değiş-tokuşu yönteminden faydalanılmıştır. Özellikle ezme preparatların daha kolay devamlı hale gelmesinde bu yöntemin koşulları uygunluk göstermektedir. Devamlı preparat yapılışı sırasında,

önemli bir nokta olan lam ve lamelin birbirinden ayrılması engellenerek sonraki incelemelerde hücrelerin birbiri üzerine gelmesi sorunu ortadan kaldırılmıştır. Bu amaçla, preparatlar öncelikle iç yüzeyleri kurutma kâğıdı ile kaplı ve dip kısmına 4-5mm yüksekliğe kadar absollü alkolün bırakıldığı şalelere dik olarak yerleştirilmiştir. Şalelerin kapağı alkol buharını tutabilmesi için etrafına vazelin sürülerek kapatılmıştır. Böylece hazırlanan kaplara devamlı yapılması istenen preparatlar konularak buzdolabında bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün çıkarılan preparatlar iç yüzeyleri kurutma kâğıdı ile kaplı ve absollü alkolle ıslatılmış petri kutularına yerleştirilmiştir. Lamelin üç kenarı kanada balsamı ile sıvandıktan sonra petri kutusunun kapağı kapatılarak preparat kurumaya terk edilmiştir²⁷.

3.2.2.4. Karyotip analizinin yapılışı

Olgun erkek antepfıstığı sürgünleri ile antepfıstığı tohumlarının köklenmesinden elde edilen karyotip analizi, kromozomları iyi dağılım gösteren, fazla büzülmemiş, kromozom morfolojileri net gözlemlenebilen plaklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kromozom plaklarının fotoğrafları Nikon E 8400 marka fotoğraf makinası ve Olympos marka ışık mikroskobu aracılığı ile çekilmiştir. Kromozom boylarının küçüklüğü dikkate alınarak fotoğraf çekimi immersion objektifi ile 10X100 büyütmede gerçekleştirilmiştir. Kromozomların çekimi sırasında büyütmenin tespiti için mikrometrik lam kullanılmış ve aynı büyütmede kromozomların fotoğrafları çekilmiştir. Kromozomların uzun ve kısa kollarının boyları mm olarak ölçüldükten sonra μm cinsine dönüştürülmüştür. Analiz, olgun erkek antepfıstığı ile antepfıstığı tohumlarına ait, her biri için 5 metafaz plağı üzerinde yapıldığından, ölçülen kromozom boyları, kromozomların çiftler halinde olduğu da düşünülerek 10 kez hesaplanmıştır. Fotoğrafları çekilen homolog

kromozomlar 1 (en büyük)'den 15 (en küçük)'e kadar sıralanarak çiftler halinde numaralandırılmıştır. Homolog kromozom çiftleri sentromer pozisyonlarına ve satellitin olup-olmamasına göre düzenlenmiştir. Kromozomların ortalama kol oranları(r); uzun kol boyunun(l) kısa kol boyuna(s) bölünmesiyle ($r=l/s$), nispi boyları ise kromozomun total uzunluğunun (c) hücredeki bütün kromozomların uzunluğu toplamına bölünüp 100 ile çarpılmak suretiyle bulunmuştur. Sentromerik indeks (I): $100 \cdot s/c$ formülü ile hesaplanmıştır²⁸. Böylece kromozomların total uzunluğu, uzun kol ve kısa kol uzunluğu, kol oranları, nispi boyu, kol indeksi ile sentromer tipini içeren karyotip analizleri hazırlanmıştır. Karyotip analizleri ve idiogram değerleri SPSS 15.0 (Duncan Multiple Range Test) istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Her birey için ayrı bir karyotip formülü geliştirilmiş, olgun erkek antepfıstığı ve antepfıstığı tohumlarına ait cinsiyet kromozomları ilk kez belirlenmiştir.

3.2.2.5. Karyogramların yapılışı

Karyotip analizi yapılan kromozom plaklarında yer alan homolog kromozom çiftlerinin, sentromer pozisyonları baz alınarak, uzun ve kısa kol boylarının ortalama değerlerine göre büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla karyogramları hazırlanmıştır²⁷.

3.2.2.6. İdiogramların yapılışı

Yapılan ölçümler sonucunda, homolog kromozomlardan oluşan karyogramların diagramatik olarak gösterilmesi ile idiogramları hazırlanmıştır. Antepfıstığı tohumlarında dişi bireylere ait cinsiyet kromozomları, homomorf (XX) olduğundan, bunlardan birine ait diagramatik şekil idiograma eklenmiştir. Ancak

tüm erkek bireylerin cinsiyet kromozomları, heteromorf (Xy) yapıda olduğundan, her iki kromozomun da diagramatik şekli, idiograma eklenmiştir.

3.2.3. İstatistiksel Analiz (Verilerin Değerlendirilmesi)

Bütün çalışmalar, tesadüf blokları deneme desenine göre yapılmıştır. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri, SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Test edilen işlemler arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için, veriler ANOVA'ya tabi tutulmuştur. İstatistikî önem görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar, $P < 0.05$ seviyesinde *Duncan* çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Oransal veriler durumunda ise Ki kare (χ^2) testi uygulanmıştır.

Analizlerde aşağıdaki önemlilik seviyeleri kullanılmıştır:

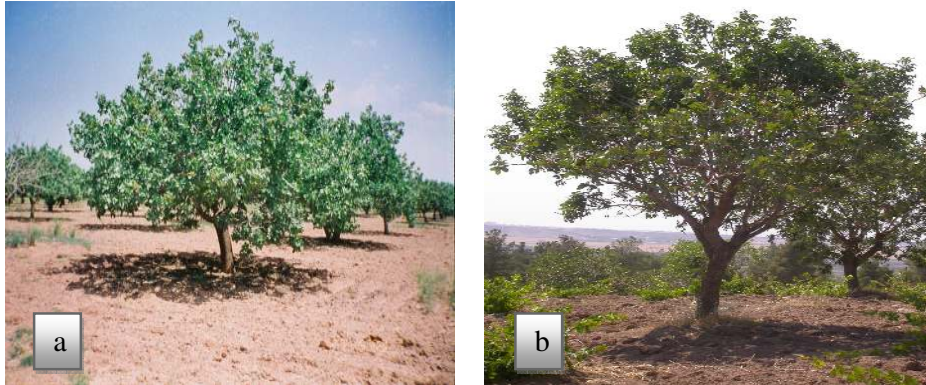
$P > 0.05$	= önemli değil
$P < 0.05$	= önemli
$P < 0.01$	= çok önemli
$P < 0.001$	= oldukça çok önemli

ÇİZELGE VE ŞEKİLLER

Çizelge 3.1.1.2. Antepfıstığı'nın bitki sistematikteki yeri

Bölüm	<i>Spermatophyta</i>			
Alt Bölüm	<i>Angiospermae</i>			
Sınıf	<i>Dicotyledoneae</i>			
Takım	<i>Terebinthales</i>			
Familiya	<i>Anacardiaceae</i>			
Cins	<i>Pistacia</i>			
Seksiyon	<i>Lentiscella</i>	<i>Lentiscus</i>	<i>Butmela</i>	<i>Terebinthus</i>
Tür	<i>P.terebinthus</i>	<i>P.weinmannifolia</i>	<i>P.atlantica</i>	<i>P. palestina</i>
	<i>P.mexicana</i>	<i>P.lentiscus</i>		<i>P.chinensis</i>
	<i>P.texana</i>	<i>P.saportae</i>		<i>P.khinjuk</i>
				<i>P.vera</i>

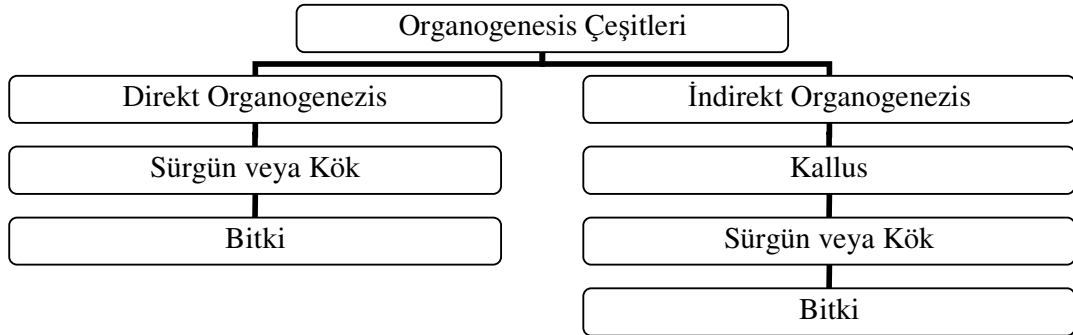
Şekil 3.1.1.3. 25-30 yaşında dişi (a) ve erkek (b) antepfıstığı ağaçlarının genel görünüşü.



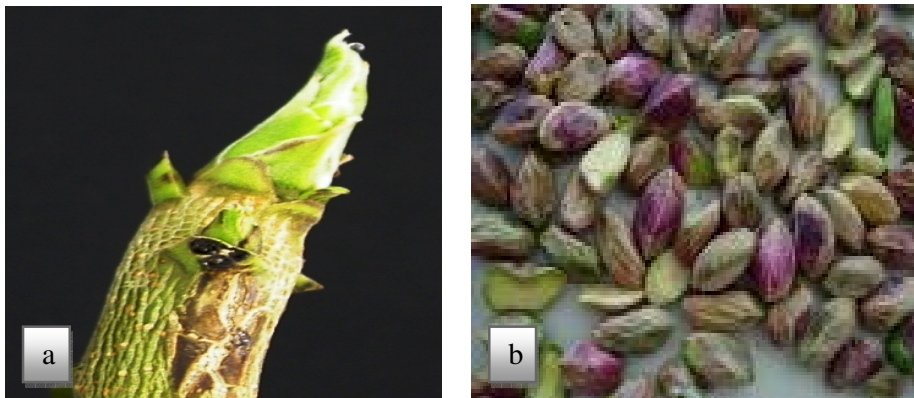
Çizelge 3.1.1.6. 100 gr Antepfıstığı (*P.vera* L.)'nın bileşenleri

Besin İçeriği		
Mineraller (mg)	Vitaminler (mg)	Diğer organik bileşenler (gr)
Potasyum (1020.0)	C (7.00)	Yağ (51.6)
Fosfor (500.0)	E (5.20)	Protein (20.8)
Magnezyum(158.0)	Nicotinamide (1.45)	Karbonhidrat (16.4)
Kalsiyum (136.0)	B ₁ (0.62)	Kolesterol (0.0)
Demir (7.3)	B ₂ (0.20)	
Toplam Kalori (594)		

Çizelge3.2.1. Organogenesis çeşitleri



Şekil 3.2.1.1. Kültüre alınacak eksplant tipi: apikal tomurcuk (a), tohumlar (b)



Çizelge 3.2.1.2. Besi ortamlarının içeriği ve hazırlanması

MS Besi Ortamı	İçerik	Konsantrasyon(mgl ⁻¹)
Makro Elementler (MS Ana Solüsyonu)	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler- 1	H ₃ BO ₃	620
	MnSO ₄ .4H ₂ O	1695
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	860
	KI	83
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25
Mikro Elementler- 2	CuSO ₄ .5H ₂ O	25
	CoCl ₂ .6 H ₂ O	25
Demir Kelatör	FeSO ₄ .7H ₂ O	3725
	Na ₂ EDTA	2785
Vitamin Karışımı	Nikotinik asit	50
	Glisin	200
	Pridoksin HCl	50
B₁ Vitamini	Tiamin HCl	100

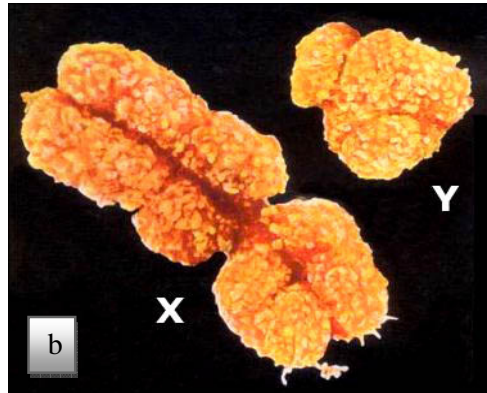
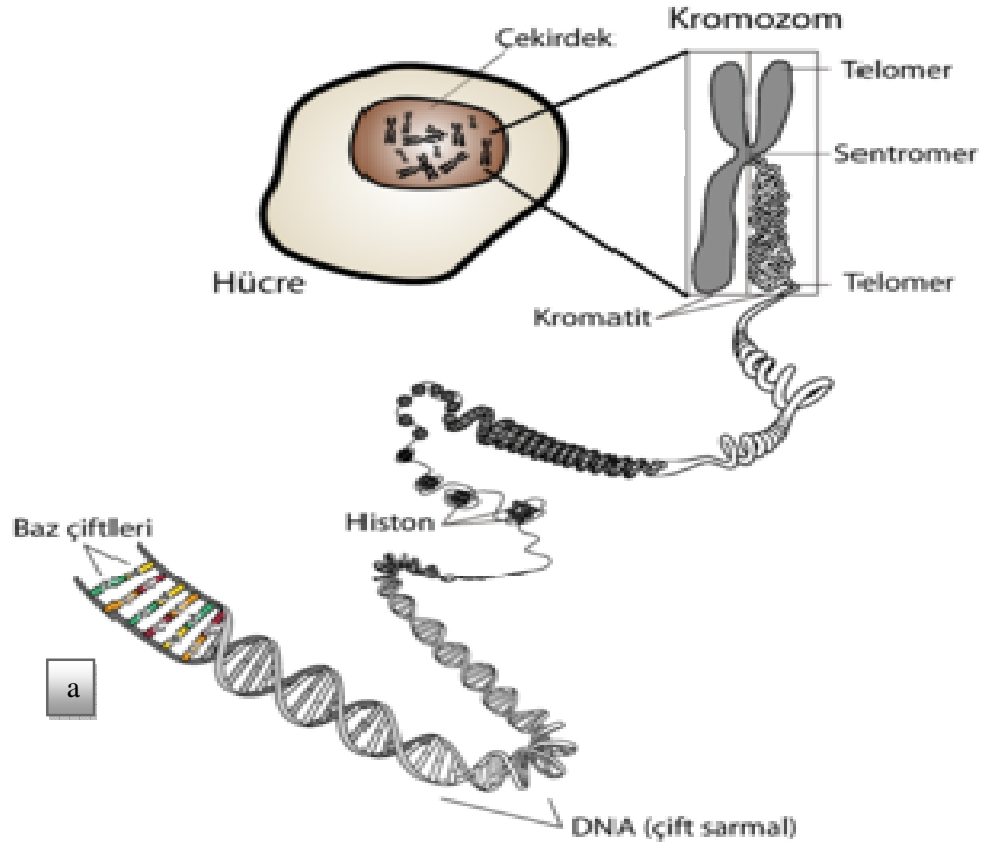
Çizelge 3.2.1.2.1. Büyüme düzenleyicilerinin (hormonlar) stok solüsyonlarının hazırlanması

<i>Stok Hormonlar (10^{-3})</i>	<i>Hazırlanışı</i>	<i>Kullanım Amacı</i>
BA (6-benzilamino purin)	100 mg BA + 2–3 cc 1 N HCl+ 100 cc bidistile suya tamamlanır	Sürgün çoğaltımı, Bitki rejenerasyonu, Kök oluşumunun inhibisyonu
Kinetin	100 mg Kinetin + 2–3 cc 1 N HCl+ 3–5 cc % 95 lik Etil Alkol + 100 cc bidistile suya tamamlanır	Sürgün çoğaltımı, Bitki rejenerasyonu, Kök oluşumunun inhibisyonu
GA₃ ana solüsyonu	100 mg GA ₃ + 3–5 cc % 95 lik Etil Alkol + 100 cc bidistile suya tamamlanır	Sürgün boylarının uzatılması, Bitki rejenerasyonu
IBA (3-Indolbutirik asit)	100 mg IBA + 3–5 cc % 95 lik Etil Alkol + 1 cc 1N NaOH + 100 cc bidistile suya tamamlanır	Sürgün oluşumunun inhibisyonu, Kök oluşumunun stimülasyonu

Çizelge 3.2.1.2.2. Stok solüsyonlardan yararlanarak besi ortamının hazırlanması

BİLEŞENLER	1/1MS	½MS
Agar	5.650 g	5.650 g
Sakaroz	30 g	20 g
MS ana solüsyonu (Makro elementler)	100 cc	50 cc
MS mikroelementler-1	10 cc	5 cc
MS mikroelementler-2	1 cc	0.5 cc
Demir kelatör	10 cc	5 cc
Vitamin karışımı	1 cc	0.5 cc
B ₁ vitamini ana solüsyonu	1 cc	0.5 cc

Şekil 3.2.2. Genel bir kromozom (a) ve heteromorf cinsiyet kromozomu (b) şekli



Çizelge 3.2.2. Kromozomların sentromer pozisyonlarına göre adlandırılması

Kromozom	Sentromer yeri	Kol oranı=Uzun kol (l)/ kısa kol (s)
tipi		
M	Median nokta	1.00
m	Median bölge	1.0–1.7
Sm	Submedian bölge	1.7–3.0
St	Subterminal bölge	3.0–7.0
t	Terminal bölge	7.0–∞
T	Terminal nokta	∞

Çizelge 3.2.2.1.1. İlk işlem solüsyonları ve hazırlanışı

Aşama	Solüsyonlar	Hazırlanışı	Sıcaklık değeri (°C)	Bekleme süresi (saat)
İlk işlem	α-monobromo naftalen	4–5 damla 1-Monobromo naftalen + 250 cc bidistile su	+25	1–10
	8-hidroksikinolin	0.058gr 8- Hidroksikinolin + 200cc bidistile sıcak su	+25	1–6
	Kolşisin	%0.5 lik kolşisin	+4	1–6
	P- diklorobenzen	1 tablet P- Diklorobenzen + 165 cc bidistile su (24 saat 60°C de)	+4	1–6

Çizelge 3.2.2.1.2. Fiksatifler ve hazırlanışı

Aşama	Çözeltiler	Hazırlanışı	Sıcaklık değeri (°C)	Bekleme süresi (saat)
Fiksasyon	Karnoy	6 br absollü alkol	+4	16–24
	Çözeltisi	1 br kloroform		
		3 br glasial asetik asit		
	Farmer	3 br absollü alkol	+4	16–24
	Çözeltisi	1 br glasial asetik asit		

Çizelge 3.2.2.1.4. Hidroliz parametrelerinin hazırlanışı

Aşama	Parametreler	Hazırlanışı	Sıcaklık değeri (°C)	Bekleme süresi (dakika)
Hidroliz	1N HCl	8.84cc HCl, 100cc bidistile suya tamamlanır	+60	5–12
	5N HCl	44.2 cc HCl, 100cc bidistile suya tamamlanır	+25	5–12

Çizelge 3.2.2.1.4. Boya tipleri

Aşama	Boya Tipi	Sıcaklık değeri (°C)	Bekleme süresi (saat)
Boyama	Aseto- karmin	+25	1–5
	Fulgen	+25	1–5
	Hematoksilen	+25	1–5
	Aseto-orsein	+25	1–5

KAYNAKLAR

- 1- Özçağırın, R.; Ünal, A.; Özeker, E.; İsfendiyoğlu, M. *Ilıman İklim Meyve Türleri-Sert Çekirdekli Meyveler*, Cilt-I (3. Baskı). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No. 553, İzmir, 229 s, 2005.
- 2- Soylu, A. *Ilıman İklim Meyveleri II*, Uludağ Üniversitesi Ders Notları, No: 72, Bursa, 1997.
- 3- Tekin, H.; Arpacı, S.; Atlı, S.; Açar, İ.; Karadağ, S.; Yükçeken, Y.; Yaman, A. *Antep Fıstığı Yetiştiriciliği*, Tarım Ve Köy İşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, 9-38, 2001.
- 4- Pell, S.K. *Molecular Systematics of The Cashew Family (Anacardiaceae)*. Doctoral Dissertation, Louisiana State University, Baton Rouge, 2004.
- 5- Zohary, M. *A Monographical Study of the Genus Pistacia*. *Palestinian Journal of Botany*, **1952**, 5, 187- 228.
- 6- Kuru, C.; Uygur, N.; Tekin, H.; Karaca, R.; Akkök, F.; Hancı, G. *Antep Fıstığı Yetiştiriciliği ve Mücadelesi*. Tarım Orman ve Köy İşleri Bak. Proje Ve Uyg. Gen. Müd. Gaziantep Ziraat Araş. Ens. Yay, No:2. 18–19, 1986.
- 7- Polat, R.; Ülger, P.; Sağlam, R.; Sağlam, C. *A Survey to Determine of Mechanization Status of Pistachio Farming and Its Problems in Turkey*. XI. GREMPA Meeting on Pistachios and Almonds. University of Harran Faculty of Agriculture and Pistachio Research and Application Center, Şanlıurfa-Turkey, 1999.
- 8- Anonim, “İşte Antep Fıstığının Yararları”, Olay Medya Grup, Web: <http://www.olaymedya.com/iste-antep-fistiginin-yararlari.html>
- 9- Mansuroğlu, S.; Gürel, E. *Bitki Biyoteknolojisi I (Doku Kültürü ve Uygulamaları)* Kitabı, *Mikroçoğaltım* (Bölüm 8), Edt: Mehmet Babaoğlu, Ekrem Gürel, Sebahattin

Özcan., Selçuk Üniversitesi Basımevi, ISBN: 975-6652-04-7, 262–281, Konya, 2001.

