

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

**SIĞLA AĞACININ (*Liquidambar orientalis* Miller) İN *VİTRO* KOŞULLARDA
ÇOĞALTIM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kadriye ÖZMEN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2011

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIĞLA AĞACININ (*Liquidambar orientalis* Miller) *İN VİTRO* KOŞULLARDA
ÇOĞALTIM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kadriye ÖZMEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 11/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (.....) not takdir edilerek Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd.Doç.Dr Tolga YILDIRIM.....

(Danışman)

Prof.Dr. Hamide GÜBBÜK.....

Doç.Dr. Nuray KAYA.....

ÖZET

SIĞLA AĞACININ (*Liquidambar orientalis* Miller) *İN VİTRO* KOŞULLARDA ÇOĞALTIM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kadriye ÖZMEN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Tolga YILDIRIM

Haziran, 2011, 45 Sayfa

Anadolu sığlası (*Liquidambar orientalis* Miller) Türkiye'nin relikte endemik bir türüdür. Ağaç kabuğunun yaralanması ile elde edilen sığla yağı (liquid storax) parfümeri ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. 20. Yüzyılın başından itibaren Avrupa'da hassas tür olarak kabul edilen sığla ağaçları düşük yağ fiyatları ve biyotik engellemeler nedeniyle sürekli azalmaktadır. Bu çalışmanın amacı bu türün klonal olarak çoğaltılabilmesi için gerekli in vitro koşulların belirlenmesidir. İlk aşamada farklı bitki büyüme düzenleyicileri (2.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA or 0.1 mg/L TDZ + 0.01 mg/L 2,4-D) ilave edilmiş dört farklı besin ortamı (LO, MS, SH ve WPM) iki haftalık bitkilerden elde edilen hipokotiller kullanılarak adventif sürgün oluşumu için test edilmiştir. İkinci aşamada eksplant yaşı (2, 3 ve 4 haftalık), karanlık uygulaması (kontrol, 1 hafta ve 2 hafta karanlık) ve eksplantın bitkiden hipokotil boyunca alındığı yerin sürgün oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. En iyi sürgün oluşumu 2.5 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA ilave edilmiş SH besin ortamında elde edilmiştir. İkinci aşamada elde edilen verilerin ANOVA sonuçları "eksplant yaşı" ve "karanlık uygulaması" ana değişkenleri için istatistiksel düzeyde farklılıklar olduğunu göstermiştir. Üç haftalık bitkilerden alınan veya iki hafta karanlık uygulaması yapılan eksplantların ortalama olarak sırasıyla eksplant başına 19.33 ve 20.52 adet sürgün meydana getirmiştir.

Köklenme yüzdelерinin ANOVA sonuçları istatistiksel düzeyde önemli olmamasına rağmen, üç haftalık bitkilerden elde edilen ve sürekli olarak ışık altında tutulan eksplantlardan elde edilen sürgünlerin köklenme yüzdesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri kullanmaksızın elde edilen sürgünlerin %77'si kök oluşturmuştur. Bu köklenme yüzdesi farklı oksinlerin (örneğin IBA gibi) test edilmesi ile daha da geliştirilebilir.

ANAHTAR KELİMELELER: Adventif sürgün oluşumu, bitki doku kültürü, *Liquidambar orientalis* Miller (Anadolu sığılası)

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

Prof.Dr. Hamide GÜBBÜK

Doç.Dr. Nuray KAYA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANATOLIAN SWEETGUM TREE'S (*Liquidambar orientalis* Miller) PROPAGATION PROPERTIES UNDER IN VITRO CONDITIONS

Kadriye ÖZMEN

M.Sc. Thesis in Biology

Adviser: Asst.Prof.Dr. Tolga YILDIRIM

June, 2011, 45 pages

Anatolian sweetgum (*Liquidambar orientalis* Miller) is a relict endemic species of Turkey. The balsam “liquid storax” produced by wounding the bark is used in perfume and cosmetic industry. Since the beginning of 20th century the trees has been disappearing due to lower balsam prices and biotic interferences, which is regarded as vulnerable tree species in Europe. The aim of this study was to determine in vitro conditions required for clonal propagation of this species. First, four basal media (LO, MS, SH, and WPM) fortified with different plant growth regulators (2.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA or 0.1 mg/L TDZ + 0.01 mg/L 2,4-D) were tested for adventitious shoot induction using hypocotyls obtained from two weeks old seedlings. Afterwards the affects of the explant age (2, 3, and 4 weeks old), dark incubation (control, 1 week and 2 weeks dark), and explant position along the seedling hypocotyl on shoot induction were investigated. SH basal medium with 2.5 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA was found best for shoot induction. ANOVA results of the data showed significant differences for the main effects “explant age” and “dark incubation”. No significant interaction were found among the main effects. Explants taken from 3 weeks old seedlings or incubated in dark for 2 weeks produced an average of 19.33 and 20.52 shoots per explant, respectively.

Although ANOVA results of the rooting frequencies were not significant, shoots obtained from 3 weeks old explants and incubated under light continuously reached higher rooting frequencies. Average of 77% of shoots formed roots without using any plant growth regulators. This rooting percentage could be further increased by testing different auxins, such as IBA.

KEY WORDS: Adventitious shoot formation, plant tissue culture, *Liquidambar orientalis* Miller (Anatolian sweetgum)

COMMITTEE: Asst.Prof.Dr. Tolga YILDIRIM (Adviser)

Prof.Dr. Hamide GÜBBÜK

Assoc.Prof.Dr. Nuray KAYA

ÖNSÖZ

Anadolu'daki canlı türleri, genetik özellikleri ve ekosistemleri çeşitliliği bakımından zengin bir kaynaktır. Bunun başlıca nedenleri, Anadolu'nun coğrafi konumu bakımından üç kıta arasında bir köprü durumunda olup çok kısa mesafelerde bile farklı yer yüzü şekilleri ve buna bağlı olarak da çok değişik lokal iklimlere sahip olmasıdır.

Yaşanan buzul devirlerinde canlılar göçe zorlanırken, Anadolu'da buzul devirlerinin göçe zorladığı hayvanlar ve bitkiler korunmuş ve çeşitlenip yaşamlarını devam ettirmişlerdir. Bu sayede Anadolu'da bir çok endemik tür hala varlığını sürdürmektedir. Bu türlerden biri olan Anadolu sığlası (*Liquidambar orientalis* Mill.) Türkiye'nin güneybatısında özellikle Muğla ve Fethiye'de yayılış gösteren endemik bir türdür. Ancak günümüzde sığla ormanları yaşlı, yıpranmış ve ıslaha muhtaç bir durumda olup türün korunmasının ve çoğaltılmasının önemi her geçen gün artmaktadır.

Bu yüksek lisans çalışmasında Anadolu sığlasının neslinin devamlılığını sağlama ve ülkemiz ekonomisine tekrar kazandırılması hedeflenmiş olup, tüm deney çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarım sırasında ilgisini, desteğini ve zamanını esirgemeyen danışmanım Yrd.Doç.Dr.Tolga Yıldırım'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak araştırmanın başından sonuna kadar yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI	5
2.1. <i>Liquidambar orientalis</i> 'in Sistematik Bilgileri.....	5
2.2. <i>Liquidambar orientalis</i> 'in Ekolojik İstekleri	7
2.3. <i>Liquidambar orientalis</i> 'in Morfolojik Özellikleri ve Biyolojisi.....	9
2.4. <i>Liquidambar</i> Cinsinin <i>In Vitro</i> Olarak Çoğaltılması İçin Yapılan Çalışmalar	13
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Bitki Materyali	15
3.2. Kullanılan Besin Ortamlarının Hazırlanması.....	1
3.3. Besin Ortamı ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin (BBD) Belirlenmesi ...	18
3.4. Sürgün Oluşumunda Test Edilen Değişkenler	18
3.5. Verilerin Toplanması ve Analiz Edilmesi.....	19
4. BULGULAR.....	20
4.1. Besin ortamı ve BBD Testi	20
4.2. Sürgün Oluşumunda Test Edilen Değişkenlerin Etkisi	21
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ	30
7. KAYNAKLAR	31
8. EKLER.....	34
EK-1: TERİMLER SÖZLÜĞÜ	34
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

2,4-D	2,4-diklorofenoksiasetik asit
2IP	Dimethylalilaminopurin
BA	Benziladenin
BAP	6-benzilaminopurin
BBD	Bitki büyüme düzenleyicileri
BL	Blaydes besin ortamı
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
GA3	Gibberellik Asit
IAA	Indol asetik asit
IBA	Indol butirik asit
L	Litre
LO	Lindemann Orchid besin ortamı
LS	Linsmaier ve Skoog besin ortamı
M	Mol
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimol
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
NAA	Naftalen asetik asit
ppm	Parts per million (Milyonda bir)
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RW	Risser ve White besin ortamı
SB II	Sommer ve Brown II besin ortamı
SH	Schenk ve Hildebrandt besin ortamı
TDZ	Thidiazuron
UV	Ultraviyole

w	Watt
WPM	Woody Plant Medium besin ortamı
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
µM	Mikromol
%	Yüzde

Kısaltmalar

½ MS	Yarım kuvvet MS
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Ak.Ün.	Akdeniz Üniversitesi
Ha.	Hektar
Mill.	Miller
vb.	Ve benzeri
vd.	Ve diğerleri
Var.	Varyete

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	<i>Liquidambar</i> cinsini dünyadaki yayılışı (Ickert-Bond vd 2005).....	6
Şekil 2.2.	<i>L.orientalis</i> 'in Anadolu coğrafyasındaki yayılışı	8
Şekil 2.3.	<i>L.orientalis</i> 'in beş loblu yaprakları, çiçekleri ve tohumları (Köhler 1887).....	10
Şekil 2.4.	<i>L. orientalis</i> 'in tohumları.....	11
Şekil 2.5.	Genç bir bireyin görünümü	12
Şekil 3.1.	Petri kabına alındıkları konuma göre dizilen eksplantlar	16
Şekil 4.1.	1 cm'den büyük sürgünlerin sayılması	20
Şekil 4.2.	Besin ortamı belirlenmesi ve BBD uygulaması	21
Şekil 4.3.	Fide yaşının sürgün oluşumu üzerindeki etkisi	22
Şekil 4.4.	Karanlık uygulamasının sürgün oluşumu üzerindeki etkisi	23
Şekil 4.5.	Eksplantın konumunun sürgün oluşumu üzerindeki etkisi.....	24
Şekil 4.6.	10 hafta sonunda köklenen sürgünler	25
Şekil 4.7.	Eksplant alınan fidenin yaşına göre sürgünlerin ortalama köklenme yüzdeleri.....	25
Şekil 4.8.	Karanlık etkisine göre sürgünlerin köklenme yüzdeleri.....	26
Şekil 4.9.	Eksplantın konumuna göre sürgünlerin köklenme yüzdeleri	26

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Anadolu sığlası orman alanı ve yağ üretiminin değişim çizelgesi.....	2
Çizelge 3.1.	MS, SH, WPM ve LO besin ortamlarına ait bileşenler	16
Çizelge 3.2.	Çalışılan değişkenler	18
Çizelge 4.1.	Sürgün oluşumu deneyinin tek yönlü varyans analizi.....	22
Çizelge 4.2.	Köklendirme deneyinin tek yönlü varyans analizi	24

1.GİRİŞ

Ülkemiz için hem endemik hem de relik t bir tür olan aynı zamanda da ekonomik değere de sahip Anadolu sığlası (*Liquidambar orientalis* Miller) Magnoliophyta bölümünün, Magnoliopsida sınıfına ait Saxifrageles takımının Altingiaceae familyası içinde sınıflandırılmaktadır. Türkiye'de yapılan paleobotanik ve palinolojik çalışmalar sonucunda eosene kadar uzanan bir geçmişe sahip olduğu, tersiyer sonrası buzullaşmalar sırasında daha güneye çekilerek, Anadolu'nun bazı korunaklı yerlerinde günümüze kadar gelebildiği ortaya konmuştur (Acar vd 1993).

Sığla ağacı relik t ve endemik özelliğinin dışında yağındaki tarçın asidi, stacin, styrol, stresinol ve styrojanin gibi maddeleri içermesiyle ilaç, parfümeri, sabun ve kimya endüstrisinde oldukça geniş yer bulmaktadır. Tarihte geçmişte Mısır Kraliçesi Kleopatra'nın "aşk iksiri" ve parfüm olarak kullandığı sığla yağı, Hipokrat döneminden beri ilaç yapımında kullanılmaktadır. Batık Fenike gemilerinden çıkarılan içi sığla yağı dolu amforalar geçmişte Anadolu sığla yağının Akdeniz ticaretinde önemli bir yer tuttuğunu göstermektedirler. Eski Mısırlılar sığla yağını Fenikelilerden ithal edilmiştir. Farmakolojik olarak geniş kullanım alanına sahip olan bu yağ, Avrupa'da ilaç olarak kullanılmaya 17. yüzyılda başlamıştır (Huş 1949). Eski Mısırlılar Sığla yağını mumyalama işlemleri sırasında da kullanmışlardır. Ayrıca mısır piramitlerindeki mezarlarda sığla yağının kokusu günümüze kadar geldiği söylenmektedir (Acar 1989).

Günümüzde eczacılıkta iyi bir antiseptik ve parazit söktürücü olarak kullanılan sığla yağının, ciltte yumuşatıcı, iltihap giderici ve iyileştirici etkileri bulunmakta olup, ayrıca bu türün yetiştii alanlardaki halk tarafından da özellikle mide rahatsızlıklarında kullanılmaktadır. Gövde kabuk parçaları yakıldığında kendine özel kokusundan dolayı tütüsü olarak cami ve kiliselerde kullanılmaktadır. Bu özelliklerinin dışında ağırlıklı olarak parfümeri sanayinde kokuların kalıcılığını arttırdığı için sabitleyici (fiksatif) olarak kullanılmaktadır. Parfümeri sanayinde kullanılan önemli bir hammadde olması ekonomik değeri ni ülkemiz açısından da arttırmaktadır.