10- Murashige, T.; Skoog, F. *A Revised Medium For Rapid Growth and Bio-Assays With Tobacco Tissue Cultures.*, *Physiol. Plant.*, **1962**, *15*, 473–497.

11- Irish, E.E.; Nelson, T. *Sex Determination in Monoecious and Dioecious Plants*, *The Plant Cell*. **1989**, *1*, 737–744. DOI:10.1105/Tpc.1.8.737

12- Wu, K.S.; Tanksley, S.D. *Abundance, Polymorphism and Genetic Mapping of Microsatellites in Rice*. *Mol. Gen. Genet.* **1993**, *24*, 225–235.

13- Wannan, B.S.; Quinn, C.J. *Floral Structure and Evolution In Anacardiaceae*. *Botanical Journal of The Linnean Society.*, **1991**, *107*, 349–385.

14- Renner, S.S.; Ricklefs, R.E. *Dioecy and its Correlates in The Flowering Plants*. *Am. J. Bot.* **1995**, *82*(5), 596–606.

15- Storey, W.B. *Figs*. In: *Advances In Fruit Breeding*, Purdue Univ. Press, Pp. 568–589, 1975.

16- Grabowska-Joachimciak, A.; Joachimciak, A. *C-Banded Karyotypes of Two Silene Species With Heteromorphic Sex Chromosomes*, *Genome*, **2002**, *45*, 243–252.

17- Grant, S.; Houben, A.; Vyskot, B.; Siroky, J.; Pan, W.H.; Macas, J.; Saedler, H. *Genetics of Sex Determination in Flowering Plants*. *Develop. Gen.*, **1996**, *15*(3), 214 – 230.

18- Negrutiu, I.; Vyskot, B.; Barbacar, N.; Georgiev, S.; Moneger, F. *Dioecious Plants. a Key to The Early Events of Sex Chromosome Evolution*, *Plant Physiol.*, December, **2001**, *127*, 1418–1424.

19- Charlesworth, B. *Why Have Y Chromosomes?* *Current Biol.* **1992**, *2*, 515–516.

20- Ellis, N. *The War of The Sex Chromosomes*. *Nat. Genet.*, **1998**, *20*, 9–10.

- 21- Charlesworth, D.; Guttman, D.S. *Sex Determination in Plants*. Bios Scientific Publisher Edt: Ainsworth C, Oxford, p 25–49,1999.
- 22- Mitchell, M. *The Genetic Basis of Male Infertility*. Springer Edt: Mc Elreavey, Heidelberg, **2000**, p 233–270.
- 23- Hodgkin, J. *Genetic Sex Determination Mechanisms and Evolution, Bioessays*, **1992**, 14(4),253–261.
- 24- Gorelick, R. *Theory For Why Dioecious Plants Have Equal Length Sex Chromosomes*, Amer. J. Bot., **2005**, 92(6), 979–984.
- 25- Coen, E.S.; Meyerowitz, E.M. *The Warof The Whorls: Genetic Interactions Controlling Flower Development*, Nature., **1991**, 353,31–37. DOI:10.1038/353031a0
- 26- Zoshchuk, N.V.; Badaeva, E.D.; Zelenin, A.V. *History of Modern Chromosomal Analysis. Differential Staining of Plant Chromosomes*, Rus. Jour. Develop. Biol., **2003**, 34 (1), 1–13.
- 27- Elçi, Ş. *Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri*. Fırat Üniversitesi. Fen Edebiyat Fakültesi Yay. Biy. 3. Elazığ, 1982.
- 28- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. *Nomenclature For Centromeric. Position on Chromosomes*, Hereditas, **1964**, 52, 201–220.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, ülkemiz ve dünya ekonomisi için çok önemli bir kültür bitkisi olan antepfıstığı'nın (*Pistacia vera* L.), 25-30 yıllık olgun dişi ve erkek ağaçlarının apikal tomurcuklarından başlatılan bir *in vitro* klonal mikroçoğaltım metodu yardımı ile çoğaltılmış fidanlarından elde edilen kök uçlarından, erkek ve dişi cinse ait karyolojik bulgulara ulaşmaktır. Antepfıstığı gibi ekonomik ve ekolojik önemi olan bir bitkinin, genetik yönden düzenlenmesi ve eşey durumunun fark edilmesi, hem bitki ıslahı hem de bitki sistematigi açısından önemli bir rol oynayacaktır.

Tez çalışması sırasında türün olgun erkek antepfıstığı ve tohumlarına ait karyolojik bulgulara ulaşırken geliştirdiğimiz metodları iki ana başlık altında toplanabilir;

- a) Mikroçoğaltım çalışmaları
- b) Sitogenetik çalışmalar

Amaca ulaşmak için kullandığımız *in vitro* klonal mikro çoğaltım metodunun aşamalarını, aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

- a) Materyalin Sterilizasyonu
- b) Kültür Başlatılması
- c) Sürgün Proliferasyonu
- d) Köklendirme Çalışmaları

Çalışmada gerçekleştirilen sitogenetik çalışmaları ise şu şekilde sıralanabilir:

- a. Kromozomların Morfolojik Analizleri
- b. Karyotip analizi
- c. Karyogram

d. İdiogram

Yukarıda belirtilen çalışma başlıkları ile ilgili genel bulgular ve tartışma, ayrı ayrı başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

4.1. IN VİTRO KLONAL MİKROÇOĞALTIM ÇALIŞMALARI İLE İLGİLİ GENEL BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında ilk aşamada, sitogenetik çalışmalarda kullanılmak üzere, Gaziantep Fıstık Araştırma Enstitüsü araştırma bahçelerinde yetişen dişi ve erkek antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarından alınan apikal tomurcuklardan, *in vitro* mikroçoğaltım teknikleri geliştirilmiştir.

Mikroçoğaltım aşamasında sırasıyla; sterilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi, kültür başlatma çalışmaları, sürgün proliferasyon ve köklendirme çalışmaları gerçekleştirilmiş olup, her aşama için denenen parametrelere ait bulgular çizelgeler halinde verilmiştir. Ancak, antepfıstığı tohumlarının mikroçoğaltımı için uygulanan parametre ve işlemlere ait istatistiksel veriler, nihai amaç yalnızca kök ucu eldesi olduğu için, ayrıca rapor edilmemiştir.

4.1.1. Materyalin Sterilizasyonu ile İlgili Genel Bulgular

Bu bölümde ve bölüme bağlı alt bölümlerde öncelikle materyalin sterilizasyonu ile ilgili bulgulara değinilmiş, sonrasında ise bu konu ile ilgili günümüze değin yapılan çalışmalar derlenerek, her biri ayrı alt başlıklar halinde tartışılmıştır.

4.1.1.1. NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının yüzey sterilizasyonuna etkisi

Kültüre alınan erkek ve dişi antepfıstığı tomurcukları, dört haftalık süre sonunda, enfekte olan tomurcuk, gelişen tomurcuk ve kararan tomurcuk yüzdeleri alınarak kaydedilmiştir. Elde edilen veriler χ^2 analizine tabi tutulmuş ve analiz

sonuçları dişi antepfıstığı için Çizelge 4.1.1.1^a da, erkek antepfıstığı için ise Çizelge 4.1.1.1^b de verilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, test edilen NaOCl konsantrasyonları içerisinde gelişme yüzdesi bakımından optimum yüzdelik dilimini %15'lik NaOCl parametresinin verdiği gözlenmiştir. İç veya dış faktörler (endojen ve/veya ekzojen bakteriler vb.) nedeniyle, kontrol grubunun bütününe kapsayan ancak, diğer gruplarda da gözlemlenen enfeksiyon tespit edilmiştir. NaOCl konsantrasyonunun artışı ile doğru orantılı olarak, sterilizasyona dayanıksız tomurcukların kararma oranında artış meydana gelmiştir. Mikroçoğaltım aşamasında karşılaşılan enfeksiyon, kuruma ve ortama salınan fenolik bileşikler, tomurcukların düşük bir yaşama oranına sahip olmasına neden olmuştur. Suda çözünen fenolik bileşiklerin salgılanmasını önlemek amacıyla, tomurcuklar steril saf su ortamında bir müddet bekletilmiştir. Yapılan denemelerde materyal olarak kullanılan erkek ve dişi antepfıstığı tomurcuklarında NaOCl yüzdesi bakımından, önemli derecede bir farklılık gözlenmemiştir. Çizelge 4.1.1.1^a ve Çizelge 4.1.1.1^b incelenecek olursa; NaOCl yüzdesi arttıkça kararan tomurcuk yüzdesinde artış meydana geldiği halde, gelişen tomurcuk yüzdesinde düşüş meydana gelmiştir. Her iki bireyin de %15'lik NaOCl oranına verdiği cevap, gelişme yüzdeleri bakımından birbirine yakınlık göstermiştir.

4.1.1.2. NaOCl'in farklı immersiyon sürelerinin yüzey sterilizasyonuna etkisi

Dört haftalık kültür süresi sonunda, enfekte olan tomurcuk, gelişen tomurcuk ve kararan tomurcuk yüzdeleri kaydedilmiştir. Elde edilen veriler χ^2 analizine tabi tutulmuş ve analiz sonuçları, dişi antepfıstığı için Çizelge 4.1.1.2^a da, erkek antepfıstığı için ise Çizelge 4.1.1.2^b de verilmiştir.

%15'lik NaOCl'in immersiyon süresi bakımından en iyi gelişme yüzdesini 40 dk.'da verdiği gözlenmiştir. İmmersiyon süresinin artışı ile doğru orantılı olarak, kararan tomurcuk oranının da arttığı tespit edilmiştir. Önceki denemelerde olduğu gibi, enfeksiyona maruz kalan tomurcuk yüzdesi en yüksek olan, kontrol grubudur. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda materyal olarak kullanılan erkek ve dişi antepfıstığı tomurcuklarında, immersiyon süresi bakımından önemli derecede bir farklılık gözlenmemiştir.

4.1.2. Materyalin Sterilizasyonu ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma

In vitro klonal mikroçoğaltım çalışmaları için ilk ve en önemli aşama, etkili bir yüzey sterilizasyon metodunun geliştirilmesi aşamasıdır.

Çalışmamızda öncelikle olgun erkek ve dişi antepfıstığı ağaçlarının meristematik apikal uçlarından aksenik eksplantlar geliştirmek için, etkili bir yüzey sterilizasyon metodu geliştirilmiştir.

Tüm bitki türlerinin *in vitro* klonal çoğaltımı için ilk ve en önemli aşama olan yüzey sterilizasyonu, etkin maddesi ve klor iyon yüzdesi bilinen her türlü sterilant ile başarılabılır. Şimdiye kadar, hem juvenil hem de olgun antepfıstığı ağaçlarının apikal uçlarının yüzey sterilizasyonu ile ilgili çalışmalarda, farklı sterilant, konsantrasyon, bekletme süresi ve bazı durumlarda da ön sterilizasyon işlemlerinin uygulandığı rapor edilmiştir^{1.2.3.4.5.} Ayrıca antepfıstığı ağaçlarından alınan eksplantların *in vitro* kültüre alınımı sırasında oluşan mantar ve bakteri kökenli kontaminantlar, hem *in vitro* kültürlerin başlatılması hem de kültürlerin devamlılığı açısından büyük bir problem oluşturmaktadır^{1.2.3.4.5.}

Olgun antepfıstığı tohumlarından yetiştirilen fidanların yüzey sterilizasyonunun % 70'lik etanolde 45 sn'lik bir ön işlemde sonra, materyalin % 20

'lik NaOCl içerisinde 25 dakika süre ile çalkalanması yolu ile başarıldığı, ilk olarak Barghchi¹ tarafından rapor edilmiştir.

Aynı araştırmacı⁶, daha sonra serada yetiştirilen bitkilere ait sürgün ucu ve lateral tomurcukların yüzey sterilizasyonunu ise, % 70'lik etanolde 45 saniyelik bir ön sterilizasyon sonrasında, eksplantların % 20'lik ticari NaOCl içerisinde 10–15 dk. bekletilmesi ve arkasından 3 defa steril distile su ile çalkalanması yoluyla başardığını belirtmiştir.

Geleneksel çoğaltımda anaç olarak kullanılan bir diğer *Pistacia* türü olan *P.atlantica*'ya ait olgun tohumlarının yüzey sterilizasyonu ise, üç aşamalı bir işlemle yapılmıştır⁶.

Başka bir çalışmada ise, antepfıstığının diğer bir anacı olan *Pistacia khinjuk* Stocks'un olgun tohumlarının yüzey sterilizasyonu ise, % 20'lik NaOCl'de 30 dakika bekletilme işlemi sonucunda, eksplantların 5'er kez 5 defa steril distile saf su ile çalkalanmasıyla başarılmıştır⁸.

ilk olarak, Abousalim³ tarafından yapılan çalışmada, genç dokulardan ziyade, olgun antepfıstığı ağaçlarına ait materyallerin yüzey sterilizasyonunun daha güç olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, 30 yıllık Antepfıstığı ağaçlarına ait aktif olarak büyüyen sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonu, % 20'lik cholorex ile 20 dk. boyunca ve sonrasında 3 defa steril saf su ile çalkalama işlemi ile gerçekleştirilmiştir.

Yüzey sterilizasyonunun optimizasyonu için yapılan çalışmalarda ise, *in vitro* ortamda yetişen bitkilerin fotosentez oranını yükseltmek için, ışık miktarının artırılması ve % 2'lik atmosferik CO₂ kullanılmasının, kontaminasyonu engellediği görülmüştür⁹.

Olgun antepfıstığı dişi ağaçlarına ait sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonu da, başka bir çalışma ile test edilmiştir. Çalışmada, kültüre alınacak eksplantların yüzey sterilizasyonunun, mutlak alkolde 2 dk. bir ön çalkalama işleminden sonra, % 20'lik NaOCl içerisinde 10–30 dk. boyunca çalkalanarak gerçekleştirildiği rapor edilmiştir¹⁰.

Gerek antepfıstığında gerekse de diğer türlere ait *in vitro* kültürlerde çok sayıda eksplant türünün kontaminantlardan arındırılması için belirli oranlarda seyreltilmiş NaOCl (ticari çamaşır suları, örn: Axion, Domestos vb.) içeren dezenfektanlar, yüzey sterilizasyon işlemlerinde başarılı bir şekilde kullanılmışlardır. Barghchi ve Alderson¹, yabani antepfıstığı tohumlarının (*P.vera*, *P.atlantica*, *P.khinjuk* Stocks,, *P.mutica*, *P.palaestina*), yüzey sterilizasyonunu % 20'lik domestos kullanarak başardıklarını rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada¹⁰ ise, dişi antepfıstığı meristematik dokularının yüzey sterilizasyonunun % 20'lik ticari çamaşır suyu kullanılarak, başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği rapor edilmiştir.

Bir diğer çalışmada⁵ ise, erkek antepfıstığı ağaçlarından alınan tomurcukların yüzey sterilizasyonun, % 53'lük klor içeren NaOCl kullanılarak, her hangi bir ön sterilizasyon işlemi uygulanmaksızın, eksplantın alındığı tarihe de bağlı olarak, % 10'luk NaOCl içerisinde 20–45 dk. bekletilerek elde edildiği belirtilmiştir.

Çalışmamızda ise, hem erkek ve hem de dişi antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarının tomurcuklarından itibaren aksenik eksplant çoğaltımı için, etkili bir yüzey sterilizasyonu geliştirilmiştir. Erkek ve dişi antepfıstığı ağaçlarına ait apikal tomurcukların yüzey sterilizasyonu, %70 lik alkolde 45 sn.'lik bir ön sterilizasyon işlemi ve sonrasında ise eksplantların %53'lük klor içeren ticari bir NaOCl (Axion)

solusyonundan hazırlanan %15'lik NaOCl içerisinde 40 dakika bekletilerek elde edilmiştir.

Yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan eksplantların, %15'lik NaOCl içerisinde 40 dk.'nın üzerinde bir süre bekletilmesi, eksplantların büyük bir çoğunluğunda doku ölümlerine yol açmıştır. Bu bulguya benzer sonuçlar bazı araştırmacılar tarafından da tespit edilmiştir^{4,5}.

Sonuç olarak çalışmamızda, *in vitro* ortamda kültüre alınan apikal olgun erkek ve dişi antepfıstığı sürgünlerinin yüzey sterilizasyonunun, %15'lik NaOCl içerisinde 40 dk. süre ile 150 rpm hız ile çalışan bir çalkalayıcı üzerinde bekletme ve daha sonrasında 7 defa 5dk. steril saf su ile çalkalama işlemleri ile başarılabileceği sonucuna varılmıştır.

4.1.3. Kültür Başlatma Çalışmaları ile İlgili Genel Bulgular

Kültür başlatılması aşamasında, 28 günlük kültür dönemi sonucunda alınan ölçümler Duncan testine tabi tutularak, analiz sonuçları dişi antepfıstığı için Çizelge 4.1.3^a da, erkek antepfıstığı için ise Çizelge 4.1.3^b de verilmiştir.

28 günlük inkübasyon sonunda test edilen 1 mgL⁻¹ sitokinin tiplerinin (BA, Kin), kültüre alınan eksplantların, organogenez üzerine belirgin bir etki yaptığı tespit edilmiştir. Kültürlerin başlatılmasından sonra 1 haftalık süre içerisinde, sürgün uzaması ve proliferasyon görülebilir duruma gelmiştir. Hem erkek hem de dişi antepfıstığında en fazla sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu, 1.0 mgL⁻¹ BA test grubundan elde edilmiştir. Kontrol grubu ile BA destekli gruplar arasında, önemli derecede farklılıklar gözlenmiştir. BA ile destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantların, kontrol ile Kinetin destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlara oranla, çok daha fazla sayıda sürgün oluşturdıkları tespit edilmiştir.

4.1.4. Kültür Başlatma alışmaları ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma

oğaltımı zor bir tür olarak bilinen antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) nın yaşlı dokularından itibaren *in vitro* kültürlerinin kurulumu, belki de en zor aşamadır. Bu nedenle de günümüze kadar, antepfıstığından *in vitro* kültür başlatılması için, genellikle başlangıç materyali olarak olgun tohumlar veya serada 2–4 yaşına kadar yetiştirilmiş bitkilerden alınan sürgün uçları ve lateral tomurcukları kullanılmıştır^{1,11,3,4,10,12,13,14}.

İn vitro kültür başlatılması için tercih edilmesi gereken en etkin ekplant tipinin, 25 yaşındaki antepfıstığı ağaçlarına ait 3–4 cm boyundaki apikal ve lateral tomurcukların, BA içerisine birkaç dakika daldırıldıktan sonra birkaç gün boyunca uygun sıcaklık ve nem ortamı sağlanan serada gelişmeye zorlanması yoluyla elde edilen, yeni sürgünler olduğu rapor edilmiřtir¹⁰.

Aksenik kültürlerin başlatılması aşamasında kültüre alınacak antepfıstığı ağaçlarına ait eksplantların, olgun ağaçlardan alınış tarihi ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise; sürgünlerin ağaçtan alınma zamanlarının kültür başlatılması üzerinde doğrudan etkisinin olduğu ve ayrıca, kültür başlatılmasında kullanılacak optimum eksplant uzunluğunun 4–6 mm arasında olduğu ve sürgünlerin anaç ağaçtan alınma zamanının en iyi döneminin ise Mart-Mayıs ayları olduğu da tespit edilmiřtir¹⁵.

İn vitro kültür başlatılmasında kullanılacak en iyi eksplant tipinin, doğal koşullarda gelişmeye zorlanmış olan apikal ve lateral uçlardan gelişen yeni sürgünler olduğu rapor edilmiřtir¹⁰. Bu bulguya paralel olarak, çalışmamızda ise, kültüre alınan sürgünler *in vitro* kültür ortamında gelişmeye zorlanmışlardır. Kültür başlatılmasından yaklaşık bir haftalık süre sonra, skala yaprakların tekrar

ayıklanması yoluyla eksplantların tekrar alt kültüre alınması, sürgün gelişimini hızlandırmıştır.

Olgun antepfıstığı materyallerinin kültüre alınması ve bu materyallerden *in vitro* kültür başlatılması sırasında, pek çok sorunla karşılaşıldığı ve bunların en önemlilerinden birinin de kesilen uçlardan ortama salınan fenolik bileşiklerin olduğu rapor edilmiştir¹⁶. Aynı çalışmada fenolik bileşik salınışından kaynaklanan kahverengileşmenin görüldüğü eksplantların, aynı kap içinde farklı noktalara veya farklı kaplara aktarılmasıyla, tekrar gelişme sağlandığı da belirtilmiştir.

Ortama salınan fenolik bileşiklerin kökeninin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, *Pistacia vera*'nın dış yeşil kabuklarından elde edilen eksrakt içerisinde anacardic acid, cardol ve C₁₇'den oluşan bir fenolik asit karışımına rastlanıldığı rapor edilmiştir¹⁷.

Genç (juvenil) dokuların kullanıldığı kültür başlatma çalışmalarında, kahverengileşme gerçekleştikçe sık sık alt kültürlerin yapılmasının iyi sonuç verdiği de rapor edilmiştir¹⁸. Meyve veren ağaçlardan alınan eksplantların kültüre alınmasının ise, kahverengileşme nedeniyle zor olduğu, Barghchi⁶ tarafından tespit edilmiştir.

Yüzey sterilizasyonu yapılmış olan eksplantların kültüre alınmadan önce, 10–100 mgL⁻¹ malonik asitle bir ön işleme tabi tutulmasının, kültürlerde görülen kahverengileşmeyi büyük ölçüde azalttığı rapor edilmiştir¹⁸. Aynı araştırmacılar, kültür başlatılmasında; budanmış, aşılınmış, BA ve/veya GA₃ püskürtülmüş ya da mikro aşıllı ağaçlardan alınan sürgünlerin, çok daha uygun eksplantlar olduklarını bildirmişlerdir.

Pistacia cinsine ait farklı çeşitler olan Kerman (dişi), Peters (erkek), Lambertin (dişi ve erkek), Naz (erkek), Red Aleppo (erkek), Ask (erkek) ve Rashti (erkek)'ye ait 2 yaşına kadar sera şartlarında büyütülmüş fidanlarından alınan apikal ve lateral tomurcuklardan başlatılan kültür çalışmalarında; 0,3 mg⁻¹ BA ve/veya 0.5 mg⁻¹ IBA ilave edilmiş MS besi ortamına oranla fenolik bileşik salınımının, 2 mg⁻¹ BA ilave edilmiş MS besi ortamına oranla daha az miktarda gerçekleştiği rapor edilmiştir⁶.

Bustamante-Garcia² ise olgun *P.vera* ve *P.atlantica* ağaçlarına ait lateral eksplantlardan kültür başlatılamadığını, ancak GA₃ püskürtme ve genç fidanları üzerine aşılama gibi metotların uygulanmasıyla, yetişkin *P.vera* materyallerinin gençleştirildiğini ve bu uygulamaların ise, yeni sürgün ve tomurcuk oluşumunu arttırdığını rapor etmiştir. Aynı çalışmada, gençleştirilen bu yetişkin ağaçlara ait lateral tomurcuklardan *in vitro* kültür başlatılmasının daha kolay gerçekleştirildiği de belirtilmiştir.

Besi ortamına salınan fenolik bileşiklerin bertaraf edilmesi konusunda yapılan diğer bir çalışmada, dört yaşına kadar sera şartlarında büyütülmüş aşılı *P.vera* ağaçlarından alınan sürgünlerin bir karıştırıcı üzerinde % 0.1 Tween 20 içeren, % 20 NaOCl ile 20 dk. boyunca sterilize edildiği, daha sonra ise besi ortamına aktarılan bu materyallerin 3 hafta boyunca karanlıkta bekletildiği ve bu uygulamanın ise, besi ortamının kahverengileşmesini ve dokuların zarar görmesini sınırladığı tespit edilmiştir³.

Erkek antepfıstığı ağaçlarından alınan eksplantların steril saf su ile yıkanmalarının, ortama salınan fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması üzerine etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise, kültür başlatılmasında ortaya çıkan

kahverengileşmenin, %20'lik NaOCl ile 20 dk. süren bir yüzey sterilizasyonun arkasından kültüre alınacak eksplantların, bol miktarda steril saf su ile yıkanması ve daha sonrasında ise basal uçlarının kesilmesi ve iki defa steril saf suda birer saat 150 rpm'de çalkalanması işlemi ile önlendiği rapor edilmiştir⁵.

Bu çalışmada ise, 25-30 yaşındaki erkek ve dişi antepfıstığı ağaçlarına ait apikal tomurcukların dekontaminasyonu, öncelikle musluk suyunda 3-5 dakika boyunca yıkama işleminden sonra, %70'lik etilalkol içerisinde 40 sn süren bir ön sterilizasyon, sonrasında % 15'lik NaOCl' içerisinde 40 dk süre ile bekletme ve nihayetinde tomurcukların sterilant bulaşığından arındırılması için steril saf su ile 5'er dakika 7 kez durulama yoluyla başarılmıştır. Kültüre alınmadan önce 0.5-1 cm uzunluğunda kesilen tomurcuklar, fenolik bileşiklerin besi ortamına salınmasını engellemek amacıyla, en az bir saat boyunca saf su içerisinde 150 rpm'de çalışan bir çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir.

Aseptik olarak tohumdan geliştirilmiş fidanlara ait sürgün uçlarının kullanıldığı ve kültür başlatılmasına farklı oksin-sitokinin kombinasyonlarının etkisinin test edildiği diğer bir çalışmada ise, Kinetin - NAA'ın birlikte kullanımının sürgün büyümesini durdurup, kallus gelişimini teşvik ettiği, sadece BA ve Kin içeren besi ortamlarında sürgün gelişiminin gerçekleştiği, BA ve Kinetin içeren besi ortamına NAA'ın eklenmesinin ise, sürgün gelişimini durdurup, kallus oluşumunu teşvik ettiği rapor edilmiştir⁶.

Olgun antepfıstığı sürgün uçlarından kültür başlatılması ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise, BA veya 2iP'nin farklı konsantrasyonlarının, kültür başlatılmasına etkileri test edilmiş, sonuçta BA'ın 2iP'den daha iyi sonuç verdiği ve

ayrıca oluşan sürgün sayısı bakımından BA'nın 0,5–2.0 mgL⁻¹ arasında kullanılabileceği tespit edilmiştir¹⁰.

Çalışmamızda ise, aksenik kültür başlatılmasına sitokininlerin (BA ve Kin; herbiri 1.0 mgL⁻¹) etkisi bir kontrol grubu ile test edilmiş ve kültüre alınan tomurcuklardan yeni gelişen sürgün uzunlukları ve sürgün sayıları bakımından 1.0 mgL⁻¹ BA ile desteklenmiş MS besi ortamının en iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.3^a ve Çizelge 4.1.3^b).

Çalışmalarımızda test edilen tüm sitokinin konsantrasyonlarında, sürgün tabanlarında sürekli olarak büyüyen bir kallus kütesinin oluştuğu tespit edilmiştir. Benzer bulgular Barghchi-Alderson²⁰, Onay⁴ ve Tilkat⁵ tarafından da rapor edilmiştir.

Kültür başlatma çalışmalarında her iki birey (erkek ve dişi) için de test edilen BA'nın değişik konsantrasyonları arasında maksimum sürgün sayısı, dişi antepfıstığı için ortalama 3.33 ± 0.12, erkek için 3.40 ± 0.13, elde edilen en uzun sürgün ise dişi için ortalama 1.90 ± 0.02 ve erkek için 1.92 ± 0.02 cm olarak, 1 mgL⁻¹ BA ile destekli MS besi ortamından elde edilmiştir (Çizelge 4.1.5^a ve Çizelge 4.1.5^b).

4.1.5. Sürgün Proliferasyon Çalışmaları ile İlgili Bulgular

Sürgün proliferasyon aşamasında, 28 günlük kültür dönemi sonucunda alınan ölçümler Duncan testine tabi tutularak, analiz sonuçları dişi antepfıstığı için Çizelge 4.1.5^a da, erkek antepfıstığı için ise, Çizelge 4.1.5^b de verilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, denenen BA konsantrasyonları içerisinde proliferasyon yüzdesi bakımından optimum yüzdelik dilimi, 1 mgL⁻¹ BA'nın verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.1.5^a). Hem sürgün uzunluğu hem de sürgün sayısı bakımından, erkek ve dişi antepfıstığında BA'nın diğer konsantrasyonlarına oranla önemli derecede bir farklılık

gözlenmemiştir. Elde edilen verilere göre; 1 mg^l⁻¹ BA'dan düşük ve yüksek konsantrasyonlarda, proliferasyon yüzdesi bakımından bir düşüş meydana gelmiştir. Her iki bireyin de BA oranına verdiği cevap, proliferasyon yüzdeleri bakımından birbirine yakınlık göstermiştir.

Çalışmamızda, 28 günde bir yapılan alt kültür aşamalarında farklı GA₃ konsantrasyonlarının uygulandığı 1 mg^l⁻¹ BA destekli MS besi ortamının sürgün uzunluğuna etkisi test edilmiştir. Dişi antepfıstığı kültürlerine ait sürgün sayısı ve uzunluk sonuçları, Çizelge 4.1.5^c ve erkek antepfıstığı için Çizelge 4.1.5^d halinde verilmiştir.

Erkek ve dişi antepfıstığı sürgünlerine gövde uzunluğunu arttırmak amacıyla uygulanan 1 mg^l⁻¹ BA destekli MS besi ortamına farklı GA₃ konsantrasyonları içerisinde en olumlu etkiyi, 0.5 mg^l⁻¹ GA₃ 'in verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.1.5^b). Yapılan denemelerde, materyal olarak kullanılan erkek ve dişi antepfıstığı sürgünlerine uygulanan GA₃'ün farklı konsantrasyonlarındaki parametreleri bakımından, önemli derecede bir farklılık gözlenmemiştir.

4.1.6. Sürgün Proliferasyon Çalışmaları ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma

Aksenik antepfıstığı sürgünlerinin *in vitro* çoğaltımı çalışmaları, ilk olarak Barghchi¹ tarafından gerçekleştirilmiş ve bu çalışmada, eksplant olarak olgun tohumlar kullanılmıştır.

Daha sonra olgun tohumlardan üretilen sürgünlerin proliferasyonu çalışmalarında, BA'ın kinetin'e göre daha iyi sonuç verdiği ve sürgün proliferasyonu için optimal oranın 4 mg^l⁻¹ BA olduğu belirlenmiştir^{1,3}. Barghchi²¹ ayrıca, kültür

başlatılmasından sonra yapılan alt kültürlerde, besi ortamına 4 mgL⁻¹ BA eklenmesiyle, 35–40 kadar sürgün elde edildiğini de rapor etmiştir.

Olgun antepfıstığı dişi ağaçlarına ait apikal ve lateral tomurcuklardan elde edilen sürgünlerin proliferasyonu çalışmalarında ise, sitokininlerden BA'nın Kin, 2iP ve Zeatin'e oranla daha iyi sonuç verdiği ve sürgün proliferasyonunda BA'nın 2–4 mgL⁻¹ aralığında kullanılabileceği rapor edilmiştir⁴.

25 yıllık olgun erkek antepfıstığı ağaçlarına ait apikal ve lateral tomurcuklardan elde edilen sürgünlerin proliferasyonu ile ilgili bir diğer çalışmada ise, test edilen sitokinin tipleri arasında BA'nın, Kinetin ve TDZ'ye göre daha iyi sonuç verdiği ve BA'nın 0,25–2.0 mgL⁻¹ aralığında kullanılabileceği tespit edilmiştir⁵.

Dört yaşındaki *P.vera* bitki materyalleri üzerinde BA'nın düşük konsantrasyonlarının etkisi ise, Martinelli²² tarafından denenmiştir. BA'nın düşük konsantrasyonlarının araştırıldığı ayrı bir çalışmada ise, dört aylıktan dört yıllığa kadar olan *P.atlantica*, *P.integerrima* ve olgun *P.terebinthus*'ta optimum çoğaltım konsantrasyonları, sırasıyla 0.7 mgL⁻¹, 1 mgL⁻¹ ve 2.5 mgL⁻¹ olarak belirlenmiştir¹¹.

Sürgün proliferasyon çalışmalarında, kültür ortamına 0.05 mgL⁻¹ oranında NAA eklenmesinin eksplantların büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir⁶. Bir diğer çalışmada ise aynı araştırmacılar⁶, kültür ortamına eklenen NAA'nın yüksek konsantrasyonlarının kültüre alınan sürgünlerde kallus oluşumunu arttırdığını gözlemlemişler ve kültür ortamına 4 mgL⁻¹ BA ile birlikte 0.25–4 mgL⁻¹ GA₃ ya da GA₄₊₇ eklendiğinde ise, sürgün proliferasyonunun gerçekleşmediğini rapor etmişlerdir²⁰.

Antepfıstığı ağaçlarına ait taze uçların orjinal nodlarıyla birlikte iki haftada bir BA+GA₃+IBA ile desteklenmiş besi ortamına transfer edilmesiyle, optimum şartlarda sürgün üretiminin sağlandığı ve *P.atlantica*'da BA için optimal değerin 1 mgL⁻¹ olduğu tespit edilmiştir².

Sürgün proliferasyon çalışmalarında, sürekli olarak optimum BA seviyelerinin kullanımının, küçük yapraklı bodur sürgünlerin oluşumuna neden olduğu ve bu sürgünlerin alt kültürleri sırasında istenmeyen sonuçların ortaya çıktığı bildirilmiştir³. Çalışmamızda da sürekli olarak 1.0 mgL⁻¹ BA kullanımı, benzer sonuçlara yol açmış, ancak bu sorun ortama 0.5 mgL⁻¹ GA₃ ilavesi ile bertaraf edilmiştir.

Olgun ağaçlardan alınan eksplantların kültüre alınmasıyla elde edilen aksenik sürgünlerin proliferasyon çalışmalarında yapılan alt kültürlerde, kullanılması gereken optimum BA oranının 1.0–2.0 mgL⁻¹ arasında olması gerektiği rapor edilmiştir¹².

Bir diğer çalışmada ise, 1–3 yaşına kadar seralarda büyütülmüş olan, *P.atlantica* x *P.integerrima* hibritinden elde edilmiş sürgünlerin proliferasyon çalışmalarında, en iyi sonuç veren bitki büyüme düzenleyicisinin (BBD), 0.1 mgL⁻¹ TDZ olduğu rapor edilmiştir⁹.

Yapılan başka çalışmalarda ise, antepfıstığı sürgünlerin proliferasyon çalışmalarında en iyi sonucu veren bitki büyüme düzenleyicisinin BA olduğunu rapor eden araştırmacıların olduğu belirtilmiştir^{21.23.4.10.3.14.5}.

Çalışmamız, daha önceki araştırmacıların^{21.23.4.10.3.14.5} elde ettiği bulgular ile uyum içinde olup kültür başlatılmasında her iki birey için tespit edilen optimum BA oranının (1.0 mgL⁻¹), sürgün proliferasyonunu izleyen alt kültürlerde de farklılık göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.3^a ve Çizelge 4.1.3^b).

4.1.7. Köklenme Çalışmaları ile İlgili Bulgular

Bu aşamada, farklı konsantrasyondaki IBA (0.5, 1, 1.5, 2.5 ve 10gr/l⁻¹) solüsyonlarına farklı sürelerde (10, 20, 30, 40 ve 50sn.) daldırılan sürgünlerin köklenme durumuna ait ölçümler χ^2 testine tabi tutularak, çizelgeler (Çizelge 4.1.7.1^a Çizelge 4.1.7.1^b, Çizelge 4.1.7.2) halinde verilmiştir.

4.1.7.1. IBA'nın farklı konsantrasyonlarının kök oluşumu üzerine etkisi

Farklı IBA konsantrasyonlarında köklenme ortamına alınan erkek ve dişi antepfıstığı sürgünleri, dört haftalık süre sonunda, kök oluşum yüzdeleri alınarak kaydedilmiştir. Elde edilen veriler χ^2 analizine tabi tutularak, sonuçlar dişi antepfıstığı için Çizelge 4.1.7.1^a da, erkek antepfıstığı için ise Çizelge 4.1.7.1^b de verilmiştir.

Yapılan çalışmalarda, olgun erkek antepfıstığı sürgünlerinin köklenmeleri için, denenen IBA konsantrasyonları içerisinde kök oluşumu bakımından optimum değeri, 1gr/l⁻¹ IBA'nın verdiği gözlenmiştir. Ancak, olgun dişi antepfıstığı sürgünlerinde kök oluşumu sağlanamamıştır. Olgun erkek antepfıstığı sürgünlerinde, daldırılan IBA konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak, kök oluşumunun inhibe edildiği gözlenmiştir. Yapılan denemelerde, materyal olarak kullanılan erkek antepfıstığı sürgünlerinde, IBA konsantrasyonu bakımından önemli derecede bir farklılık gözlenmiştir.

4.1.7.2. IBA'nın farklı immersiyon sürelerinin kök oluşumu üzerine etkisi

Olgun dişi antepfıstığı sürgünlerinin, yoğun IBA konsantrasyonlarına daldırma parametrelerine olumlu cevap vermediği tespit edilmiş, bu nedenle de sürgünler için farklı immersiyon parametreleri denenmemiştir. Farklı immersiyon sürelerinde köklenme ortamına alınan erkek antepfıstığı sürgünleri dört haftalık süre

sonunda, kök oluşum yüzdeleri alınarak kaydedilmiştir. Elde edilen veriler χ^2 analizine tabi tutulmuş, sonuçlar erkek antepfıstığı için Çizelge 4.1.7.2' de verilmiştir.

1gr/l IBA içerisine daldırılan olgun erkek sürgünler immersiyon süresi bakımından en iyi kök oluşumunu, 20 sn. süre ile bekletme parametresinde verdiği gözlenmiş (Şekil 4.1.7.2) ve immersiyon süresinin artışına bağlı olarak, kök oluşum oranında azalma tespit edilmiştir. Yapılan denemelerde, materyal olarak kullanılan olgun erkek antepfıstığı sürgünlerinde, immersiyon süresi bakımından önemli derecede bir farklılık gözlenmiştir.

4.1.8. Köklenme Çalışmaları ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma

Şimdiye kadar gerek genç (2–4 yaş) gerekse de olgun antepfıstığı sürgünlerinin (25–30 yaş) *in vitro* köklendirilmesi çalışmalarında, genellikle 1.5–4 cm boyuna ulaşmış eksplantlar kullanılmıştır^{9.11.3.4.5}.

Çalışmamızda ise, *in vitro* köklenme çalışmaları için, 25-30 yaşında olgun dişi ve erkek antepfıstığı ağaçlarına ait apikal tomurcuklardan çoğaltılan, 3–4 cm uzunluğundaki sürgünler kullanılmıştır.

Antepfıstığı sürgünlerinin *in vitro* köklendirilmesi çalışmalarında en uygun oksin tipinin IBA olduğu tespit edilmiştir¹⁹. Bu çalışmaya göre, sürgünlerin köklendirilmesi, kültürün ilk 7 günü karanlık şartlar altında, IBA destekli 1/2 kuvvette hazırlanan MS besi ortamında inkübasyon ve sonrasında ise 1–2 mm uzunluğa ulaşan köklerin oksin içermeyen ortama aktarılması ile gerçekleştirilmiştir.

Aynı araştırmacılar tarafından yapılan, juvenil *P.vera* ağaçlarına (2 yaş) ait sürgünlerin köklendirilmesi ile ilgili bir diğer çalışmada ise, farklı IBA konsantrasyonlarının etkileri test edilmiş ve sonuç olarak köklenme ortamına eklenen

2.5, 3.0 veya 3.5 mgL⁻¹ IBA konsantrasyonları arasında gelişen kök sayısı bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık olmadığı belirlenmiş ve köklenmenin, bu her üç konsantrasyonda da yaklaşık olarak % 80 oranında gerçekleştiği bildirilmiştir¹⁹.