Anadolu sığlasının yayılış alanı 1940'lı yılların başında yedi bin hektar iken son yetmiş yılda bu alan oldukça daralmıştır. Yağ elde etmek için geri dönüşümü olmayacak bir şekilde defalarca yaralanan ağaçlar ya deforme olmuş yada patojenlere karşı korunmasız hale gelmiş ve buna ek olarak yapılan bilinçsiz kesimlerle de yayılış alanları daraltmıştır. Bunlara ilave olarak civar köylülerin içme suyu ve sulama için açtıkları drenajla taban suyu seviyesini düşürmeleri biyolojisi gereği rutubetli topraklar üzerinde yetişen Anadolu sığla ağaçlarının yaşamını her geçen gün daha da tehdit etmiştir. Hayat devresini yüzlerce yılda tamamlayan bu türün yaşadığı orman alanlarındaki dengeyi yeniden sağlamak için oldukça uzun bir zaman aralığı gerektirmektedir.

Yağ üretimindeki hızlı düşüşe ise, alan kaybının yanında demode sığla yağı üretim tekniği ile yaralanan yağ verimi yüksek genotiplerin hastalanarak yok olması, yerini yağ vermeyen sağır bireylere bırakmasına neden olmuş ve populasyonların yapısını değiştirmiştir.

Sığla ormanlarının toplam sahası 1947 yılında yapılan çalışma ile yaklaşık 7.000 ha alanı kaplanmakta iken 1949 yılında 6.312 ha inmiştir (Huş 1949, Topçuoğlu 1968). 1988 yılında bu rakam hızlı bir düşüşle 1.215 ha kadar inmiş olup günümüzde ise yıllık yağ üretimi 100 kg altında olup yayılış alanı ise 900 ha'ın oldukça altındadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Anadolu sığlası orman alanı ve yağ üretiminin değişim çizelgesi (Genç 1999)

<i>Yıl</i>	<i>Orman alanı (ha)</i>	<i>Sığla yağı üretim miktarı (ton)</i>
1947	7.000	200
1949	6.312	180
1955	4.316	100
1980	1.337	19.5
1988	1.215	1.3

Ülkemiz 80'li yıllara kadar sığla yağı üretimi açısından lider konumunda iken, günümüzde bu niteliğini yitirmiştir (Atay 1985). 1918 yılına kadar pazarda sadece Türk sığla yağı bulunmasına karşın, 1. Dünya Savaşı nedeniyle pazarlamadan kaynaklanan problemler nedeniyle Amerikan sığla ağacından da (*L. styraciflua*) yağ üretimi başlamıştır (Acar 1989).

Pazar payının ve dolayısıyla üretimin azalmasının bir nedeni de; sığla yağı doğal yapısı korunarak, temiz bir şekilde üretilip pazara sunulması gerekirken, geleneksel yolla elde edilen sığla yağının bu nitelikleri taşınamamasıdır (Gül 1986). Ayrıca sentetik fiksatiflerin üretilmesinden sonra Anadolu sığlasının ekonomik önemini yitirdiği düşünülerek sığla toplulukları yerini turunçgil ve diğer ticari bitkilere bırakmış ve böylece sığla yağı üretimi daha fazla azalmıştır.

Anadolu sığlasının doğal yayılış alanları 1940'lı yılların başında yedi bin hektar iken son yetmiş yılda üç yüz hektara kadar düşmüş ve korunma çalışmalarının bir an önce başlatılması gerekmektedir. Yağ elde etmek için geri dönüşümü olmayacak bir şekilde defalarca yaralanan ağaçlar ya deforme olmuş yada patojenler için korunmasız hale gelmiş ve buna ek olarak yapılan bilinçsiz kesimlerle de yayılış alanları daraltmıştır. Bunlara ilave olarak civar köylülerin drenajla taban suyu seviyesini düşürmeleri biyolojisi gereği rutubetli topraklar üzerinde yetişen sığla ağaçlarının yaşamını tehdit etmektedir. Hayat devresini yüzlerce yılda tamamlayan bu türün yaşadığı orman alanlarındaki dengeyi yeniden sağlamak oldukça uzun bir zaman zarfını gerektirmektedir.

Ülkemiz için önemli olan türlerin genetik kaynaklarının korunması gerekmektedir. Bu gibi türlerin oluşturduğu biyoçeşitliliğin ve yayılış alanlarındaki azalmasının temel nedenleri bilinçsiz olarak meraların tarlaya dönüştürülmesi, aşırı otlatma, anız yakma, aşırı gübre ve ilaç kullanımı, endüstrileşme, şehirleşme, kontrol dışı ormancılık faaliyetleridir. Ancak bu gibi türlerin yayılışını ve birey sayısındaki azaltıcı etkenler dışında, sınırlı olsa da yerinde koruma çalışmaları yapılmaktadır. Buna örnek olarak Acıpayam-Bozdağ ve Gölhisar-Pamucak Gen Koruma Ormanı, Burdur-Söğütadağ Tabiatı Koruma Alanı doğal olarak yerinde korunmanın yapıldığı yerlerdir.

Anadolu sığlası 2001 yılında EUFORGEN (European Forest Genetic Resources Program) tarafından değerli yapraklılar (Noble Hardwoods) grubuna alınarak, Avrupa çapında korunacak bir tür olarak kabul edilmiştir (Alan ve Kaya 2003).

Bitki genetik kaynaklarının korunması, gen havuzunda bulunan çeşitliliğin, gerçek ya da potansiyel kullanımı kadar, etkin biçimde saklanması ve genetik çeşitliliğin insanlığın kullanımına sunulmasıdır. Temelde her biri değişik tekniklerin bir araya gelmesiyle oluşan *ex situ* ile *in situ* koruma ile yapılmaktadır. Günümüzde bitki biyoteknolojisinin vazgeçilmez araçlarından birisi olan *in vitro* çoğaltım teknikleri, bitki hücre ve dokularını kullanarak istenilen genotiplerin çoğaltılmasını veya soğukta dondurulmasını sağlayarak genetik kaynakların korunmasına katkı yapmaktadır. Bu çalışmanın amacı; *ex situ* çalışmalardan biri olan *in vitro* çoğaltım tekniklerinin ülkemiz için relikt ve endemik olan bu türümüzde geliştirilebilmesi için gerekli koşulların ortaya konulmasıdır. Böylelikle ileride özellikle sığla yağı üretimi yapılan genotiplerin klonal olarak üretimi sağlanabilir.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Anadolu sığlası ile ilgili olarak ilk yayın Berkel ve Huş tarafından 1944 yılında yapılmıştır. Sığla yağının öneminden dolayı araştırmacılar yağdaki etken maddelere daha çok yönelmişlerdir. (Huş 1949, Topçuoğlu 1968, Gül 1986, Acar 1988, Duru 1993). Ayrıca türün morfolojisi, yayılış alanları, sitotaksonomisi, anatomik yapısı, silvikültürü ve doku kültürü konularına yönelik çalışmalar da bulunmaktadır (Peşmen 1972, Kesercioğlu 1973, Efe 1988, Acar 1988, Bozkurt vd 1989, Akman vd 1992, Genç vd 1993, Genç 1999, Alan ve Kaya 2003). Anadolu sığlasını tanıtan ve yok olmasına dikkat çeken makaleler de bulunmaktadır (Efe 1988, Acar vd 1993).