In vitro olarak elde edilen antepfıstığı sürgünlerinin köklendirilmesi çalışmalarında, optimum köklenme elde edilmesi için, alt kültürü yapılmış eksplantların kullanılması ve köklendirilecek sürgünlerin 1 mgL⁻¹ ve/veya 2 mgL⁻¹ oranlarında IBA eklenmiş besi ortamında kültüre alınması gerektiği bildirilmiştir³.

Bir başka çalışmada ise, besi ortamına (sıvı veya katı) NAA ve IBA eklenmesiyle köklenme oranlarının artırıldığı ve en iyi köklenme yanıtının kâğıt filtre köprüleri ve NAA ile desteklenen sıvı ortam kullanıldığında gerçekleştiği bildirilmiştir².

Köklenmeye alınacak eksplantların olgun *P.terenbinthus* ağaçlarından alındığında %60 oranında¹¹, ancak dört yaşına kadar büyümüş *P.vera* ağaçlarından alındığında, %30–40 oranında²²,daha düşük bir köklenme oranı ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, köklenmeye alınacak sürgün uçlarının 100 mgL⁻¹ IBA solüsyonuna 10 sn daldırılması işleminin, % 50 oranında köklenme ile sonuçlandığı da rapor edilmiştir²².

Antepfıstığının diğer bir anacı olan *Pistacia khinjuk* Stocks'un tohumlarından *in vitro* olarak geliştirilen 2-3 cm uzunluğundaki apikal sürgün uçlarının köklendirilmesi çalışmalarında, 0.5 mgL⁻¹ IBA ile destekli MS besi ortamında kültüre alınan eksplantlardan, % 100 oranında köklenme elde edildiği tespit edilmiştir²⁴.

Bir diğer çalışmada, 30 yaşındaki antepfıstığı ağaçlarından alınan 3–4 cm uzunluğundaki gövde kısımları, 10 mgL⁻¹ BA ve 10 mgL⁻¹ IBA içerisinde

bekletilerek, yeni sürgün vermeye zorlanmış, daha sonra ise *in vivo* olarak gelişen lateral segmentler *in vitro* çoğaltma çalışmalarında eksplant olarak kullanılmıştır. Sonrasında ise, bu eksplantlardan çoğaltılmış sürgün uçlarının köklendirilmesi çalışmalarında, en iyi sonucun 2.0 mg l^{-1} IBA destekli MS besi ortamından alındığı rapor edilmiştir¹⁰.

30 yaşındaki antepfıstığı (*Pistacia vera* L. var. “Siirt”) ağaçlarına ait *in vitro* mikroaşılınmış fidanların, $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA destekli besi ortamında köklendirildiği (% 36) ve köklenme ortamına aktarılan bu mikroaşılı fidanlardan aynı zamanda aksiler sürgünlerin (% 28.5) oluştuğu rapor edilmiştir¹⁵.

P.paleastina (3 yaş) ile aşılınmış *P.vera*’ya ait sürgün uçlarının mikroçoğaltımı ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise, 1–3 cm uzunluğunda sürgünler 6.0 mg l^{-1} NAA içeren besi ortamında %62 oranında köklendirilmiştir²⁵. Aynı çalışmada, kültürün ilk haftasında köklenme ortamında tutulan sürgünlerin, daha sonra iki haftalık bir süre ile herhangi bir oksin içermeyen besi ortamına alındığı zaman, eksplantların tabanında bir kallus kütesinin oluştuğu ve bu kütenin kök oluşumunu teşvik ettiği ve aynı zamanda NAA’in köklenme için kullanılabilecek en iyi oksin çeşidinin olduğu da rapor edilmiştir.

P.vera sürgün kültürlerinde; Barghchi ve Alderson²⁶, Martinelli²², Mederos ve Cerreno²⁷, Parfitt ve Almehti⁹, Onay⁴, Ozden-Tokatlı¹⁴ ve Tilkat⁵ çalışmalarında, en iyi oksin tipinin IBA olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ise, olgun erkek ve dişi antepfıstığı ağaçlarından elde edilen sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesi çalışmalarında, literatür çalışmaları ışığında, Dolcet-Sanjuan ve Claveria²⁵,’nın aksine, diğer tüm araştırmacıların raporları da göz önüne alınarak, oksin tipi olarak IBA kullanılmış, ancak sürgünlerin köklendirilmesi

alışmalarında kullanılan oksin, materyallerin kültüre alınacağı besi ortamına değil, daha önce antepfıstığının *in vitro* köklendirme çalışmalarında Abousalim³'in *in vivo* köklendirme çalışmalarında ve Al Barazi and Schwabe²⁸'nin de rapor ettiği gibi, materyallerin kesik olan bazal uçlarına doğrudan olarak uygulanmıştır. Kklendirilecek eksplantların, yüksek IBA konsantrasyonlarına daldırılmasının köklenme üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmamızda, test edilen farklı IBA konsantrasyonları arasında en iyi sonucu, erkek antepfıstığı sürgünleri için ise % 90 köklenme oranıyla 1.0 g⁻¹ IBA solusyonunda 20 sn. bekletme işleminin verdiği tespit edilmiştir (izelge 4.1.7.2).

4.2. SİTOGENETİK ÇALIŞMALAR İLE İLGİLİ GENEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.2.1. Karyolojik Çalışmalar ile İlgili Bulgular

Bu araştırmada, antepfıstığının erkek apikal tomurcuklarından *in vitro* ortamda üretilen ve *in vitro* ortamda çimlendirilen tohumlarından elde edilen köklere uygulanmak üzere, başarılı bir karyotip analiz tekniği geliştirilmiştir (Çizelge 4.2.1). Geliştirilen tekniğe göre, kromozom morfolojileri gözlenebilen olgun erkek bireyler (Çizelge 4.2.5^a) ile tohumlara ait (Çizelge 4.2.5^b, Çizelge 4.2.5^c) çok sayıda preparatın incelenmesi sonucunda, en iyi 5 metafaz plak belirlenmiş ve bunlara ait karyotip analiz sonuçları, Duncan testine tabi tutularak çizelgeler halinde verilmiştir. Denemeler için Şahabettin Elçi²⁹, nin, ezme preparat yönteminden yararlanılmıştır.

Yapılan sitolojik analizlerde, test edilen tüm ilk işlem solüsyonları (P-diklorobenzen, α -monobromonaftalen, 8-hidroksikinolin, Kolşisin) arasında gözlenebilen en iyi metafaz sonucunu, P-diklorobenzen ile 4 saat uygulama parametresinin verdiği tespit edilmiştir. Fiksasyonun optimizasyonu çalışmalarında, test edilen fiksatifler arasında (Farmer ve Karnoy), Farmer çözeltisinin (3:1; Alkol: Glasial asetik asit) en iyi olduğu, 16 ile 24 saat arasında değişen fiksatifte bekletilme süresinin ise gözlenebilir metafaz plaklarının tespiti bakımından neredeyse hiç öneminin olmadığı gözlenmiştir.

Kromozom morfolojisi üzerine, hidroliz süresinin önemli bir etken olduğu ve sonuçları hassasiyetle değiştirdiği yapılan denemelerle tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre en iyi hidroliz süresinin 6. 7. ve 8. dk.'lar olduğu belirlenerek, bunun üzerinde veya altındaki hidroliz sürelerinin kromozom sayımını güçleştirdiği belirlenmiştir.

Çalışmada test edilen boyalar arasında (Aseto-karmin, Fulgen, Aseto-orsein, Hematoksilen) en iyi boya tipinin, Feulgen olduğu ve bu boyada optimum bekletme süresinin ise 2 saat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, kök uçlarının boyamadan sonra musluk suyu ile muamele edilmesinin, incelenen preparatlarda kromozom renginin koyulaşmasına ve kromozom morfolojilerinin daha net görülmesine yol açtığı da belirlenmiştir.

4.2.2. Karyolojik Çalışmalar ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma

Antepfıstığı'nda kromozom morfolojisinin aydınlatılması, özellikle de cinsiyet kromozomlarının tanımlanması, hem bitki ıslahı hem de *in vitro* klonal çoğaltımı açısından oldukça önem taşımaktadır. Kromozom durumlarından cinsiyet tayini yapılabilirse, genç dokulardan klonlanmış olan hatların *in vitro* cinsiyet tayini yapılabilir ve bu sayede bu hatların klonal durumları da ortaya çıkarılabilir. Kromozomal karakterlerin gözlenmesi, *P.vera*'nın dioik yapısının aydınlatılmasını ve cinsiyet oluşumunu etkileyen genetik faktörlerin belirlenebilmesini sağlar. Bu bağlamda öncelikle, bitkilerde genetik yapının aydınlatılması için kromozomal karakterlerin ortaya çıkarılmasında şimdiye kadar geliştirilen metotlara değinmek faydalı olacaktır. Bu metotların çoğunluğunun ortak yanı, hücre bölünmesi esnasında bölünmeyi kontrol edecek ve kromozomların istenen şekle gelmesine yardımcı olacak ilk işlem solüsyonlarının kullanılmasıdır. Bunun için değişik araştırmacılar tarafından, 8-hidroksikinolin³⁰, α -monobromonaftalin^{31.29.4.32}, P-diklorobenzen^{29.33}, kolşisin^{34.35.36.37.38.39.40.41} gibi, ön işlem solüsyonları kullanılmıştır.

Rousi³⁰, kolşisin'in kromozomları iyi ayırdığını, ancak fazla büzdüğünü, bu nedenle bazı yapıların kaybolabileceğini ve 8-hidroksikinolin'in ise kromozomlarda haç işareti şekillerini arttırdığından, sentromer yerinin tespitinin zorlaştığını, P-

diklorobenzen'in kromozomların çok iyi bir şekilde dağılmasını sağladığını, özellikle sekonder yapıları da iyi belirlediğini belirtmektedir. Ayrıca Elçi²⁹, α -monobromonaftalen'in iyi bir işlem solüsyonu olduğunu, bunun yanı sıra P-diklorobenzen'le de 3–4 saatlik ön muamelenin başarılı sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

Çalışmada ise, daha önce en iyi ilk işlem solüsyonları oldukları rapor edilen kolşisin, 1-monobromonaftalen ve 8-hidroksikinolin'in aksine, P-diklorobenzen'in doymuş çözeltisinin daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Fiksasyon aşaması, kromozom kayıplarına neden olması bakımından önemlidir. Genellikle kullanılan asetik asitin fazla olması, hücrelerin zarar görmesine neden olabilmektedir. Yaptığımız bütün denemeler için fiksatifler, uygulamadan yaklaşık 2 saat önce hazırlanarak, +4°C'de buzdolabında bekletilmiştir. *Pistacia* cinsine ait türlerin kromozomal analizlerinde, çoğunlukla 3 çeşit fiksatifin kullanıldığını söyleyebiliriz. Bunlar: Piennar çözeltisi^{39,40,41}, Karnoy çözeltisi³² ve Farmer çözeltisidir⁴. Çalışmamızda, Farmer çözeltisi kullanılmış ve bu fiksatifin Karnoy'a göre daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. Feulgen ile yapılan boyamalarda kromozomların optimum boyayı almalarının en önemli kurallarından birisi, hidroliz süresinin materyale göre doğru belirlenmiş olmasıdır²⁹. Bunun için Fox⁴²'un belirttiği gibi, en uygun hidroliz, 60 °C'de 1 N HCl içerisinde materyalin 5 ile 20 dk.'ya kadar çeşitli sürelerde bekletilmesiyle yapılmaktadır. Hidroliz için zaman, sıcaklık derecesi ve hidrolizde kullanılan HCl'in konsantrasyonu önemlidir.

Yapılan denemelerde antepfıstığı için hidroliz süresi, 6–8 dakika olarak bulunmuştur. Hidroliz işlemi sonrası kök uçları tekrar musluk suyu ile yıkanarak boyamaya bırakılmıştır. Feulgen ve Aseto-karmin boyalarının 1960'lardan bu yana

rutin olarak sitolojik analizlerde kullanılan DNA boyaları olduğu ve bu iki boyanın da diğerk boyalar gibi, DNA'yı koyu pembe-mor renge boyayarak, ışık mikroskobunda görünür hale gelmesini sağladığı bilinmektedir²⁹. İla ve ark.³², boyama işlemini arttırmak için kök uçlarını bir denemede sadece fulgen boyasına, diğerk bir denemede ise önce aseto-karmin sonra fulgen boyasına aktararak, boya parametrelerini denemişler ancak, sadece fulgen uygulamasının daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Elçi²⁹, Fulgen ile boyamada dokunun boyayı almasının ilk 5 dakikada kendini gösterdiği ve yarım saat içinde kök uçlarının gittikçe koyu viole renk aldığı ancak, en iyi boyama süresi için en az bir saatin geçmesi gerektiğini rapor etmiş ve fulgenden çıkarılan kök uçlarının boyayı daha iyi alması için, 10 dakika damıtık suda bekletildikten sonra preparasyona alınması işleminin boyamayı arttırdığını bildirmiştir. Çalışmamızda kullanılan boya tipi ve süresi, Elçi²⁹ ile uygunluk göstermiştir. Sitogenetik çalışmalar aşamasında yapılan deneyler süresince; fiksasyon, hidroliz ve boyama işlemlerinden sonra, kök uçları saf su ile muamele edilerek, optimum preparatların elde edilmesi sağlanmıştır.

4.2.3. Kromozomların Morfolojik Analizi ile İlgili Bulgular

In vitro ortamda mikroçoğaltılmış olgun erkek antepfıstığı sürgünlerinin ve antepfıstığı tohumlarının köklendirilmesinden elde edilen kromozomların morfolojik analizi ile ilgili yapılan incelemelerde, elde edilen metafaz plakları doğrultusunda, antepfıstığı'nın diploid kromozom sayısının $2n=30$ olduğu tespit edilmiştir. Kromozomların morfolojik analizlerinde, Levan ve ark.⁴³ tarafından geliştirilen nomenklatür sistemi uygulanmıştır. İncelenen plaklarda, ploidi seviyesine rastlanmamıştır. Plak içerisinde, kromozomların morfolojileri bakımından farklılıklar gözlenmiştir. Sentromer tipi bakımından kromozomların metasentrik,

submetasentrik, subtelosentrik ve telosentrik sentromer yapısında oldukları tespit edilmiştir. Kromozomların kollarına bağlı herhangi bir satellite rastlanmamıştır. Erkek antepfıstığı metafaz plaklarında heteromorf, dişi antepfıstığı metafaz plaklarında ise, homomorf cinsiyet kromozomları belirlenmiştir. Antepfıstığının dişi anaçları verecek olan tohumları için, komplementteki en büyük kromozom çiftinin metasentrik sentromerli olduğu ve bu kromozom çiftinin cinsiyet kromozomları (XX) olduğu tespit edilmiştir. Geriye kalan 8 kromozom çiftinin submetasentrik, 3 kromozom çiftinin metasentrik, 2 kromozom çiftinin subtelosentrik ve 1 kromozom çiftinin ise telosentrik sentromerli olduğu gözlenmiştir. Erkek bireyler için komplementteki en büyük kromozomun metasentrik sentromerli cinsiyet kromozomu olduğu (X), karyotip analizi yapılırken çiftleri seçilen kromozomlar tamamlandığında, açıkta kalan ve subtelosentrik sentromer yapısı gösteren kromozomun ise, erkeğe özgü 'y' cinsiyet kromozomu (Xy) olduğu tespit edilmiştir. Geriye kalan 8 kromozom çiftinin submetasentrik, 3 kromozom çiftinin metasentrik, 2 kromozom çiftinin subtelosentrik ve 1 kromozom çiftinin ise telosentrik sentromerli olduğu belirlenmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında, antepfıstığı için çalışmamızda tespit ettiğimiz karyotip formülü,

Dişi bireyler için:

K (n:15, 2n:28+XX): 8sm +3m +2st +1t +XX,

Erkek bireyler için ise:

K (n:15, 2n:28+Xy): 8sm +3m +2st +1t + Xy dir.

4.2.4. Kromozomların Morfolojik Analizi ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma

Antepfıstığı'nda yapılan kromozom çalışmaları ile ilgili literatür taramalarında, kromozom sayısı bakımından *Pistacia* cinsine ait türler ile ilgili farklı araştırmacılar tarafından, farklı sonuçlar rapor edilmiştir: Fasihi- Harandi ve Behboodi³⁸ *P.chinensis* için $2n= 24$, *P.integerrima* için $n= 15$, *P.khinjuk'* ta $2n= 24$, *P.lentiscus*'ta $2n= 24$, *P.terebinthus*'ta $2n=30$ ve *P.vera*'da $2n=30$ olarak bildirilmiştir. Bunun yanında, *Pistacia vera* için diploid kromozom sayısının $2n=32$ ^{26.44} olduğu ve *Pistacia lentiscus* için diploid kromozom sayısının $2n=24-30$ ^{45.46.47.48} arasında değiştiği yönünde tespitler bulunmaktadır. Çeşitli bitki gruplarında yapılan karyolojik çalışmalarda, kromozom sayısının populasyonlar arasında ve hatta içerisinde bile değişkenlik gösterebileceği rapor edilmiştir⁴⁹. Bu duruma, antepfıstığı'nın dış döllenmeye açık bir yapı arz etmesi ve farklı coğrafik alanlarda yayılım göstermesinin neden olabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda, daha önceki çalışmalarda rapor edildiği gibi, ploid seviyesi bakımından herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra, yapılan karyotip analizleri sonucunda, türe ait kromozom sayısının diploid olarak tespit edilmesi, antepfıstığı'nın poliploid bir tür olmadığını destekler niteliktedir.

Kromozomların morfolojik özellikleri bakımından, oldukça sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. İran'da yetişen *P.vera* türü üzerinde yapılan kromozom sayımı ve karyotip analizi çalışmalarında; 4 çiftin metasentrik, 8 çiftin submetasentrik ve 3 çiftin de akrosentrik sentromer yapıda olduğu, rapor edilmiştir⁴⁰. Aynı çalışmada *P.khinjuk'*a ait analizde ise, 7 çiftin submetasentrik, 5 çiftin metasentrik sentromerli, *P.atlantica*'nın alt türlerinden; cabulica, kurdica ve

mutica’da ise, 3 çiftin metasentrik 10 çiftin submetasentrik ve 2 çiftin ise akrosentrik sentromerli olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, metasentrik çiftlerden birinin heterokromatin yapı gösterdiği ve bu kromozomların cinsiyet kromozomları olabileceği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, *Pistacia* cinsine ait temel kromozom sayılarının 12, 14 and 15in katları şeklinde bulunduğu ve *Pistacia khinjuk* (Buttum, 2n=28)’un, median ve submedian sentromer pozisyonlarına sahip olan simetrik bir karyotipe olup, atasal türlerin de simetrik karyotipe sahip olmaları nedeniyle, başlangıç temel kromozom sayısının 14 olduğu, 12 ve 15’in de 14’ten türev aldığını bildirmişlerdir. Ayrıca *Pistacia*’da poliploidi ile ilgili herhangi bir çalışma rapor edilmediği için, türleşmenin oluşumu ve gelişiminde diploidi fenomeninin önemli bir rol oynadığını da rapor etmişlerdir.

Ancak bu araştırmada, antepfıstığı dişi bireylerinde (tohum) gözlenen homolog kromozomların, 8 çift submetasentrik, 4 çift metasentrik (bunlardan en büyük çift cinsiyet kromozomu, ‘XX’), 2 çift subtelosentrik ve 1 çift ise telosentrik sentromerli yapıda oldukları tespit edilmiştir. Tüm antepfıstığı erkek bireylerinde (olgun materyal ve tohum) gözlenen kromozom komplementinin ise, 8 çift submetasentrik, 3 çift metasentrik, 2 çift subtelosentrik, 1 çift telosentrik sentromerli kromozom ile 1 çift cinsiyet kromozomundan (1 adet cinsiyete özgü metasentrik ‘X’ ve 1 adet cinsiyete özgü subtelosentrik ‘y’, ‘Xy’) oluştuğu belirlenmiştir.

Bu bağlamda, bu taksonların karyolojik varyasyon gösterdiği söylenebilir. Ancak, cinsiyet kromozomlarından ‘X’ kromozomunun metasentrik sentromerli, ‘y’ kromozomunun ise subtelosentik sentromerli yapı göstermesi yönündeki bulgularımız, Ghaffari ve Fasihi Harandi⁴⁰’nin tezini kısmen doğrulamaktadır.