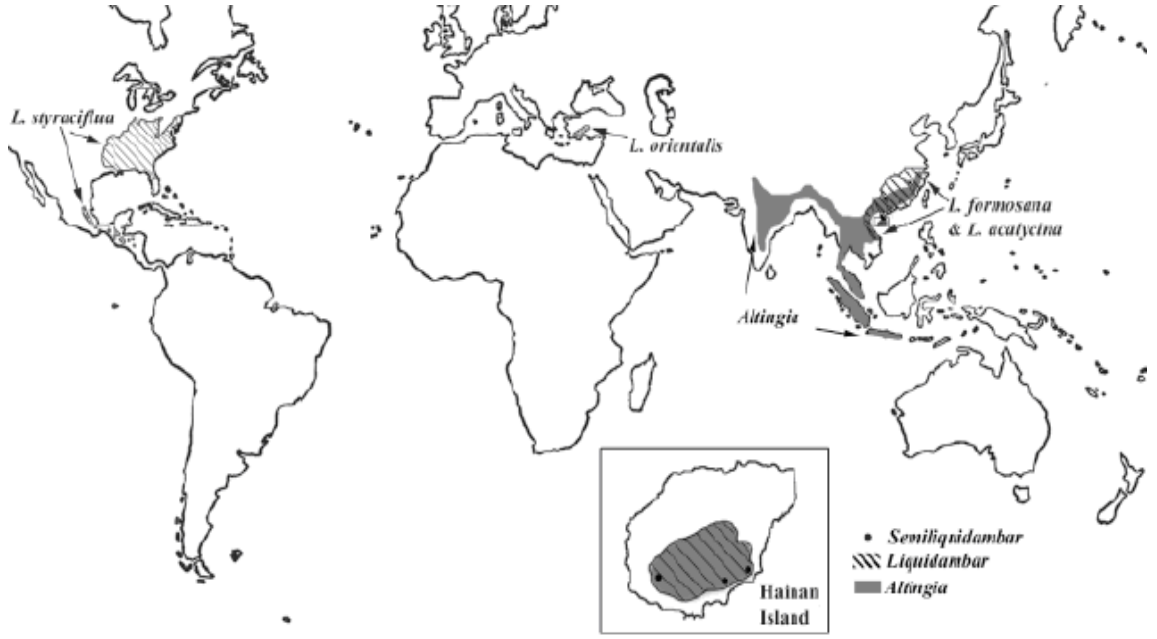
2.1. *Liquidambar orientalis*' in Sistematik Bilgileri

Anadolu sığlası (*Liquidambar orientalis* Miller) kelime anlamı olarak latince *liquidus* ve arapça *amber* sözcüklerinin birleştirilmesiyle oluşup, güzel kokulu sıvı anlamına gelmektedir. *Magnoliophyta* bölümünün *Magnoliopsida* sınıfına ait *Saxifrageles* takımının *Altingiaceae* familyası içinde sınıflandırılan Anadolu sığlası daha eski sınıflandırma çalışmalarında *Hamamelidaceae* familyası altında incelenmişlerdir. *Altingiaceae* familyasında günümüzde sadece Anadolu, Amerika ve Çin'de doğal olarak yayılış gösteren dört tür bulunmaktadır (Şekil 2.1).

Dünya üzerindeki *Liquidambar* cinsine ait türler:

1. Anadolu sığlası (*Liquidambar orientalis* Miller), (Güneybatı Türkiye ve Rodos)
2. Chang sığlası (*Liquidambar acalycina*), (Güney Çin)
3. Çin sığlası (*Liquidambar formosana*), (Güney Çin, Kuzey Kore, Güney Kore, Tayvan, Laos, Kuzey Vietnam)
4. Amerikan sığlası (*Liquidambar styraciflua*), (Kuzeydoğu Amerika'da New York ile Teksas arasında, doğu Meksika ile Guatemala)

Bazı kaynaklarda Amerikan sığlasının yanında *Liquidambar macrophylla* türünden de bahsetmektedir. Ancak bu türün Amerikan sığlasının bir varyetesi olduğunu kabul edildiği için *Liquidambar styraciflua* adı altında geçmektedir.



Şekil 2.1. *Liquidambar* cinsini dünyadaki yayılışı (Ickert-Bond vd 2005)

Flora of Turkey’de Peşmene göre (1972) *L. orientalis*’in 2 varyetesinin bulunmaktadır. Bunlar *L. orientalis* var. *orientalis* ve *L. orientalis* var. *integriloba*’dır. Var. *integriloba*’nın yaprak yönünden *L. styraciflua*’ya benzediği ve *L. orientalis* ile *L. styraciflua* arasında geçiş pozisyonunda bulunduğu ifade edilmektedir.

Var. *orientalis* yapraklarının bazılarında kama şeklinde bir terminal lop ile 2-4 adet birbirine karşılıklı, 3 köşeli lateral tohum bulunduğunu; var. *integriloba* yapraklarının ise hepsinin bölünmediğini, geniş yumurta şeklinde, sivri uçlu loblu olduğunu belirtmesine karşın, Efe (1988) arazi çalışmaları sırasında söz konusu iki varyetenin varlığını doğrulayıcı örneklere rastlamadığını bildirmiştir. Üçüncü varyete ise Gökmen (1973) tarafından tanımlanmıştır.

L. orientalis var. *suber*, genç sürgünlerdeki mantar kabarcıklarıyla ayırt edildiğini kaydetmiştir. Ancak genetik yönden yapılan çalışmaların ve sistematik anlamda yapılan çalışmaların yetersizliği yüzünden bu varyeteler kesinlik kazanmamıştır. Peşmen (1972) var. *orientalis* ve var. *integriloba*’yı yaprak üzerindeki ikinci bir loblanmanın varlığına yada yokluğuna göre yapmıştır.

2.2. *Liquidambar orientalis*' in Ekolojik İstekleri

Anadolu sığlası sıcak ve ılık Akdeniz iklimlerini tercih etmektedir. Türkiye'de kışın en soğuk ayın minimum sıcaklık ortalaması +3 °C' tan daha düşük olan yerlerin dışında görülmemektedir. Dolayısıyla sığla ağacı don olaylarına karşı çok duyarlı olup kıyı bölgelerde maksimum yayılma göstermektedir.