4.2.5. Karyotip analizi ile İlgili Bulgular

Çalışmamızda elde edilen metafaz plakları arasından test edilen materyal tiplerinin her biri için, bir adet metafaz plak fotoğrafı verilmiştir. Yapılan karyotip analizleri ise, her bireye ait en iyi 5 adet metafaz plağın ortalamasını içermektedir.

İncelenen metafaz plaklarında;

Olgun erkek antepfıstığı için diploid kromozom sayısı $2n=28+Xy$ 'dir.

Haploid komplementteki kromozomların total kromozom uzunluğunun 5,69 ile 20,19 μ m; kol oranlarının 1,12 ile 8,90 μ m; sentromerik indekslerinin 10,35 ile 47,43 μ m; nispi boylarının 2,22 ile 8,71 μ m; arasında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.5^a).

Antepfıstığı tohumları için diploid kromozom sayısı, hem $2n=28+XX$ hem de $2n=28+Xy$ olarak tespit edilmiştir.

Antepfıstığında dişi bireyleri verecek olan tohumlar için diploid kromozom sayısı $2n=28+XX$ 'tir.

Haploid komplementteki kromozomların total kromozom uzunluğunun 5,76 ile 35,10 μ m; kol oranlarının 1,17 ile 8,63 μ m; sentromerik indekslerinin 10,58 ile 45,93 μ m; nispi boylarının 2,04 ile 12,4 μ m; arasında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.5^b).

Antepfıstığında erkek bireyleri verecek olan tohumlar için diploid kromozom sayısı $2n=28+XY$ 'tir.

Haploid komplementteki kromozomların total kromozom uzunluğunun 9,43 ile 28,60 μ m; kol oranlarının 1,02 ile 9,05 μ m; sentromerik indekslerinin 10,01 ile 49,42 μ m; nispi boylarının 3,33 ile 10,10 μ m; arasında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.5^c).

Antepfıstığı tohumlarından elde edilen kromozomlar ile mikroçoğaltılmış olgun erkek kromozomları arasında kromozomların sayı ve sentromer tipi bakımından önemli bir farklılık görülmediği ancak morfolojik büyüklük bakımından mikroçoğaltılmış olgun erkek bireylere ait kromozomların daha küçük bir ortalama değere sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.2.6. Karyotip Analizi ile İlgili Değerlendirmeler ve Tartışma

Bu araştırmada, kromozom uzunluğu yönünden gerçek değeri elde edebilmek için, morfolojik yapıları belirgin ancak, kısaltmaları (büzülmeleri) farklı derecede olan kromozomlar kullanılmıştır. Bu nedenle, özellikle kromozom uzunluğu yönünden minimum ve maksimum değerler arasında farklılıklar gözlenmektedir. Aynı zamanda, olgun erkek antepfıstığı sürgünleri ile antepfıstığı tohumlarına ilişkin karyotip analizleri karşılaştırıldığında, bazı benzerlikler ve farklılıklar görülmektedir. Ancak, antepfıstıklarının karyotip çalışmalarından elde edilen tüm bulgular, sentromer tipleri bakımından standart bir yapıya sahip olduklarını göstermiştir. Dişi antepfıstıklarında 1. kromozom çifti cinsiyet kromozomu ve metasentrik sentromerli; 7. 12 ve 13. kromozom çiftleri metasentrik; 2. 3. 4. 5. 6. 8. 10 ve 11. çiftleri submetasentrik; 9 ve 15. çiftler subtelosentrik ve 14. çift ise telosentrik sentromerli olarak tespit edilmiştir. Erkek antepfıstıklarında ise 1. kromozom çifti heteromorf yapıda, bunlardan birinin metasentrik (X), diğerinin subtelosentrik (y) sentromerli cinsiyet kromozomları olduğu, gerisinin dişi bireylerde görülen sentromer yapısı ve sayısını içerdiği tespit edilmiştir. Konu ile ilgili yapılan literatür taramalarında, antepfıstığının kromozom analizlerine ilişkin olarak, sadece idiogram bulgularının yer aldığı, ancak analize ait sayısal değerlerin bulunmadığı, az sayıda çalışmaya rastlanmıştır⁴⁰.

4.2.7. Karyogram Çalışmaları ile ilgili Bulgular

In vitro ortamda mikroçoğaltılmış olgun erkek antepfıstığı sürgünlerinin ve antepfıstığı tohumlarının köklendirilmesinden elde edilen kromozomların morfolojik özellikleri, karyotip analizlerinde açıkça görüldüğünden; homolog kromozomların, boy hizasında büyükten küçüğe doğru sıralanması suretiyle karyogramları yapılmıştır (Şekil 4.2.7^a, Şekil 4.2.7^b, Şekil 4.2.7^c).

4.2.8. Karyogram Çalışmaları ile ilgili Değerlendirmeler ve Tartışma

In vitro çoğaltılmış olgun erkek antepfıstığı sürgünlerinin ve antepfıstığı tohumlarının köklendirilmesinden elde edilen kromozomların karyogramı, bu çalışma ile ilk kez verilmiştir. Yapılan literatür taramalarında konu ile ilgili herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Şekil 4.2.7^a, Şekil 4.2.7^b, Şekil 4.2.7^c 'de gösterildiği gibi, erkek ve dişi bireylere ait cinsiyet kromozomlarının karyogramda ilk sırayı aldıkları görülmektedir.

4.2.9. İdiogram Çalışmaları ile İlgili Bulgular

Karyogramları yapılan homolog kromozomların, diagramatik olarak düzenlenmesi de gerçekleştirilmiştir. Bu düzenlemeye ait idiogram; Çizelge 4.2.9^a, Çizelge 4.2.9^b ve Çizelge 4.2.9^c halinde verilmiştir. Her bireye ait idiogram; her bireye ait 5 metafaz plağının Duncan testine tabi tutulması ile elde edilen ortalamalar sonucunda çizilmiştir.

4.2.10. İdiogram Çalışmaları ile ilgili Değerlendirmeler ve Tartışma

Olgun erkek bireyler ile antepfıstığı tohumlarına ait kromozomların idiyogramları verilmiştir. Yapılan literatür taramalarında, Ghaffari ve Fasihi Harandi⁴⁰, İran'da yetişen *P.vera*, *P.khinjuk* ve *P.atlantica*'nın alt türlerinden; cabulica, kurdica ve mutica'da idiogram çalışmaları gerçekleştirmiş ancak

idiogramlar, karyotip analizlerinin diagramatik şekli olduğundan, konu ile ilgili detaylı tartışma alt bölüm 4.2.6.'da verilmiştir.

4.2.11. Cinsiyet Kromozomları ile ilgili Genel Değerlendirme ve Tartışma

Cinsiyet kromozomları, yüzyılı aşkın bir süre önce keşfedilmiştir⁵⁰. Bitkilerde kromozom temelli ilk cinsiyet belirleme çalışması ise, Allen⁵¹ tarafından, *Sphaerocarpos* (koyunotu)'nda yapılmıştır. Daha sonrasında, cinsiyet ile ilgili kromozomlar, dioik bitkilerin birçok türünde keşfedilmiş ve Lee⁵² ve Pollock⁵³, cinsiyet ile satellit bazında heteromorfik kromozom çifti arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu keşfin ardından, cinsiyet kromozom gelişimi teorik, sitogenetik ve genetik çalışmalarla belirlenmeye başlanmıştır.

Geçen 20 yılda geliştirilen genomik ve moleküler biyoloji teknikleri ile, memelilerde yapıldığı gibi, bitkilerde de cinsiyet kromozomuna ait sekansların ve cinsiyet belirlenmesini sağlayan genlerin klonlanması mümkün olmuştur.

Dioik ve poligamik bitkilerde bulunan cinsiyet kromozomları, sonraki nesillerinde genetik çeşitliliği arttıran çapraz tozlaşmayı garanti altına almak için, bir dizi mekanizma geliştirmişlerdir⁵⁴. Cinsiyet özelleşmesi, erkek steril ya da dişi steril mutasyonlar yoluyla, tüm bitki familyalarının % 75'inde evrimleşmiş ancak, heteromorf yapıda cinsiyet kromozomları, sadece dört bitki familyasında (Cannabidaceae, Caryophyllaceae, Cucurbitaceae ve Polygonaceae) açık bir şekilde tanımlanmıştır.

Kromozomal cinsiyet tayininde kullanılan model türlere örnek olarak, ballica (*Silene latifolia*; XY sistem), şerbetçi otu (*Humulus lupulus*; X:A sistem) ve hem XY benzeri hem de X:A benzeri bir sisteme sahip olan kuzukulağı (*Rumex* spp.)'verilebilir⁵⁵.

Dioik olduğu çok eskiden beri bilinen ve dioik yapı için model bir bitki olan *Melandrium album*'a ait anterlerden türetilmiş haploid bireylerin, flow-cytometric, fenotipik, sitolojik ve genetik anlamda incelenmesi sonucunda, türün % 90 oranında dişi bireylerden ($2n=24, 24,XX$) oluştuğu, ancak genomik yapıda hiç erkeğe rastlanılmadığı, geriye kalan yüzdelik dilimi ise erkek bireylerin yerine, hermafrodit ve atipik olan bazı dişi bitkilerin oluşturduğu belirtilmiştir. Türe dâhil olan ancak, oldukça androjenik bir diğerk bitkide (M5045) ise, türe özgü normal erkek formülü: $2n=24,Xy$ yerine, kromozomal formül: $2n=26,Xy$ olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda, bu dioik bitki türünde, kromozomların değışkenlik gösteren üç tipi arasında, gelişimsel dönemlerde etkileşimlerin olduğu kanısına varılmıştır⁵⁶.

Bir diğerk dioik bitki olan *Asparagus* (*Asparagus officinalis*)'un ise, dişi bireylerinin kromozom sayısı $2n = 18 + XX$ iken, erkek bireyleri $2n = 18 + Xy$ (ya da süper erkek: yy) kromozom yapısına sahiptirler. Erkek populasyonlarda çok nadir de olsa hermafrodit çiçek yapısına sahip bitkilere de rastlandığı için, bu bitkiler ayrıca süper-erkek geliştirmek için de kullanılabilir⁵⁷. Grant ve ark⁵⁶, cinsiyet belirlenmesinin moleküler biyolojisini araştırmak için, model olarak çeşitli cinsiyet mekanizmalarına sahip bitkileri (*Silene latifolia* - *Melandrium album*) kullanarak, bitki cinsiyet kromozomlarının yapılarını aydınlatmaya çalışmışlar ve *Melandrium album*'da cinsiyet belirlenmesinin sitogenetik temelini memelilere benzediğini, zira bu bitki türünde de dominant erkekliği sağlayan genleri taşıyan erkeğe özgü bir y kromozomu bulunduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmaya göre; eğer genomda bu kromozomdan bulunuyorsa bitki erkek, bulunmuyorsa dişidir. Memeliler gibi, *Melandrium album*'un y kromozomunda DNA yapısı tekrar eden diziler bakımından zengin ve ökromatik yapıdadır.

Melandrium album'da y kromozomu için rapor edilen ökromatik yapının aksine, antepfıstığında cinsiyet kromozomları için, heterokromatik yapıdan bahsedilmiştir⁴⁰. Çalışmaya göre, İran'dan bazı antepfıstığı tür ve alttürlerine ait karyotip analizleri rapor edilmiş, *P.vera* için kromozom yapısının, 3 akrosentrik, 8 submetasentrik ve 4 metasentrik kromozom çiftinden oluştuğu ve total kromozom sayısının $2n=30$ olduğu, metasentrik kromozom çiftlerinden birinin ise heterokromatik yapıda bulunduğu tespit edilmiştir. Buttum'un (*P.khinjuk*, $2n=24$) karyotipinin ise, yedi çift submetasentrik ve bir çifti yine heterokromatik yapıda olan 5 çift metasentrik kromozom içerdiği bildirilmiştir. *Cabulica*, *kurdica* ve *mutica* alt türlerinin de dâhil olduğu *P. atlantica*'da kromozom yapılarında ise, üç metasentrik, dokuz submetasentrik ve ik adet akrosentrik kromozom çiftine rastlanmış, total kromozom sayısının ise $2n=28$ olduğu ve bu üç alt türde de, bir çift metasentrik kromozomun heterokromatik yapıda olduğu tespit edilmiştir. Özetle, tüm tür ve alt türler karşılaştırıldığında, genomda tespit edilen 4 çift metasentrik kromozomdan birinin heterokromatik yapıda olduğu ve bu iki metasentrik kromozomun, *pistacia* cinsine ait cinsiyet kromozomları için aday oldukları rapor edilmiştir⁴⁰.

Çalışmamızda ise, genomda 4 çift metasentrik kromozom olduğu tespit edilmiş, ancak Ghaffari ve ark.⁴⁰'nın rapor ettiğinin aksine bu metasentrik kromozom çiftinin heterokromatik yapıda olmadığı belirlenmiştir. Yaptığımız karyotip analizleri sonucunda, cinsiyet kromozomlarını oluşturan 'X' kromozomunun metasentrik sentromerli, ancak 'y' kromozomunun ise subtelosentrik sentromerli yapıda olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızda, Ghaffari ve ark.⁴⁰'nın rapor ettiği gibi, herhangi bir heterokromatik yapı gösteren cinsiyet kromozomu

tezinden ziyade, subtelosentrik yapıda bir ‘y’ kromozomu ve metasentrik yapıda bir ‘X’ kromozomunun varlığı sonucuna ulaşılmıştır.

Bitkilerde cinsiyet mekanizmalarının yapılarının ortaya konulmasında, karyolojik ve karyotip çalışmaların yanı sıra, son zamanlarda moleküler biyoloji tabanlı çalışmalar da sıklıkla gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Zira erkek ve dişi bitkilerin erken aşamada tanımlanması, dioik türlerin ıslah programlarının etkili bir şekilde yürütülmesini sağlamaktadır.

Jiang and Sink⁵⁷, kuşkonmazda cinsiyet lokuslarına 1.6 cM uzaklıkla bağlı olan SCAR markörleri geliştirmişlerdir. Reamon Buttner ve Jung⁵⁸, dişi kuşkonmaz kromozomlarını, erkeklerden ayırabilen ko-dominant STS markörü geliştirmişlerdir.

Antepfıstığının cinsiyet mekanizmasının aydınlatılması için yapılan bir çalışmada ise; Kafkas ve arkadaşları⁵⁹, Türkiye'nin Manisa ili Yunt Dağı'nda, dünyada benzeri olmayan birkaç adet monoik (erkek ve dişi çiçek salkımlarının aynı ağaç üzerinde oluşması) *P.atlantica* genotipi bulunduğunu ve bu ağaçları kullanarak tür içi ve türler arası melezlemeler yoluyla monoik *P.vera* çeşitleri geliştirmeyi amaçladıklarını rapor etmişlerdir. Çalışmada, iki adet monoik atlantik sakızı genotipi, hem ana hem de tozlayıcı olarak kullanılmıştır: birinci genotip, üzerinde erkek ve dişi çiçek salkımlarını karışık olarak bulunduran (M-Tip I) tamamen monoik genotip, öteki ise üzerinde sadece erkek çiçek salkımları bulunduran birkaç dala sahip genotip (M-Tip II). Ayrıca, iki *P.vera* çeşidi (Ohadi ve Siirt) ve bir dişi *P.atlantica* genotipi ana, birer adet erkek *P.atlantica* ve *P.vera* genotipi tozlayıcı olarak kullanılmışlardır. Çalışmada toplamda, beş ana ve dört tozlayıcı arasında toplam 20 farklı melezleme kombinasyonu yapıldığı ve iki yıl süresince yapılan melezlemeler sonunda, *P.vera* ile monoik *P.atlantica* genotipleri arasında 1662, öteki

kombinasyonların herbirinden 50- 104 yavru bitki ve toplam olarak 3002 melez bitki elde edildiği ve bu bitkiler ile damla sulama ile sulanabilen modern ıslah bahçesi Gaziantep Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde kurulduğu da rapor edilmiştir. Tamamen monoik olan genotipin (M- Tip I) bazı çiçek salkımlarında hermafrodit çiçeklerin de gözlendiği ve bu çiçeklerden doğal ve yapay tozlama yöntemleriyle bitkiler elde edildiği bildirilmiştir. Ayrıca, ebeveyn olarak kullanılan bitkiler ile *P.atlantica*'nın ana olarak kullanıldığı kombinasyonlardan elde edilen melez bitkilerin morfolojik olarak tanımlandığı ve daha önce *P.vera* türünde dişi türe özgü bulunan RAPD cinsiyet DNA markörü⁶⁰ Siirt çeşidi melez bitkilerinde test edilmiş ve bu markörün Siirt çeşidinin atlantik sakızı melezlendiği kombinasyonlarda (yani türler arası melezlerde) çalışmadığı belirlenmiştir⁵⁹.

Kafkas ve ark⁶⁰, *P.vera* için anaç olarak kullanılan yabani türler olan *P.atlantica*, *P.terebinthus* ve *P.eurycarpa*'da cinsiyet ile ilişkili RAPD markörlerini belirlemek için yaptıkları araştırmada, denedikleri 472 primer içerisinde, sadece ikisinin (BC156 and BC360) *P.eurycarpa* için cinsiyet ile ilişkili bant oluşturduğunu, rapor etmişlerdir.

Antepfıstığının cinsiyet mekanizmasının moleküler yapısının ortaya konması için günümüze kadar yapılan çalışmalardan bir diğerinde ise, dokuz adet ISSR primeri kullanılarak, dört dişi ve erkek *Pistacia vera* L. çeşitlerinin (Akbari, Ahmad Aghaii, Fandoghi, Kaleh Ghochi) cinsiyetleri belirlenmiştir. Bu dokuz primerden ikisi (AC)8CG ve (AC)8TA dişi bireylerde cinsiyete bağlı DNA bantları üreterek, dişi ve erkek bireyleri tanımlayabilmiştir. Çalışmaya göre, PCR şartlarının, *Pistacia* çeşitlerinin cinsiyet tayini için uygun ve tekrarlanabilir olması, antepfıstığı bitkilerine

ait fidanların gelişimlerinin erken safhalarında cinsiyetlerinin belirlenmesine olanak sağlayabileceği belirtilmiştir⁴⁴.

Sonuç olarak, antepfıstığında çiçeklenmeden önce erkek ve dişi antepfıstığı fidanlarının ayırt edilebilmeleri için bir metod bulunmamaktadır. Çiçeklenmeden önce bitkilerin cinsiyetlerini ortaya koyacak bir metod, fidan aşamasında cinsiyetin ortaya konulmasını mümkün kılması bakımından, hem dişi bitkilerin ıslah ve yetiştiriciliğini, hem de farklı amaçlarla erkek ve dişi bitkilerin belirlenmesi çalışmalarını kolaylaştırarak, zamandan ve ekonomiden tasarruf sağlayacaktır

Bir bitki türüne ait olan kromozomal datalar, yetiştiriciler ve sitogenetikçiler için oldukça değerlidir. Kromozomal çalışmaların sonuçları, bitki taksonomisi ve filogenetik çalışmalarda kullanılabilir. Şimdiye kadar *Pistacia* cinsinde çok az sayıda kromozom sayım çalışması yapılmış ancak, bu çalışmaların sonuçları güncel olmadığı için, doğrulanması gerekmektedir.