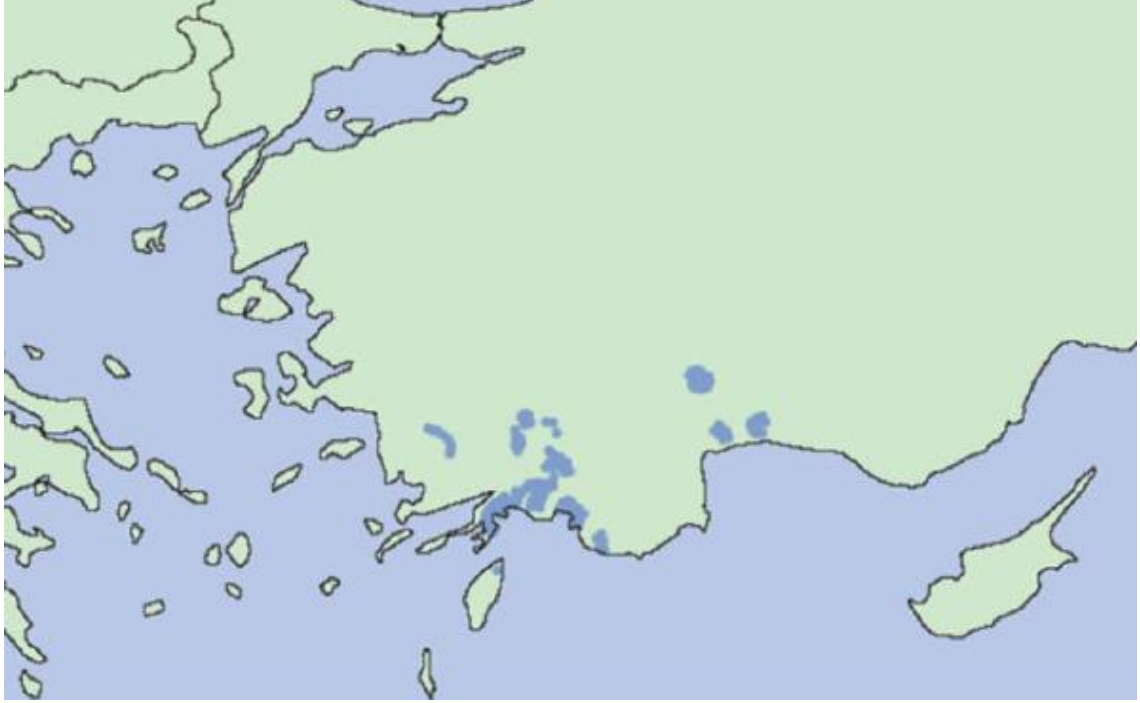
Genel yayılış alanı içerisinde en fazla Muğla'da görülmektedir (Şekil 2.2). Anadolu sığlası, ülkemizde Dalaman ve Köyceğiz deltaları ile denize yakın taban düzlüklerinin genel olarak kuzey rüzgarlarına kapalı, sıcak ve nemli yerlerinde bulunmaktadır. Söz konusu yörede çok yüksek yaz sıcaklıkları, şiddetli buharlaşma, düşük bulutluluk oranı, çok seyrek don ve kar yağışı gösteren tipik Akdeniz iklimi hüküm sürmektedir.

Anadolu sığlası ayrıca denize dik uzanan akarsular boyunca iç kesimlere kadar sokulmakta ve Denizli'nin Acıpayam ilçesi yakınlarında 1000 metrenin üstüne çıkmaktadır. Bu yöre, iklim özellikleri bakımından esas yayılışını yaptığı Köyceğiz yöresine göre önemli farklılıklar göstermektedir. Bazı Türk araştırmacıların Anadolu sığlasını Rodos ve Kıbrıs'ta bulunması sebebiyle endemik olmadığını bildirmesine rağmen bu türün eski dönemlerde Rodos ve Kıbrıs'a götürülerek kültüre alındığı başka kaynaklar tarafından belirtilmektedir. (Huş 1949, Akman vd 1992) .

Anadolu sığlasının yayıldığı alanlarda yıllık yağış miktarları oldukça yüksektir. Ancak yaz kuraklığının 3 ile 6 ay arasında olduğu göz önüne alınacak olursa, yazın bu bölgelerde yağış miktarı oldukça düşmektedir. Yaz aylarındaki bu kurak dönemde türün yaşaması ve gelişimi büyük ölçüde taban suyuna ya da devamlı akan derelerin bulunmasına bağlıdır.

Arazinin eğimi, sığla ormanının genişliğini tayin eden başlıca faktörlerden biridir. Çünkü arazi eğimi fazla olan yerlerde, sığla ağacı sadece ince bir şerit halinde su boyunca gelişebilmektedir. Halbuki düz arazilerde, suyun yayılabildiği yerlerde orman gelişebilmektedir. Nitekim Antalya-Sütçüler, Acıpayam Gölcük köyü, Muğla Turgut

köy civarında kısmen iç kısımlarda görülen sığla ağaçları sadece eğim boyunca akan su kenarlarında ince bir şerit halinde gelişme göstermişlerdir.



Şekil 2.2. *L.orientalis*'in Anadolu coğrafyasındaki yayılışı

Sığla ağacı kıyı bölgelerde gelişmekle birlikte, uygun arazi yapısı bulduğu takdirde sıcak ve güneye bakan yamaçlarda 900 m'ye çıkabilmektedir. Kıyı bölgelerindeki sığla ormanları dışında en fazla yükseğe çıkanlar Muğla bölgesinde Turgut köy civarında 850 m dolayında güneye bakan yamaçlarda rastlanmıştır.

Yukarıda adı geçen bölgelerde arazinin eğimi fazla olduğu için sığla ağaçları su kenarlarında ince bir şerit halinde gelişmiştir. Ayrıca Isparta-Sütçüler (Çandır) bölgesinde Karacaören barajı'nın hemen önünde 250 ile 300 m dolayında bulunmaktadır. Akman'a (1992) göre, sığla orman yapısının Akdeniz bölgesinde bir benzeri daha bulunmamaktadır. Anadolu sığlası formasyonları Türkiye için birinci derecede önemli olan biyolojik ve ekolojik çevreler oluşturmaktadır (Acar vd 1993).

2.3. *Liquidambar orientalis*' in Morfolojik Özellikleri ve Biyolojisi

Yapraklar ince ve uzun saplı, genellikle beş, nadiren üç ya da yedi loblu olup, loblar keskin muntazam dişlidir. Işınsal damarlı olan yapraklarda her bir lop genellikle ikincil olarak loplara ayrılır. Yaprak ayasının tabanında, ana damarların birleştiği yerde tüy demetleri saplanmış olup, bazı yapraklarda söz konusu tüyler yok denecek kadar azdır. Üst yüzleri tamamen çıplak ve parlak yeşildir. Yaprığın sapı ince ve oldukça uzundur. Erkek çiçekler kurul şeklinde ve tomurcukların üst ekseninde bulunanlar sık ve sapsız, alt tarafında bulunanlar ise daha seyrek olarak yerleşmiştir.

Çiçeklerde taç yaprak bulunmaz ve uzun bir çiçek sapının ucunda çok sayıda çiçek bir arada bulunur. Çiçekler küre şeklinde olup, erkek ve dişi çiçekler birbiri ile kaynaşmışlardır. Bunlardan erkek çiçekler terminal durumlu bir salkım halindedir. Dişi çiçekler ise yaprakların koltuklarında yan durumlu olarak bulunmakta ve bunlar birbiri ile kaynaşarak, olgunlaştığında adeta sert, dağılmayan küremsi kurullar halindedir. Özellikle stiluslar batıcı diken gibi olur. Çiçek olgunlaşınca dikenli kozalağa dönüşür ve grimsi-yeşil renk alır. Dişi çiçekler ilk oluştukları zaman renkleri yeşil olup daha sonraları kırmızımsı renk alır. Üzerleri hafif tüylü olup, meyve içinde dökülmeden kalırlar ve sertleşip odunsu bir yapı kazanırlar.

Ovaryum iki bölmelidir. Meyve septisit kapsüldür. Meyve ilk oluştuğu zaman canlı yeşil iken, olgunlaştığında açık kahverengi olur. Meyve uzun bir sapın ucunda, aşağıya doğru sarkık olarak durur. Olgunlaştıkları zaman sertleşir, kapsüller açılır ve tohumlar dökülür. Çok küçük kanatlı olan tohumun rengi koyu kahverengidir, basık, dip tarafı yuvarlak, uç kısmı ise sivridir. Tohumlarını dağıttıktan sonra kışı, hatta gelecek yazı ağaçta asılı olarak geçirir. Yeni oluşan meyvelerle, geçen yıla ait, tohumlarını dökmüş olan meyvelerin ağaçlarda bir arada bulundukları görülmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. *L. orientalis* 'in beş loblu yaprakları, çiçekleri ve tohumları (Köhler 1887)

Her bir kapsülde bir yada iki adet tohum bulunmaktadır. Kasım-aralık aylarında olgunlaşan meyvelerde kapsüller açılır, rüzgarın etkisi ile tohumlar dışarı saçılır. Tohumların bir kısmı boş olup, kabuğu parlak, ince ve serttir (Şekil 2.4).

Gövde kabuğu gençken çatlaksız yaşlıyken çatlaklıdır. Kabuklar gençken rengi grimsi, yaşlanınca grimsi kahverengi veya kahverengiye döner. Enine ve daha çok boyuna yarıklı olup, pullar küçük ve büyüktür. Gövde üzerindeki çatlaklar derindir ancak bazı bireylerde derinlik fazla olmayabilir. Kabuktaki çatlama 17 ile 24 yaşları arasında başlamaktadır. Kesilen kütükler üzerinde yapılan yaş sayımına göre 40 ila 80 yaş arasındaki ağaçlarda kabuk kalınlığı 0.5 ile 1.9 cm. arasında, çok yaşlı bazı fertlerde ise bazen 4 cm'e ulaşmaktadır.



Şekil 2.4. *L. orientalis*'in tohumları

Yaprağını döken bir tür olup, geniş tepeli, taçlı bir ağaçtır. Tepesi ise genç fertlerde dar-sivri, yaşlı olanlarda yayvan ve geniştir (Şekil 2.5). Sığıla yağı üretimi yapılan yerlerdeki ağaçların gövdeleri düzgün olmayıp, formları oldukça bozuktur. Bitkinin boy uzunluğu 30 ile 35 m çapı ise yaklaşık 100 cm kadar ulaşmaktadır. Her yıl ağaç üzerinde tohum bulunmakta olup, her üç yılda bir ise bol tohum görülmektedir. Görünüş olarak çınara veya akçaağaç benzemekte olup karaçamlarla karışık ormanlar oluşturan uzun ömürlü bir ağaçtır.

Genç sürgünler önce yeşilimsi, sonra kırmızımsı-kahverengi olup, oldukça incedir. Çıplak ve parlak olan sürgünlerin üzerindeki lentiseller küçüktür ve çıplak gözle görülebilir. Yan tomurcuklar sürgünlere çok sıralı, sarmal şekilde dizilmiştir ve sürgüne doğru az çok yatıktır. Tepe tomurcuğu yan tomurcuklardan biraz daha büyüktür. Yumurta şeklinde, elipsoid ve sivri uçlu olan tomurcuklar parlak olup, pulların kenarı hafif kirpikli, kahverengi sürmeli ve çıplaktır. Pulların rengi elma yeşili-kahverengidir. Ovuşturuldukları zaman aromatik olup, üzerinde üç adet iletim demeti izi taşır.



Şekil 2.5. Genç bir bireyin görünümü

Kesercioğlu (1973) *L. orientalis*'in kromozom sayısının $2n=30$ olduğunu kromozom sayısının şekli ve büyüklüğünün *L. styraciflua*'ya çok benzerlik gösterdiğini, morfolojisinde görülen bazı farklılıklarında ekolojik ortam farklılıklarından ortaya çıkabileceğini kaydetmiştir.

Efe (1988) Anadolu sığlasının yağ veren tipi ile yağ vermeyen tipi arasında morfolojik yönden görülen bazı farklılıklara paralel olarak iç morfolojisinin batıdan doğuya ve kuraklığın arttığı oranda farklılıklar gösterdiğini, *L. orientalis*'i karakterize eden yağın kanallarının sadece gövdede değil ağacın birçok organında bulunduğunu, yaralanmaların dışında ağacın primer yapısını tamamlarken doğal olarak ta meydana geldiğini öne sürmektedir.

2.4. *Liquidambar* Cinsinin *In Vitro* Olarak Çoğaltılması İçin Yapılan Çalışmalar

Bu cins üzerinde, en fazla araştırma yapılan tür Amerikan sığlasıdır (*Liquidambar styraciflua* L.). Bu türde kış dormansisini tamamlamış sürgün tomurcukları ve çimlendirilmiş tohumlardan alınan hipokotil parçaları kullanılarak, *in vitro* çoğaltma yöntemleri uygulanmıştır. Sommer ve Brown (1979) test ettikleri Risser ve White besin ortamı (RW) ile Murashige ve Skoog besin ortamında (MS) kültüre aldıkları tomurcuklardan sürgün elde edememişlerdir. İki yaşındaki genç bireylerin yanında 20 ile 30 yaşı arasında olan bireylerin tomurcuklarını kullanıldığı bir çalışmada WPM besin ortamında (Woody Plant Medium) Linsmaier ve Skoog besin ortamına (LS) göre daha fazla sürgün edilmiş ve genotipler arasında farklılıklar olduğu belirtilmiştir (Sutter ve Barker 1984).

Kim vd (1997) sterilize edilmiş olarak çimlendirilen iki haftalık tohumların hipokotil parçalarını kullanarak direkt organogenesis yöntemi ile Amerikan sığlasını çoğaltmışlardır. Bu amaçla Sommer ve Brown II besin ortamını kullanarak farklı Thidiazuron ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit (TDZ ve 2,4-D) kombinasyonlarını yedi hafta süre ile denemişler ve en yüksek sayıda tomurcuk oluşumunu 1 mg/L TDZ ve 0.01 mg/L 2,4-D kombinasyonunda elde etmişlerdir. Fakat test ettikleri TDZ ve 2,4-D kombinasyonları arasında en yüksek sürgün sayısını eksplant başına ortalama altı olarak kaydetmişlerdir.