ÇİZELGE VE ŞEKİLLER

Çizelge 4.1.1.1^a. Dişi antepfıstığı apikal tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının etkisi

İşlem	Uygulanan süre (dk)	Enfekte olan Tomurcuk (%)	Gelişen tomurcuk (%)	Kararan tomurcuk (%)
Kontrol		100	0.0	0.0
%10 NaOCl	30	40.0	40.0	20.0
%15 NaOCl	30	20.0	45.0	35.0
%20 NaOCl	30	20.0	40.0	40.0
%25 NaOCl	30	15.0	35.0	50.0
%30 NaOCl	30	10.0	30.0	60.0
$\chi^2(5df)$		$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$

Sonuçlar kültürün 28. gününde ve 20 tomurcuğun ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.1.1.1^b. Erkek antepfıstığı apikal tomurcuklarına NaOCl'in farklı konsantrasyonlarının yüzey sterilizasyonuna etkisi

İşlem	Uygulanan süre (dk)	Enfekte olan tomurcuk (%)	Gelişen tomurcuk (%)	Kararan tomurcuk (%)
Kontrol	-	100.0	0.0	0.0
%10 NaOCl	30	35.0	50.0	15.0
%15 NaOCl	30	20.0	55.0	25.0
%20 NaOCl	30	15.0	50.0	35.0
%25 NaOCl	30	10.0	45.0	45.0
%30 NaOCl	30	5.0	35.0	60.0
$\chi^2(5df)$		$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$

Sonuçlar kültürün 28. gününde ve 20 tomurcuğun ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.1.1.2^a. Dişi antepfıstığı apikal tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl'in farklı immersiyon sürelerinin etkisi

İşlem	Uygulanan süre(dk)	Enfekte olan tomurcuk (%)	Gelişen tomurcuk (%)	Kararan tomurcuk (%)
Kontrol	-	100	0.0	0.0
%15 NaOCl	30	20.0	45.0	35.0
%15 NaOCl	35	15.0	50.0	35.0
%15 NaOCl	40	5.0	55.0	40.0
%15 NaOCl	45	5.0	45.0	50.0
%15 NaOCl	50	5.0	40.0	55.0
$\chi^2(5df)$		$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$

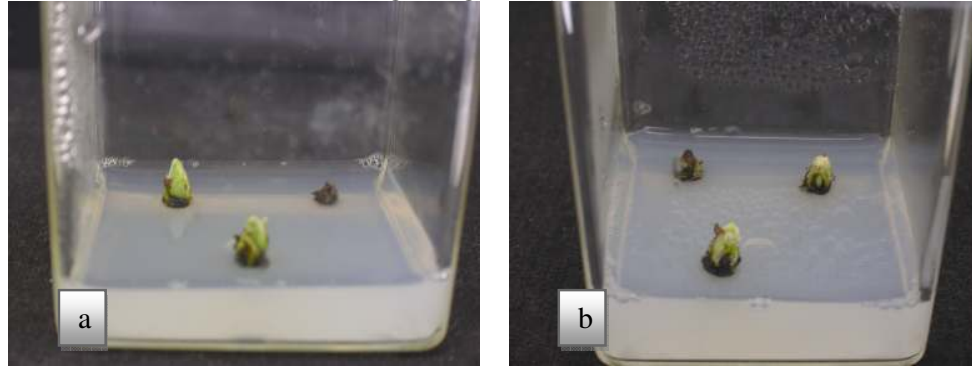
Sonuçlar kültürün 28. gününde ve 20 tomurcuğun ortalamasını göstermektedir

Çizelge 4.1.1.2^b. Erkek antepfıstığı apikal tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl'in farklı immersiyon sürelerinin etkisi

İşlem	Uygulanan süre(dk)	Enfekte olan tomurcuk (%)	Gelişen tomurcuk (%)	Kararan tomurcuk (%)
Kontrol	-	100.0	0.0	0.0
%15NaOCl	30	20.0	55.0	25.0
%15 NaOCl	35	10.0	60.0	30.0
%15 NaOCl	40	5.0	65.0	30.0
%15 NaOCl	45	5.0	55.0	40.0
%15 NaOCl	50	5.0	40.0	55.0
$\chi^2(5df)$		$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$	$P \leq 0,05$

Sonuçlar kültürün 28. gününde ve 20 tomurcuğun ortalamasını göstermektedir.

Şekil 4.1.1. Dişi (a) ve erkek (b) antepfıstığı tomurcuklarının MS besi ortamındaki genel görünüşleri



Çizelge 4.1.3^a. Dişi antepfıstığı apikal sürgünlerinden kültür başlatılmasına sitokininlerin (BA, Kin) etkisi

Sitokinin Tipi (1 mg l ⁻¹)	Sürgün Sayısı ± SE	Sürgün Uzunluğu ± SE
Kontrol	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c
BA	3.30 ± 0.38a	1.85 ± 0.08a
Kinetin	1.50 ± 0.12b	1.30 ± 0.04b

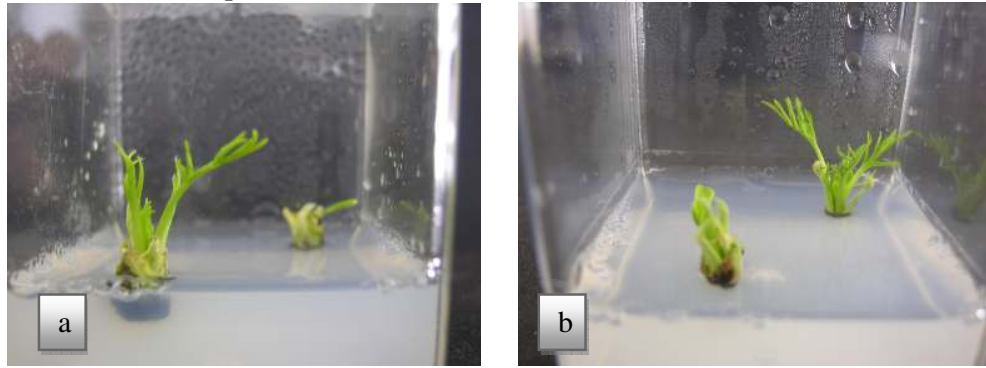
Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır. Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların, DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Çizelge 4.1.3^b. Erkek antepfıstığı apikal sürgünlerinden kültür başlatılmasına sitokininlerin (BA, Kin) etkisi

Sitokinin Tipi (1 mg l ⁻¹)	Sürgün Sayısı ± SE	Sürgün Uzunluğu ± SE
Kontrol	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c
BA	3.00 ± 0.31 a	1.52 ± 0.04 a
Kinetin	1.18 ± 0.06 b	1.07 ± 0.05 b

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır. Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların, DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Şekil 4.1.3. 1.0 mg l⁻¹ BA içeren besi ortamında dişi (a) ve erkek (b) antepfıstığı apikal tomurcuklarından kültür başlatılması



Çizelge 4.1.5^a. Dişi antepfıstığı sürgünlerinin proliferasyonuna BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

BA Konsantrasyonu (mg l ⁻¹)	Sürgün Sayısı ± SE	Sürgün Uzunluğu ± SE
0.25	2.50 ± 0.18c	1.57 ± 0.01d
0.5	2.73 ± 0.10bc	1.75 ± 0.02c
1.0	3.33 ± 0.12a	1.90 ± 0.02a
2.0	2.96 ± 0.06b	1.83 ± 0.01b

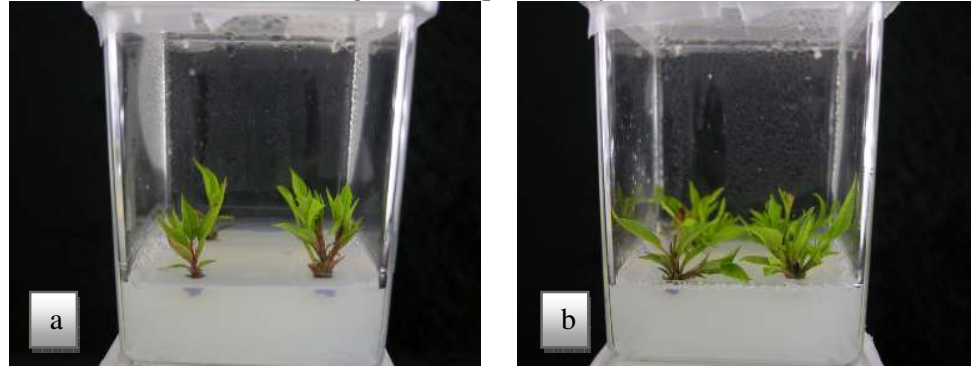
Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır. Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değeri bu ortalamaların, DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Çizelge 4.1.5^b. Erkek antepfıstığı sürgünlerinin proliferasyonuna BA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

BA Konsantrasyonu (mg l ⁻¹)	Sürgün Sayısı ± SE	Sürgün Uzunluğu ± SE
0.25	2.33 ± 0.16c	1.50 ± 0.02c
0.5	2.50 ± 0.11c	1.60 ± 0.02b
1.0	3.40 ± 0.13a	1.92 ± 0.02a
2.0	3.10 ± 0.07b	1.88 ± 0.01a

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır. Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değeri bu ortalamaların, DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Şekil 4.1.5^a 1mgL⁻¹ BA içeren besi ortamında dişi (a) ve erkek (b) antepfıstığı sürgünlerinin proliferasyonu



Çizelge 4.1.5^c. Dişi antepfıstığı sürgün proliferasyonunda BA konsantrasyonuna (1 mgL⁻¹ BA) GA₃'ün farklı konsantrasyonlarının etkisi

GA ₃ Konsantrasyonu	Sürgün Sayısı	Sürgün Uzunluğu
(mgL ⁻¹)	± SE	± SE
0.25	3.56 ± 0.24c	1.59 ± 0.02c
0.5	4.10 ± 0.17a	1.94 ± 0.02a
1.0	3.70 ± 0.17ab	1.81 ± 0.01b
2.0	3.30 ± 0.10c	1.83 ± 0.02b

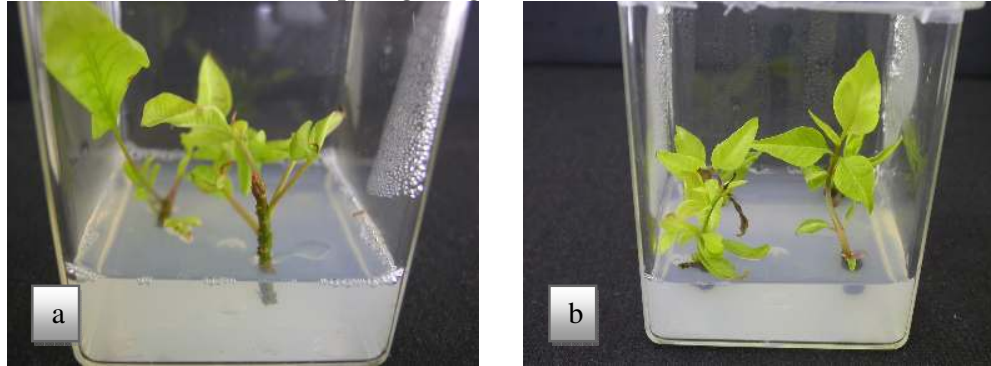
Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır. Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların, DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Çizelge 4.1.5^d. Erkek antepfıstığı sürgün proliferasyonunda BA konsantrasyonuna (1 mg l⁻¹ BA) GA₃'ün farklı konsantrasyonlarının etkisi

GA ₃ Konsantrasyonu	Sürgün Sayısı	Sürgün Uzunluğu
(mg l ⁻¹)	± SE	± SE
0.25	3.60 ± 0.26c	1.57 ± 0.02c
0.5	4.20 ± 0.15a	1.97 ± 0.02a
1.0	3.86 ± 0.17ab	1.85 ± 0.02b
2.0	3.46 ± 0.09c	1.81 ± 0.02b

Rakamlar kültürün 28. gününde toplam 20 eksplantın ortalamasıdır. Tabloda bir sütunda farklı bir harfle gösterilen iki ortalama değer bu ortalamaların, DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak farklı olduğunu gösterir.

Şekil 4.1.5^b 1mg l⁻¹ BA ve 0,5 mg l⁻¹ GA₃ içeren besi ortamında dişi (a) ve erkek (b) antepfıstığı sürgünlerinin uzaması



Çizelge 4.1.7.1.^a Olgun dişi antepfıstığı sürgünlerinin köklendirilmesine IBA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

IBA Konsantrasyonu (gr/l)	Uygulanan süre (sn)	Kök oluşumu (%)
Kontrol	-	-
0.5	20	-
1	20	-
1.5	20	-
2	20	-
5	20	-
10	20	-
$\chi^2(6df)$		P < 0.05

Sonuçlar kültürün 28. gününde ve 20 sürgünün ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.1.7.1.^b Olgun erkek antepfıstığı sürgünlerinin köklendirilmesine IBA'nın farklı konsantrasyonlarının etkisi

IBA Konsantrasyonu (gr/l)	Uygulanan süre (sn)	Kök oluşumu (%)
Kontrol	-	0
0.5	20	40
1	20	80
1.5	20	50
2	20	30
5	20	5
10	20	-
$\chi^2(7df)$		P < 0.05

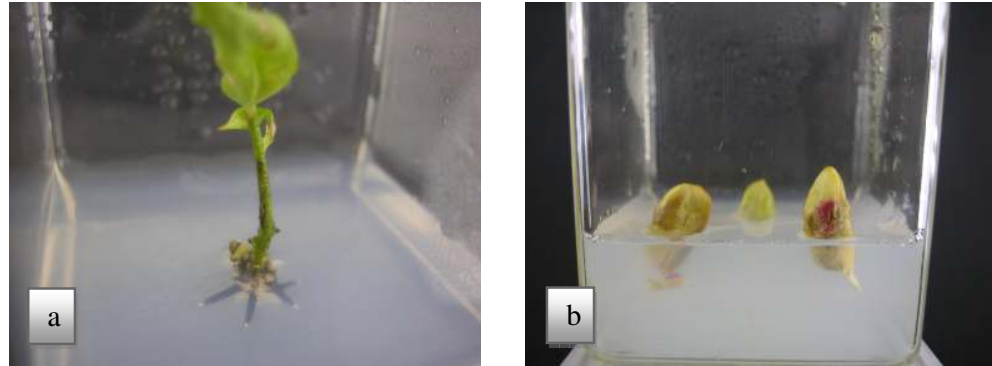
Sonuçlar kültürün 28. gününde ve 20 sürgünün ortalamasını göstermektedir.

Çizelge 4.1.7.2. Olgun erkek antepfıstığı sürgünlerinde IBA'nın farklı immersiyon sürelerinin kök oluşumu üzerine etkisi

İşlem	Uygulanan süre (sn)	Kök oluşumu (%)
Kontrol	-	-
1gr/l IBA	10	30
1gr/l IBA	20	90
1gr/l IBA	30	75
1gr/l IBA	40	60
1gr/l IBA	50	50
$\chi^2(5df)$		P < 0.05

Sonuçlar kültürün 28. gününde ve 20 sürgünün ortalamasını göstermektedir.

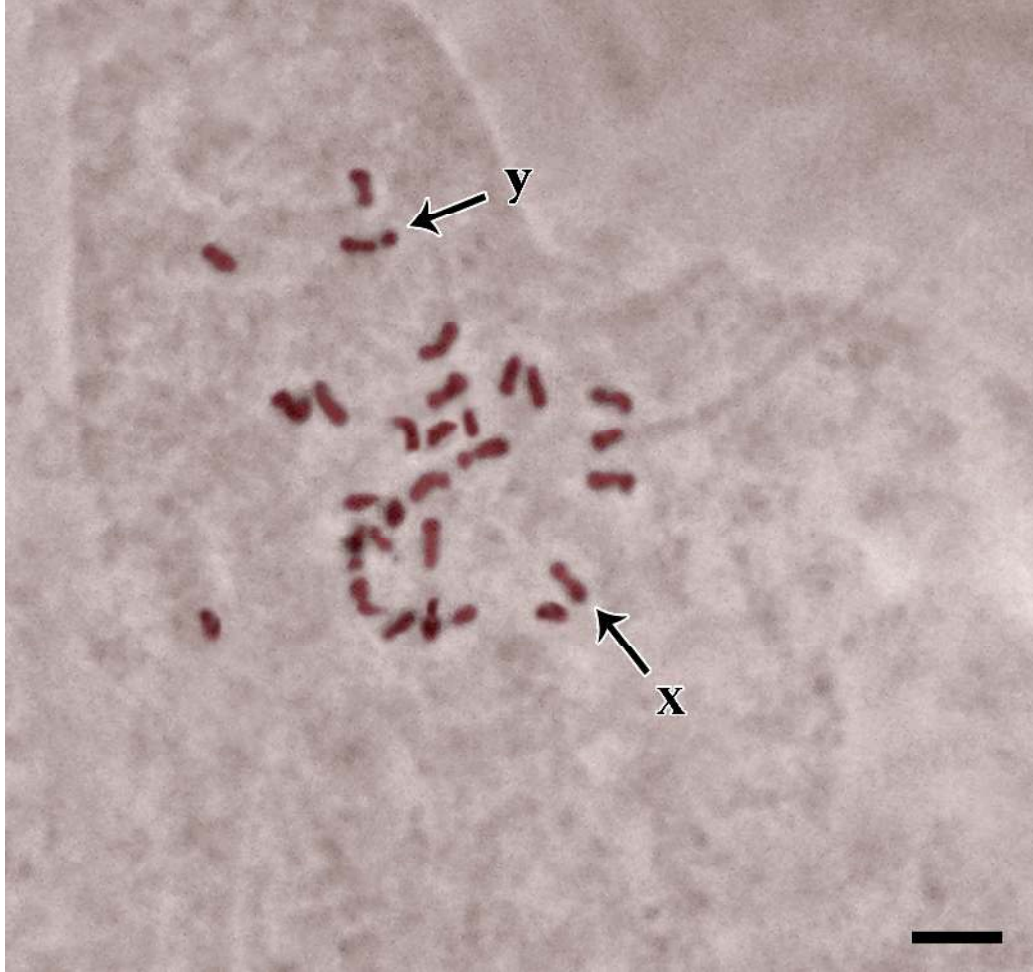
Şekil 4.1.3.2. Olgun erkek antepfıstığı sürgünlerinin (a) ve antepfıstığı tohumlarının (b) köklenmesi



Çizelge 4.2.1. Olgun erkek antepfıstığı ile antepfıstığı tohumlarına ait köklerin kromozom analizinde uygulanan metafaz plağı oluşturma tekniğı

Aşamalar	Adımlar	Sıcaklık değeri (°C)	Bekleme süresi (saat)
İlk işlem	P- Diklorobenzen	25	4
Fiksasyon	Farmer çözeltisi	4	16–24
Hidroliz	1N HCl	60	6-8dk
Depolama	%70'lik alkol	4	Max. 1 hafta
Boyama	Fulgen	25	2

Şekil 4.2.3 ^a. Olgun erkek antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin metafaz düzlemindeki mitotik kromozomları, bar: 38.64 µm.



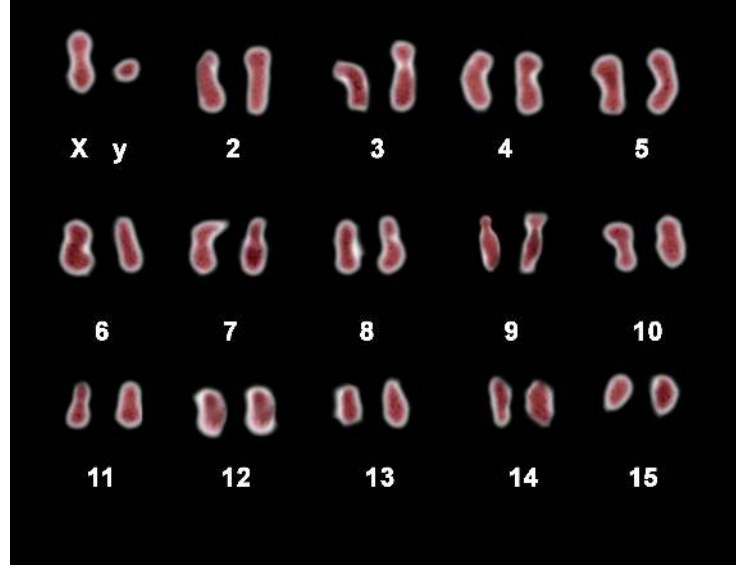
Çizelge 4.2.5^a. Olgun erkek antepfıstığının (*Pistacia vera* L.) karyotip analizi

Kromozom	Total	Uzun kol	Kısa kol	Kol	Sentromerik	Nisbi	Sentromer
çifti	uzunluk(c)	boyu (l)	boyu (s)	oranı(l/s)	indeks	boyu	tipi
X	20,19±0,20	10,61±0,09	9,58±0,11	1,12±0,02	47,43±0,20	8,71±0,08	m
1							
y	4,86±0,09	3,83±0,08	1,02±0,01	3,73±0,07	21,16±0,32	2,09±0,04	St
2	19,17±0,14	13,43±0,06	5,74±0,08	2,33±0,07	29,94±30,23	8,27±0,06	Sm
3	18,26±0,14	12,13±0,07	6,13±0,07	1,97±0,01	33,54±0,16	7,88±0,06	Sm
4	17,78±0,16	11,97±0,08	5,80±0,08	2,05±0,01	32,60±0,15	7,67±0,07	Sm
5	16,75±0,15	11,90±0,08	4,85±0,06	2,45±0,01	28,93±0,14	7,22±0,06	Sm
6	16,38±0,13	11,77±0,07	4,61±0,06	2,55±0,02	28,12±0,16	7,06±0,05	Sm
7	16,18±0,15	9,46±0,05	6,86±0,08	1,37±0,00	42,39±0,21	6,98±0,06	m
8	16,15±0,13	10,47±0,06	5,68±0,07	1,84±0,01	35,09±0,17	6,97±0,06	Sm
9	16,11±0,13	13,47±0,06	2,64±0,07	5,26±0,12	16,2±50,31	6,95±0,05	St
10	13,47±0,11	9,27±0,05	4,19±0,06	2,21±0,01	30,34±0,14	5,81±0,05	Sm
11	10,64±0,11	7,75±0,06	2,89±0,05	2,70±0,02	27,03±0,21	4,59±0,05	Sm
12	8,96±0,13	4,86±0,07	4,09±0,06	1,18±0,00	45,68±0,05	3,86±0,05	m
13	7,90±0,11	4,71±0,05	3,19±0,06	1,48±0,01	40,21±0,21	3,41±0,05	m
14	6,92±0,06	6,19±0,04	0,72±0,01	8,90±0,19	10,35±0,18	2,98±0,02	t
15	5,69±0,08	4,52±0,09	1,17±0,01	3,82±0,02	29,16±0,41	2,22±0,03	St

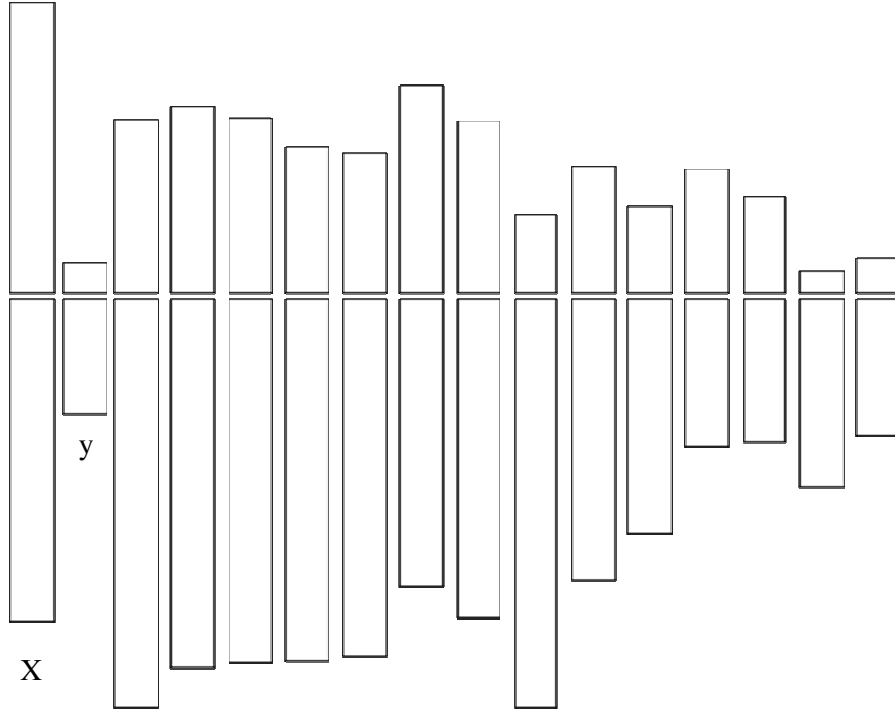
Haploid komplemanın total uzunluğu: 231,59µm.

Rakamlar toplam 5 plağa ait karyotip analizlerinin ortalamasıdır.
Tablodaki ortalama değerler DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

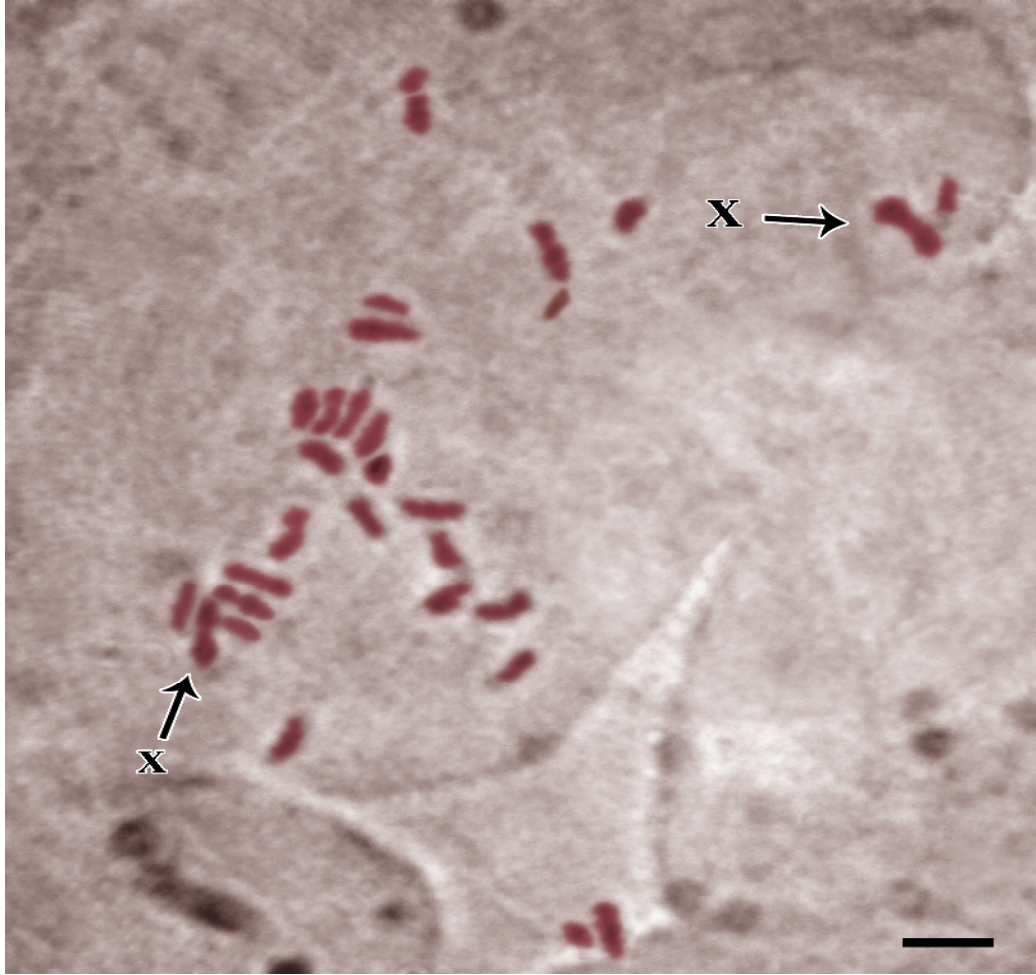
Şekil 4.2.7^a Olgun erkek antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin karyogramı



Çizelge 4.2.9^a. Olgun erkek antepfıstığının (*Pistacia vera* L.) idiogramı



Şekil 4.2.3^b. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nın dişi çöğürlerini verecek olan tohumlarına ait metafaz düzlemindeki mitotik kromozomlar, bar : 37.96 µm.



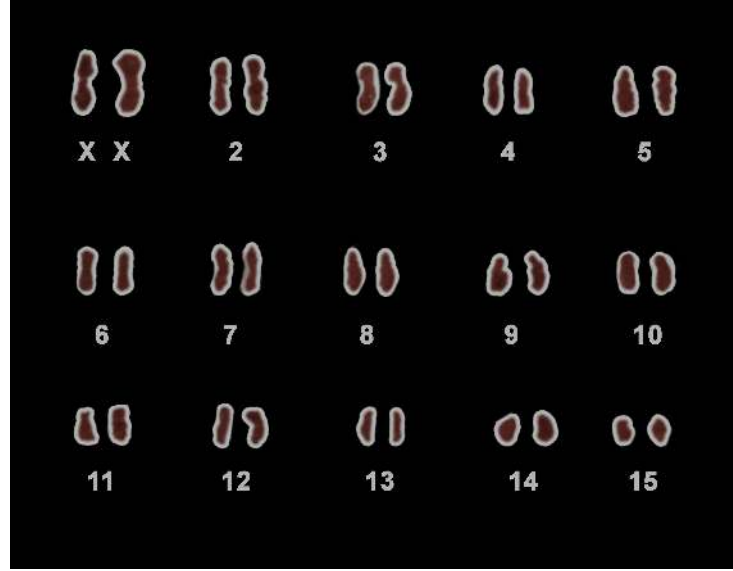
Çizelge 4.2.5^b. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin dişi çöğürlerini verecek olan tohumlarının karyotip analizi

Kromozom	Total	Uzun kol	Kısa kol	Kol oranı	Sentromerik	Nisbi	Sentromer
çifti	uzunluk (c)	boyu (l)	boyu (s)	(l/s)	İndeks	boyu	tipi
1	35,10±0.16	19.00±0.09	16,10±0.07	1,17±0.00	45,93±0,17	12,41±0,04	m
2	25,78±0.17	17,32±0.09	8,46±0.08	2,04±0.01	32,81±0,17	9,10±0,05	Sm
3	23,64±0.13	15,20±0.06	8,48±0.09	1,79±0.01	35,69±0,18	8,35±0,04	Sm
4	23,32±0.13	14.96±0.09	8,36±0.07	1,78±0.01	35,84±0,29	8,23±0,01	Sm
5	21,68±0.15	16,20±0.08	5,60±0.09	2,83±0.02	26,08±0,24	7,65±0,04	Sm
6	21,20±0.20	13,84±0.09	8,58±0.06	1,90±0.01	38,49±0,25	7,94±0,03	Sm
7	20,86±0.23	13.28±0.09	9,52±0.06	1,66±0.01	41,76±0,20	8,05±0,04	m
8	20,50±0.17	14,82±0.09	5,92±0.08	2,43±0.00	29,00±0,31	7,28±0,02	Sm
9	19,48±0.12	15,16±0.06	4,32±0.06	3,52±0.03	22,13±0,19	6,88±0,04	St
10	15,98±0.14	11,66±0.09	4,20±0.06	2,70±0.01	27,02±0,26	5,64±0,04	Sm
11	15,02±0.12	10,76±0.06	4,24±0.06	2,54±0.02	28,28±0,21	5,30±0,04	Sm
12	15,02±0.12	8,72±0.06	6,58±0.07	1,30±0.00	42,97±0,28	5,40±0,03	m
13	10,86±0.14	6,24±0.07	4,62±0.07	1,35±0.01	42,44±0,35	3,83±0,04	m
14	8,86±0.05	7,72±0.06	1,09±0.05	8,63±0.17	10,58±0,16	3,13±0,02	t
15	5,76±0.09	4,68±0.06	1,07±0.05	4,21±0.03	19,22±0,13	2,04±0,03	St

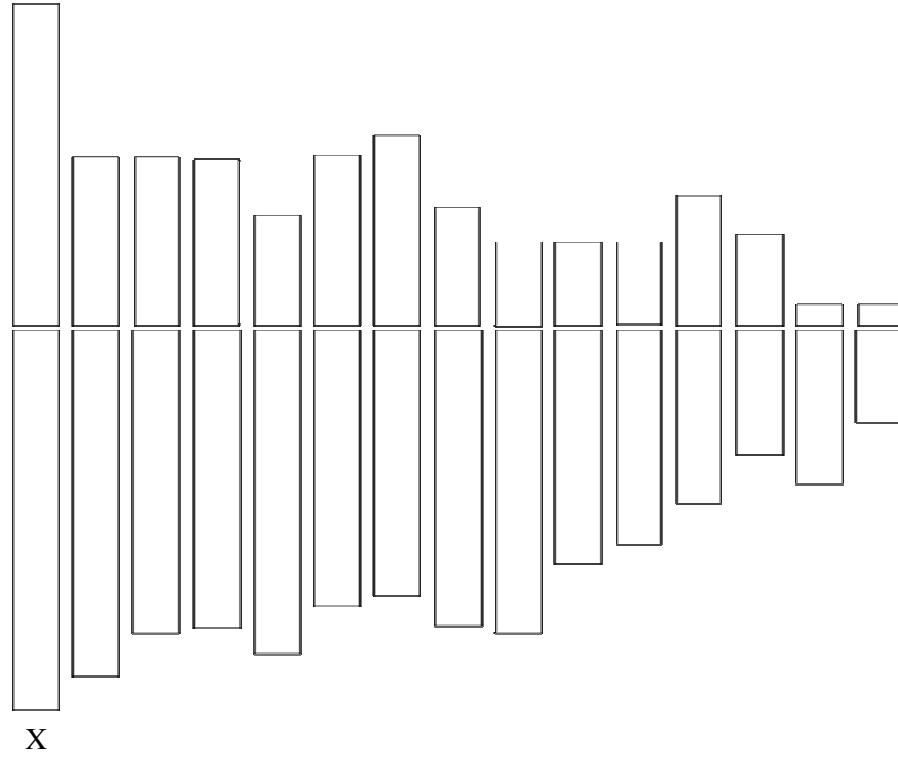
Haploid komplemanın total uzunluğu: 283,06 µm.

Rakamlar toplam 5 plağa ait karyotip analizlerinin ortalamasıdır.
Tablodaki ortalama değerler DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

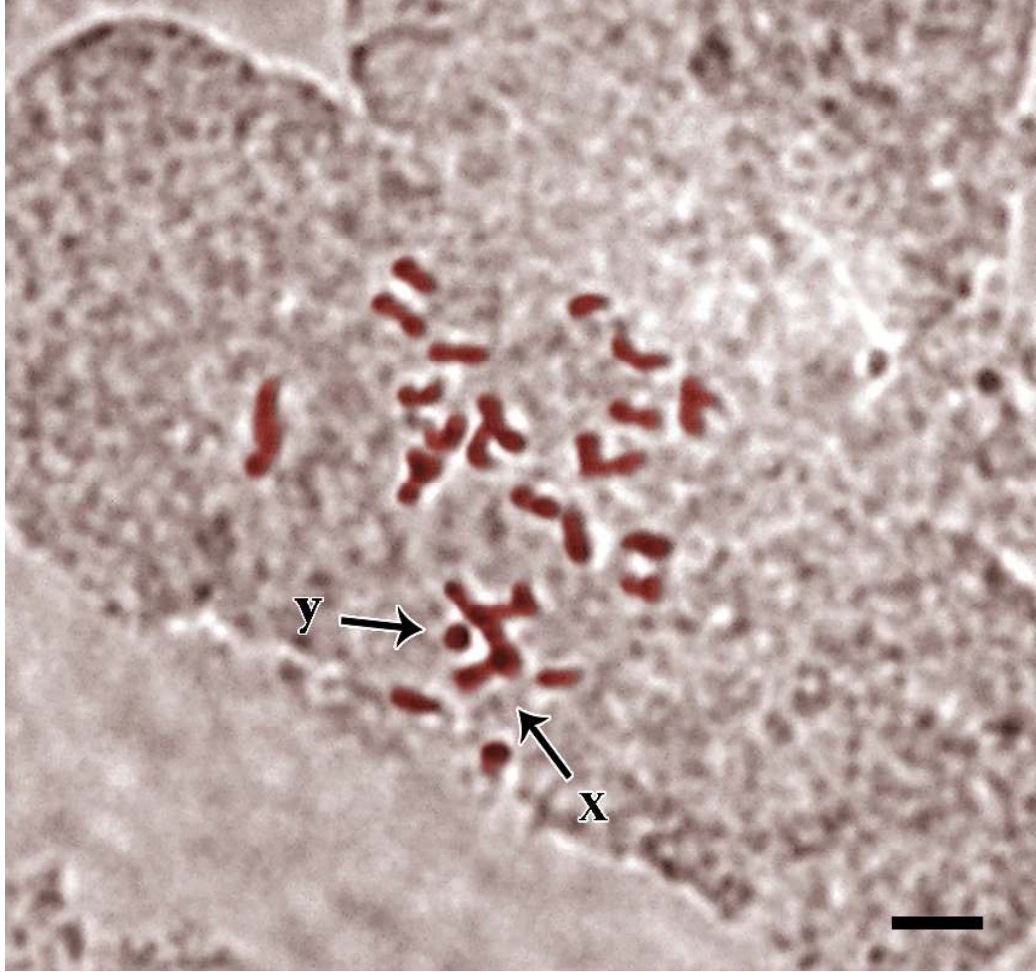
Şekil 4.2.7^b. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)’nın dişi çöğürlerini verecek olan tohumlarının karyogramı



Çizelge 4.2.9^c. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)’nın dişi çöğürlerini verecek olan tohumlarına ait idiogram



Şekil 4.2.3°. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin erkek çöğürlerini verecek olan tohumlarına ait metafaz düzlemindeki mitotik kromozomlar, bar : 34.32 μ m.



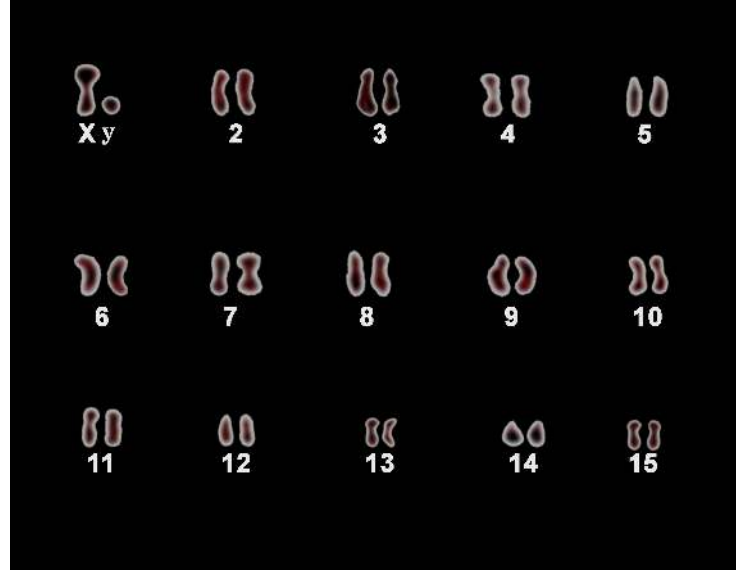
Çizelge 4.2.5^c. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nin erkek çöğürlerini verecek olan tohumlarının karyotip analizi

Kromozom	Total	Uzun kol	Kısa kol	Kol	Sentromerik	Nisbi	Sentromer
çifti	uzunluk(c)	boyu (l)	boyu (s)	orani(l/s)	indeks	boyu	tipi
1	X	28,60±0,16	14,46±0,07	14,13±0,09	1,02±0,00	49,42±0,06	10,10±0,05
	y	8,73±0,16	7,32±0,09	1,40±0,06	5,29±0,19	16,02±0,04	3,08±0,05
2		26,02±0,17	18,13±0,08	7,89±0,09	2,30±0,01	30,29±0,14	9,19±0,06
3		24,14±0,14	15,81±0,07	8,33±0,07	1,90±0,00	34,48±0,10	8,53±0,05
4		22,07±0,17	14,34±0,08	7,72±0,09	1,85±0,01	34,97±0,14	7,79±0,06
5		20,05±0,14	13,51±0,07	6,54±0,07	2,06±0,01	32,60±0,14	7,08±0,05
6		18,30±0,14	11,57±0,07	6,73±0,06	1,72±0,00	36,76±0,10	6,46±0,05
7		18,30±0,12	9,66±0,06	8,64±0,06	1,11±0,00	47,21±0,03	6,46±0,04
8		18,25±0,13	12,54±0,08	5,71±0,05	2,20±0,00	31,25±0,08	6,45±0,04
9		17,33±0,10	13,85±0,07	3,47±0,03	4,00±0,02	20,01±0,08	6,12±0,03
10		17,20±0,09	11,78±0,05	5,42±0,04	2,17±0,01	31,49±0,10	6,07±0,03
11		15,62±0,10	10,80±0,05	4,82±0,05	2,24±0,01	30,80±0,11	5,51±0,03
12		11,95±0,11	6,92±0,05	5,02±0,05	1,38±0,00	41,97±0,08	4,22±0,04
13		11,52±0,11	5,94±0,05	5,58±0,05	1,06±0,00	48,44±0,03	4,07±0,03
14		9,46±0,06	8,50±0,05	0,95±0,01	9,05±0,10	10,01±0,09	3,34±0,02
15		9,43±0,07	7,12±0,04	2,31±0,02	3,07±0,00	24,51±0,03	3,33±0,02

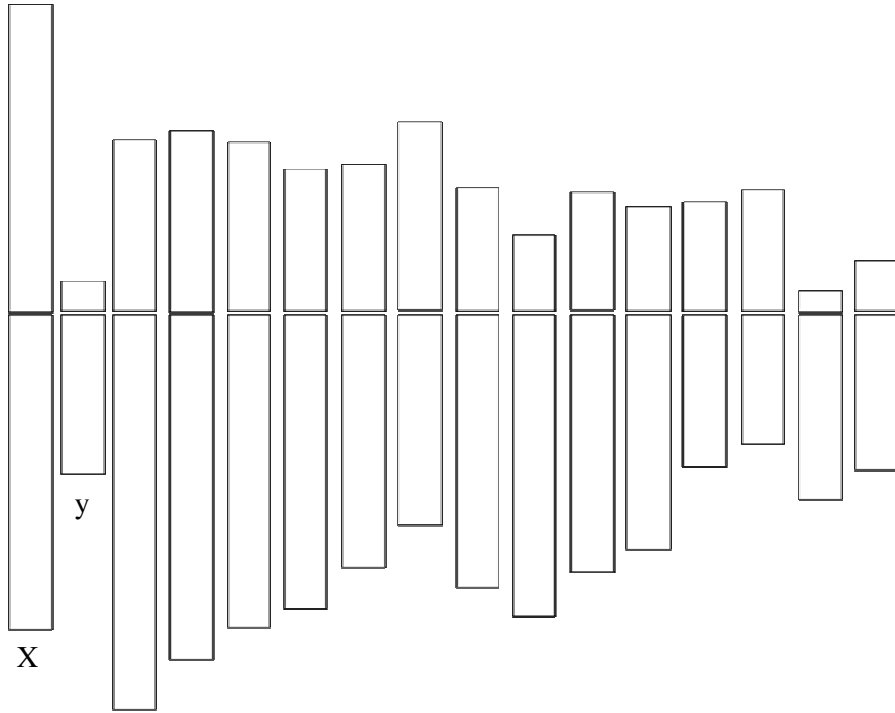
Haploid komplemanın total uzunluğu: 277,03 µm.