Aynı cinsin diğer bir türü olan Amerikan sığlası (*Liquidambar styraciflua* L.) ile karşılaştırıldığında, Anadolu sığla ağacında yapılan *in vitro* çalışmalar oldukça sınırlıdır. Literatürde bilinen ilk çalışma 1999 yılında Genç (1999) tarafından teknik bültende yayınlanmıştır. Bu çalışmada farklı yaş ve zamanlarda örneklenen sürgün uçları ve tomurcukları kullanılarak kallus, sürgün ve kök meydana getirme özellikleri araştırılmıştır. Test edilen besin ortamlarından 1 ppm 6-benzilaminopurin (BAP) ve 1 ppm kinetin içeren Blaydes besin ortamının (BL) sığla için en uygunu olduğu, genç fidanlardan (iki ile altı yaş arası) alınan sürgün ve tomurcukların yaşlı ağaçlardan alınanlara göre daha fazla ve uzun sürgünler meydana getirdiği, sıvı besin ortamı kullanıldığında sürgün oluşum yüzdesinin yarı-katı besin ortamına göre azaldığı rapor

edilmiştir. Kallus ve sürgün oluşumu %90'ın üzerine olan genç materyalde bütün olarak elde edilen bitkicik oranı %11 olduğu tespit edilmiştir. Köklenmede ise BL besin ortamında elde edilen çoklu sürgünlerin, BL besi ortamının hormonsuz kombinasyonunda 0.5 cm boyunda parçalar halinde aktarılmasıyla ancak köklenme sağlanabilmiştir.

Erdağ ve Emek (2005), aksiller sürgün kültürlerinden elde ettikleri taze yaprakları kullanarak direkt organogenesis yöntemi ile sığla ağacını çoğaltmaya çalışmışlardır. Farklı BAP ve NAA kombinasyonlarını WPM besin ortamına ilave ederek test etmişler ve eksplant başına en fazla sürgünü (ortalama 20 sürgün) 2.5 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA uygulaması ile dokuz hafta içerisinde elde etmişlerdir. Sürgün indüklemesinden sonra sürgün uzaması için 3.3µM BAP kullanmışlar ve 2 ile 3 cm uzunluğundaki sürgünler haftalık 9.8 µM IBA uygulaması ile köklenmelerini sağlayarak toprağa aktarmışlardır.

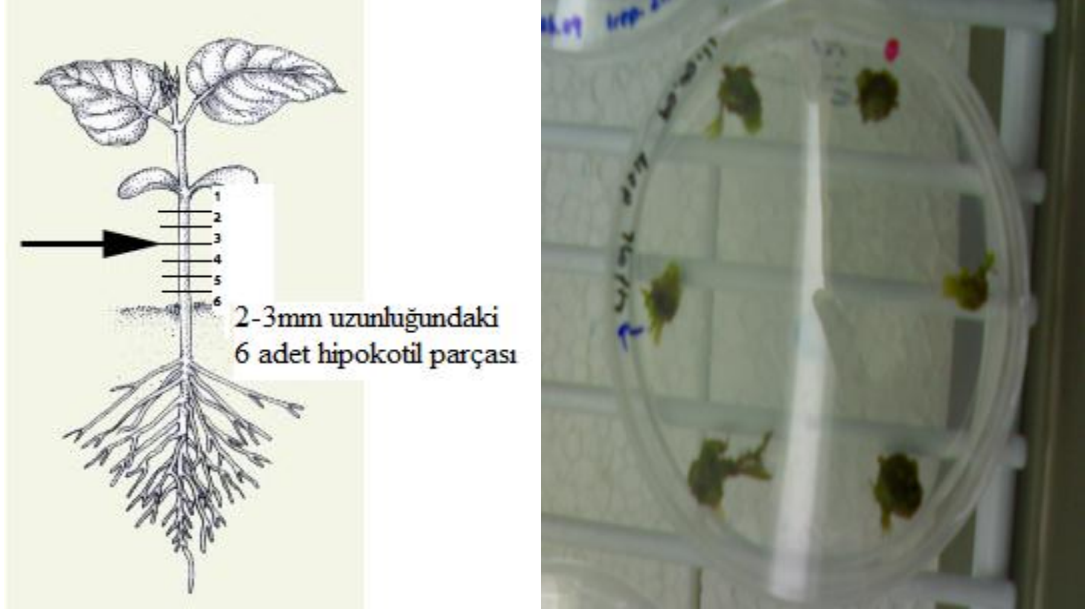
3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada kullanılan meyveler 2008 Aralık ayında Akdeniz Üniversitesi Rektörlüğünün güneyindeki yol boyunca bulunan 15 ile 20 yaş arasındaki sekiz farklı ağaçtan toplanmıştır. Ağaçlardan toplanan meyveler kurumaları için laboratuvarda farklı tepsilere yerleştirilerek kurumaya bırakılmışlardır. Kuruma sonrasında (yaklaşık 3-4 hafta) tohumlar meyvelerden silkeleme yolu ile mekanik olarak elde edilmiş ve her bir ağaçtan elde edilen tohumlar ayrı bir kaptaki olmak üzere +4°C’de buzdolabında saklanmış ve üç ay sonra deneylerde kullanılmıştır. Yapılan deneylerde her bir ağaçtan tohumlar eşit sayıda karıştırılarak kullanılmıştır.

Eksplant olarak kullanılan hipokotil parçaları steril koşullarda çimlendirilen tohumlardan elde edilmiştir bu amaçla yüzey sterilizasyona tabi tutulan tohumlar önce %70 etil alkol çözeltisinde 1 dakika tutulmuş ve bunu takiben önce %30’luk hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisinde 15 dakika süre steril edildikten sonra steril distile su ile her biri 3’er dakika olmak üzere üç defa yıkanmış ve çimlenmeleri için 10 g/L sukroz ve 7 g/L agar ilave edilmiş, ½ MS besin ortamı içeren kavanozlara yaklaşık 10 adet tohum olacak şekilde toplamda 30 kavanoza yerleştirilmiştir.

Çimlenme sonrasında çalışılacak yaş grubuna göre her bir fidelikten alınan eksplantlar, kotiledonların hemen altından başlamak üzere 2 ile 3 mm uzunluğunda altı adet hipokotil parçası alınmış ve sürgün oluşum ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.1). Alınan eksplantlar saat yönüne göre petri veya kavanozlara dizilmiştir.



Şekil 3.1. Petri kabına alındıkları konuma göre dizilen eksplantlar

3.2 Kullanılan Besin Ortamlarının Hazırlanması

Besin ortamlarının hazırlanmasında SH (Schenk ve Hildebrandt 1972) hazır olarak LO (Lindemann vd 1970), MS (Murashige ve Skoog 1962) ve WPM (Lloyd ve McCown 1980) ise 10X makro ve mikro element stok solüsyonları içerikleri Çizelge 3.1’de verildiği gibi hazırlanarak kullanılmıştır. Stok besin ortamlarının hazırlamak için kullanılan tüm kimyasallar Duchefa Biochemie B.V. (Hollanda) firmasından temin edilmiştir.

Hazır kullanılan SH besin ortamı ise üreticinin belirttiği gibi 3183.25 mg/L şekilde hazırlanmıştır. Stoktan kullanılan besin ortamları için ise makro mikro elementler 10 ml/L olacak şekilde ortama ilave edilmiştir. Bu besin ortamlarının bileşenleri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Vitamin stokları 1000X olacak şekilde hazırlanmış ve ortamlara 1 ml/l olarak ilave edilmiştir. Ortamların hepsinde 30 g/L sukroz ve 7 g/L plant agar kullanılıp agar eklenmeden önce ortamların pH’ı 5.8 olarak 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl kullanılarak ayarlanmıştır. Agar ilave edildikten sonra besin ortamları otoklavda steril edilmiş (121°C 20 dakika) ve sonrasında steril kabin içerisinde petri kaplarına (9 cm çaplı) dökülmüştür.