Rakamlar toplam 5 plağa ait karyotip analizlerinin ortalamasıdır.
Tablodaki ortalama değerler DUNCAN testine göre P=0.05 seviyesinde istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 4.2.7^c. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nın erkek çöğürlerini verecek olan tohumlarının karyogramı



Çizelge 4.2.9^c. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.)'nın erkek çöğürlerini verecek olan tohumların idiogramı



KAYNAKLAR

- 1- Barghchi, M. *In vitro Propagation of Pistacia Species*. PhD Thesis, Nottingham University, UK, 1982.
- 2- Bustamante-Garcia, M.A. *Micropropagation and Rejuvenation of Pistacia Species and the Mechanism by Which Light Influences Root Initiation*. PhD Thesis, University of California, Davis, USA, 1984
- 3- Abousalim, A. *Micropropagation and Micrografting of Pistachio (P.vera L. and P.atlantica Desf.)*. PhD Thesis, Department of Horticulture. Wye College, University of London, UK, 1990.
- 4- Onay, A. *In vitro Organogenesis and Embryogenesis of Pistachio, Pistacia vera L.* PhD Thesis, University of Edinburgh, UK, 1996.
- 5- Tilkat, E. *Erkek Antepfıstığı Pistacia vera L. cv. 'Atlı' Ağaçlarının Mikroçoğaltılması*, Doktora Tezi. Dicle Üniversitesi. 144 sayfa, Diyarbakır-Türkiye, 2006.
- 6- Barghchi, M. *In vitro culture of mature commercial varieties of Pistacia vera L.*, *Proceeding of International Plant Prop Society*, 1985, 35, 331–333.
- 7- Onay, A. *Somatic Embryogenesis From Mature Seed Cultures of Pistacia atlantica*, *Turk. J. Agr. Forest.*, **1999**, 24, 465–473.
- 8- Tilkat, E. *Buttum (Pistacia khinjuk Stocks)'un in vitro mikroçoğaltılması*, Yüksek Lisans Tezi. Dicle Üniversitesi. 73 sayfa. Diyarbakır-Türkiye, 2003.
- 9- Parfitt, D.E. and Almehdi, A. *Use of High Co₂ Atmosphere and Medium Modifications For The Successful Micropropagation of Pistachio*. *Sci. Hort.*, **1994**, 56, 321–329.

- 10- Onay, A. Micropropagation of Pistachio From Mature Trees. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, **2000a**, 60, 159–162.
- 11- Pontikis, C.A. *In vitro Propagation of Pistacia terebinthus* L., *Plant Propagator*, **1984**, 30(3), 14–15.
- 12- Onay, A. *Somatic Embryogenesis in Cultured Kernels of Pistachio, Pistacia vera* L. cv *Siirt*. Proceedings of The 2nd Balkan Botanical Congress. Volume II, Istanbul, p.109–115, 2000b.
- 13- Onay, A. *Histology of Somatic Embryo Initiation and Development In Pistachio (Pistacia vera* L.). *Turk. J. Bot.*, **2000c**, 24, 91–95.
- 14- Ozden-Tokatlı, Y.; Ozudogru, E.A.; Akcin, A. *In vitro Response of Pistachio Nodal Explants to Silver Nitrate*, *Sci. Hort.*, **2005**, 106, 415–426.
- 15- Onay A.; Işıkalan Ç.; Adıyaman F. *Micropropagation of Pistachio*. Edt: By R.E. Litz In: *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*, **2003**.
- 16- Barghchi, M. *In vitro Micropropagation of Pistacia Rootstocks. Proceeding of The International Plant Propagators Society*, **1986a**, 35, 334–337.
- 17- Yalpani, M.; Tyman, J.H.P. *Phenolic Acids of Pistacia vera*, *Phytochemistry*, **1983**, 22 (10), 2263–2266.
- 18- Barghchi, M.; Martinelli, A. *In vitro Propagation of Mature Pistacia vera Varieties of Kerman (Female) and Peter's (Male) Pistachio*. 41st Easter School Symp. *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Univ. of Nottingham, Abst 75. 1984.
- 19- Barghchi, M.; Alderson, P.G. *In vitro Propagation of Pistacia Species. Acta Hort.*, **1983b**, 131, 49–60.

- 20- Barghchi, M.; Alderson, P.G. *In vitro Propagation of Pistacia vera L. From Seedling Tissues*, *J. Hort. Sci.* **1983a**, 58, 435–445.
- 21- Barghchi, M. *In vitro propagation of Pistacia species*. PhD Thesis, Nottingham University, UK. 1982.
- 22- Martinelli, A. *Use of in vitro techniques for selection and cloning of different Pistacia species*, *Acta Hort.*, **1988**, 227, 436–437.
- 23- Barghchi, M.; Alderson, P.G. *In vitro Propagation of P.vera L. and Commercial Varieties of Ohadi and Kelleghochi*, *J. Hort. Sci.*, **1985**, 60, 423–440.
- 24- Tilkat, E.; Isikalan, Ç.; Onay, A. *In vitro Propagation of Khinjuk Pistachio (Pistacia khinjuk Stocks) Through Seedling Apical Shoot Tip Culture*, *Prop. Orn. Plants*, **2005**, 5(3), 124–128.
- 25- Dolcet Sanjuan, R.; Claveria, E. *Improved Shoot-Tip Micropropagation of Pistacia vera L. and The Beneficial-Effects of Methyl Jasmonate*, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **1995**, 120, 938–942.
- 26- Barghchi, M.; Alderson, P.G. *Pistachio (Pistacia vera L.)*. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol.5. Trees II*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1989, p. 68-98.
- 27- Mederos Molina, S.; Lopez Carreno, I. *Control of Organogenesis In vitro of Pistacia atlantica Desf. Rootstock*. *Acta Hort. (ISHS)*, **1991**, 289, 135–136.
- 28- Al Barazi, Z.; Schwaba, W.W. *Rooting softwood cutting of adult Pistacia vera*, *J. Hort. Sci.*, **1982**, 57, 247–252.
- 29- Elçi, Ş. *Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri*. Fırat Üniversitesi. Fen Edebiyat Fakültesi Yay. Biy. 3. Elazığ, 1982.

- 30- Rousi, A. *Cytotaxonomical studies on Vicia cracca L. and V. tenuifolia Roth.I. Chromosome numbers and karyotype evolution. Hereditas*, **1961**, 47, 81–110.
- 31- Kuta, E. *Karyological studies on the genus Vicia L. Acta Biol Cracov Ser Botanica*, **1980**, 22, 81- 89.
- 32- Ila, H.B.; Kafkas, S.; Topaktas, M. *Chromosome Numbers of Four Pistacia (Anacardiaceae) Species. J. Hort. Sci. & Biotech.*, **2003**, 78, 35-38.
- 33- Sharma, P.C.; Gupta, P.K. *Karyotypes in Some Pulse Crops, The Nucleus*, **1982**, 25, 181- 185.
- 34- Guidetta Roti- Michelozzi, G. *Biosystematic studies on the Vicia villosa complex in Europe, Candollea*, **1986**, 41, 399- 411.
- 35- Terziiskii, D.; Dimitrov, B. *Karyotype analyses in Vicia hirsuta (L.) S.F.Gray and Vicia meyeri Boiss., Caryologia*, **1983**, 36, 345- 354.
- 36- Fasihi Harandi, O. *Genetic Studies of Wild and Cultivated Pistachio in Iran*. Msc Thesis in Plant Breeding, College of Agriculture, Azad University of Karaj, 1996.
- 37- Fasihi Harandi, O.; Behboodi, B.; Abd-Mishani, C.; Ghaffari, M. *The Cytogenetic Studies and Isozyme Analysis of Iranian Pistachio*. In: *Proc. 5th Iranian Biology Congress*, College of Sciences, University of Tabriz, Tabriz (Iran), 28–30 August, 1996.
- 38- Fasihi Harandi, O.; Shahsavan Behboodi, B. *Botany, Distribution and Ecology of Pistacia Genus in Iran*. In: *Proc. 6th Iranian Biology Congress*, College of Sciences, University of Kerman, Kerman (Iran), 25–27 August, 1997.
- 39- Fasihi Harandi, O. and Ghaffari, S.M. *Chromosome Studies on Pistachio (Pistacia vera L.) from Iran. Cahiers Options Méditerranéennes*, **2001**, 56, 35–40.

- 40- Ghaffari, S.M.; Fasihi Harandi, O. *Chromosome Counts and Assessment of Two Heterochromatic Chromosomes in Some Species of Pistacia L. From Iran. Acta Hort.*, **2002**, 591, 389–393.
- 41- Ghaffari, S.M.; Shabazaz, M.; Behboodi, B.S. *Chromosome Variation in Pistacia Genus*, 13. Meeting of the Mediterranean Research Group for Almond and Pistachio, Mirandela(Portugal), 1-5 June, 2003.
- 42- Fox, D.P. *Some Characteristic of The Cold Hydrolysis Technique for Staining Plant Tissues by The Feulgen Reaction, J. Histo Cytochem.*, **1969**, 17, 266.
- 43- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. *Nomenclature For Centromeric Position on Chromosomes, Hereditas*, **1964**, 52, 201–220.
- 44- Ehsanpour, A.A.; Tavassoli, M.; Arab, L. *Sex Determination of Pistacia vera L. Using ISSR Markers, Malays. Appl. Biol.*, **2008**, 37(2), 25–28.
- 45- Zohary, M. *A Monographical Study of the Genus Pistacia. Palestanian Journal of Botany*, **1952**, 5, 187- 228.
- 46- Nilsson, Q.; Lassen, P. *Chromosome numbers of vascular plants from Austria, Mallorca and Yugoslavia, Bot. Notiser*, **1971**, 124, 270–276.
- 47- Natarajan, G. *Contribution à l'étude caryosystematique des espèces de la garrigue languedocienne*. Thesis, Academie de Montpellier, France, 1977.
- 48- Natarajan, G. *In IOPB chromosome number reports LXII. Taxon*, **1978**, 27, 519-535.
- 49- Hayırlioğlu-Ayaz, S.; Beyazoğlu, O. *Chromosome numbers in species of Alchemilla Ser. Elatae (Rosaceae) in Turkey, Annales Botanici Fennici*, **2000**, 37(3), 173–182.

- 50- McClung, C.E. *Notes on the accessory chromosome. Anatomischer Anzeiger* **1901**, 20, 220–226.
- 51- Allen, C.E. *A Chromosome Difference correlated with Sex Differences in Spkcerocarpos, Science*, **1917**, 46, 466–467.
- 52- Lee, C.L. *Sex chromosomes in Ginkgo biloba, Amer. J. Bot.*, **1954**, 41, 545–549.
- 53- Pollock, E.G. *The sex chromosome of the maidenhair tree, J. Hered.*, **1957**, 48, 290 –294.
- 54- Ming, R.; Wang, J.; Moore, P.H.; Paterson, A.H. *Sex chromosomes in flowering plants, Amer. J. Bot.*, **2007**, 94(2), 141–150.
- 55- Negruțiu, I.; Vyskot, B.; Barbacar, N.; Georgiev, S.; Moneger, F. *Dioecious Plants. a Key to The Early Events of Sex Chromosome Evolution, Plant Physiol.*, December, **2001**, 127, 1418–1424.
- 56- Grant, S.; Houben, A.; Vyskot, B.; Siroky, J.; Pan, W.H.; Macas, J.; Saedler, H. *Genetics of Sex Determination in Flowering Plants, Develop. Genet.*, **1994**, 15(3), 214 – 230.
- 57- Jiang, C.; Sink, K.C. *RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in Asparagus, Euphytica*, **1997**, 94, 329–333.
- 58- Reamon Buttner, S.M.; Jung, C. *AFLP-derived STS markers for the identification of sex in Asparagus officinalis L., Theoret. App. Genet.*, **2000**, 100, 432–438.
- 59- Kafkas, S.; Özkan, H.; Ak, B.E.; Acar, I.; Atlı, H.S.; Koyuncu, S. *Detecting DNA Polymorphism and Genetic Diversity in a Wide Pistachio Germplasm: Comparison of AFLP, ISSR and RAPD Markers, J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **2006**, 131(4), 522–529.
- 60- Kafkas, S.; Cetiner, S.; Perl-Treves, R. *Development of Sex-Associated RAPD Markers in Wild Pistacia Species, J. Hortic. Sci. Biotechn.*, **2001**, 76, 242–246.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile ilk kez, klonal çoğaltılan antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçları ile tohumlarından, erkek ve dişi cinse ait karyolojik bulgulara ulaşmak için rutin olarak kullanılabilecek sitolojik bir cinsiyet belirleme protokolü tanımlanmıştır.

Ancak bu protokolünün kullanımından önce şu hususların dikkate alınması yerinde olacaktır:

1. Çalışma sonucunda, mikroçoğaltılan olgun dişi antepfıstığı sürgünlerinde kök oluşumu sağlanamamış ve olgun dişi antepfıstığı ağaçlarına ait karyolojik bulgulara ulaşılamamıştır. Ancak, öncelikle olgun dişi antepfıstığı ağaçlarının mikroçoğaltımına ait çalışmaların devam ettirilerek, çalışmamızda geliştirilen sitolojik cinsiyet belirleme protokolünün, klonal olarak çoğaltılmış bu hatlara ait köklere de uygulanması gereklidir.
2. Çoğaltımı zor bir bitki türü olan antepfıstığının *in vitro* mikroçoğaltılması için farklı laboratuarlarda birçok araştırmacı tarafından çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Ancak antepfıstığının *in vitro* klonal çoğaltımı için öncelikle yeniden test edilmiş bir entegre mikroçoğaltım metodu ve metodun geliştirilmesi ve geniş ölçekte uygulanması için bir araştırma merkezinin kurulması gereklidir.
3. Çalışmada geliştirilen sitolojik cinsiyet belirleme protokolünün, geniş ölçekte kullanılmadan önce, uygulayıcı kuruluş tarafından her aşamasında tekrar edilebilirliği test edilmelidir.
4. Cinsiyet kromozomlarının gelişimini tam anlamıyla anlamak, ancak, dioik bitkilerin cinsiyet tayininin moleküler bakış açısıyla yorumlanması

ile mümkün olabilir. Bu bağlamda, çalışma sonuçlarımızın ayrıca, elektron mikroskopi, FISH ve diğer moleküler yöntemlerle (RAPD, ISSR ve SSR) doğrulanması gereklidir.

5. Antepfıstığı üzerine yapılan bu çalışmanın sonuçları, kromozom yapısı ve cinsiyet mekanizması henüz aydınlatılmamış olan diğer dioik yapı gösteren odunsu bitkiler için bir model oluşturabilir ve aşağıda tartışılan ileriye yönelik çalışmaların moleküler tekniklerle desteklenerek yapılmasıyla antepfıstığı gibi odunsu bitkilerin kompleks cinsiyet belirleme mekanizmalarının aydınlatılmasını mümkün kılabilir.

Antepfıstığında cinsiyet belirleme mekanizmalarının tespit edilmesi için yapılması gereken ileriye dönük çalışmaları ise şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Antepfıstığının cinsiyet belirleme mekanizmasının tam olarak ortaya konması için hem mikroçoğaltılmış, hem doğal şartlar altında gençlik döneminde olan, hem de olgun in vivo bitkilerde, detaylı moleküler biyolojik çalışmalar yürütülmelidir.
2. Antepfıstığında cinsiyet kromozomu gelişiminin süreç ve kökenini anlamak için, gelişimsel sürecin farklı aşamalarında, birçok genotip üzerinde çalışmak gereklidir. Cinsiyet kromozomunun erken ve geç aşamalarına sahip olan bu farklı genotipler, bu çalışmaları mümkün kılacak önemli materyal kaynaklarıdır.
3. Antepfıstığına ait cinsiyet tayininden sorumlu genlerin klonlanması, aslında birçok yönden güvenilirliği düşük olan cinsiyet belirleme araştırmalarının doğrulanması ve cinsiyet kromozomu gelişim ve farklılaşmasının sırrının ortaya çıkarılması için, en önemli aşamadır.

4. Cinsiyet kromozomlarına ait genomik sekansların ve/veya genomun tümünün bilinmesi, parçalı DNA markörlerine veya sekans verilerine dayanarak sonuç çıkarmada karşılaşılan zorluklara çare olacaktır ve cinsiyeti belirleyen genleri tam olarak tanımlamamıza olanak sağlayacaktır.
5. Geliştirilecek genomik araç ve kaynaklar, ayrıca cinsiyet kromozomu gelişimi ve cinsiyet belirlemede, çevre ve genotip arasındaki etkileşimlerin etkilerinin araştırılmasını da kolaylaştıracaktır.

Özetle, bu çalışmada tanımlanan sitolojik cinsiyet belirleme protokolünün gelecekte antepfıstığı endüstrisinin gelişmesine faydalı olacağını ümit ediyoruz.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emine AYAZ

Doğum Yeri: Diyarbakır

Doğum Tarihi: 16.04.1979

Medeni Hali: Bekâr

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise: Diyarbakır Fatih Lisesi–1992

Lisans: D.Ü. Fen-Edb. Fak. Biyoloji Bölümü–1997

Yüksek Lisans: Botanik Anabilim Dalı–2002

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: -

Yayınları (SCI ve diğer):

Süreyya Namlı and **Emine Ayaz** (2007). Influence of different cytokinins used in *in vitro* culture on the stoma morphology of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Siirt). *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (5), pp. 561–563.

Süreyya Namlı, Filiz Adıyaman and **Emine Ayaz** (2007). Comparative Studies on the Proliferation of Lateral Buds of *Vitis vinifera* L.cv. Cardinal During Different Periods of Six Months of the Year at *In vitro* Condition. *International Journal of Agriculture & Biology* Vol. 9(1), pp.38–40.

Emine Ayaz and A. Selçuk Ertekin (2008). Karyotype Analysis of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. and *L. trachycarpus* Boiss. (*Fabaceae*) species of Southeastern Anatolia, Turkey. *International Journal of Agriculture & Biology*, Vol. 10(5) pp.569–572.

Emine Ayaz and Süreyya Namlı (2009). The Cytogenetic Effects of Magnesium Sulphate (MgSO_4) on The Root Tip Cells of Pea (*Pisum sativum* L.cv. araka) Developed in *In vitro* conditions. *Asian Journal of Chemistry*, Vol.21. No:4, pp:2984–2988.

Emine Ayaz and Süreyya Namlı (2009), The Karyotype Analysis of *Pistacia vera* L. From Turkey. *Natural Products Research* 23(9), 866–870.