Çizelge 3.1. MS, SH, WPM ve LO besin ortamlarına ait bileşenler

İNORGANİK MADDELER (mg/L)	MS	SH	WPM	LO
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	556.00	5000.00
KNO ₃	1900.00	2500.00	-	10000.00
NH ₄ NO ₃	1650.00	-	400.00	10000.00
(NH ₄)H ₂ PO ₄	-	300.00	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.20	0.25	0.25
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00	400.00	370.00	720.00
K ₂ SO ₄	-	-	990.00	-
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90	10.00	22.30	80.00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	1.00	8.60	40.00
H ₃ BO ₃	6.20	5.00	6.20	20.00
KH ₂ PO ₄	170.00	-	170.00	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	-	-	-	-
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.10	0.25	250.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	439.59	200.00	96.00	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.10	-	250.00
NiCl ₂ .6H ₂ O	-	-	-	-
KCl	-	-	-	650.00
KI	0.83	1.00	-	6.00
Fe-EDTA				
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-	278.50
Na ₂ EDTA	-	-	-	412.50
FeNaEDTA	36.70	19.80	36.70	-
VİTAMİNLER				
Myo-inositol	100.00	1000.00	100.00	100.00
Nicotinic acid	0.50	5.00	0.50	100.00
Pyridoxine.HCl	0.50	0.50	0.50	100.00
Thiamine.HCl	0.10	5.00	1.00	1000.00
Glycine	2.00	-	2.00	-

3.3. Besin Ortamı ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin (BBD) Belirlenmesi

Sürgün oluşumu deneylerinde kullanılacak besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerini belirlemek üzere LO, MS, SH ve WPM besin ortamlarının her birine olmak üzere 2.5 mg/L BAP ile 0.1 mg/L NAA ve 0.1 mg/L TDZ ile 0.01 mg/L 2,4-D ilave edilerek sekiz farklı besin ortamı – BBD kombinasyonu test edilmiştir. Eksplantlar sürgün oluşum ortamında yedi hafta süre tutulduktan sonra sürgün gelişimi ve uzaması için BBD içermeyen SH ortamı içeren cam kavanozlara (baby jar) aktarılmışlardır. Bu ortamda eksplantlar, iki defa alt kültür yapılarak toplam 13 hafta (7+3+3=13) tutulduktan sonra köklenmek üzere BBD içermeyen ½ MS besin ortamına aktarılmıştır.

Kültürlerin hepsi 23±2 °C de 16/8 saat (aydınlık/karanlık) fotoperyotta kültür odasında tutulmuşlardır. Bu odada ışıklandırma için soğuk-beyaz 36 W flüoresan lambalar ışık şiddeti yaklaşık 50 µm/m²/s olacak şekilde kullanılmıştır.

3.4. Sürgün Oluşumunda Test Edilen Değişkenler

Besin ortamı – BBD kombinasyonu 2.5 mg/L BAP ile 0.1 mg/L NAA ilave edilmiş SH olarak belirlendikten sonra aşağıda açıklanan üç ana değişkenin sürgün oluşumu üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Çalışılan değişkenler sırasıyla şu şekildedir: (1) eksplantın alındığı fidenin yaşı; (2) karanlık uygulaması; (3) eksplantın alındığı konum (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Çalışılan değişkenler

1. Eksplantın alındığı fidenin yaşı	a. 2 haftalık
	b. 3 haftalık
	c. 4 haftalık
2. Karanlık uygulaması	a. 7 hafta boyunca aydınlık
	b. 1 hafta karanlık, 6 hafta aydınlık
	c. 2 hafta karanlık, 5 hafta aydınlık
3. Eksplantın alındığı konum	Kotiledonlardan itibaren köke doğru 6 adet 2-3mm uzunluğundaki hipokotil parçası

3.5.Verilerin Toplanması ve Analiz Edilmesi

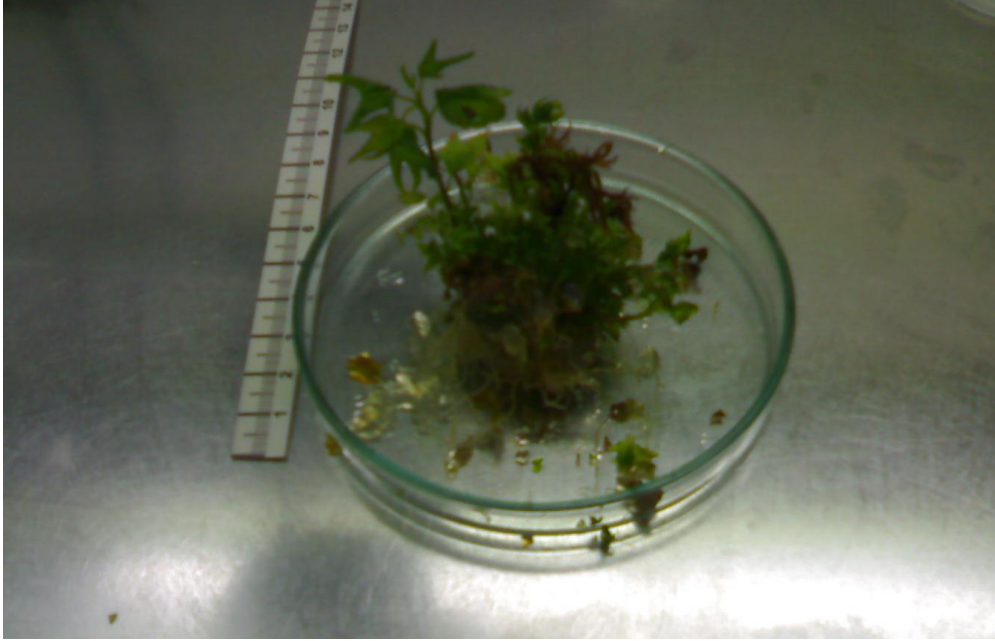
Sürgün oluşum deneyinde her bir değişken için aseptik olarak çimlendirilen farklı yaşlardaki fidelerden alınan eksplantlar 10 ayrı bir kavanoza altı (6) adet farklı fidelerden alınarak yerleştirilmiştir. Yani her bir deney tekrarında 3 fide yaşı x 3 karanlık uygulaması x 10 kavanoz = 90 kavanoz/fide kullanılmıştır. Yapılan deney üç defa tekrarlanmıştır (270 kavanoz).

Sürgün oluşumu ve uzaması tamamlandıktan sonra (toplam 13 hafta; yedi hafta sürgünlerin oluşumundan sonra, bir defa alt kültüre alınan besin ortamı üç hafta bekletilmiş ve ardından üç hafta BBD içermeyen ortamda sürgün uzamasını bekletilmiştir) her bir eksplant üzerindeki 1cm'den büyük sürgünler sayılmıştır. Elde edilen veriler GLM'e (General Linear Model) göre analiz edilmiş olup uygulamalar arasında istatistiksel önemde farklılıkların olup olmadığı ise Tukey's HSD çoklu karşılaştırma yöntemiyle belirlenmiştir. Bütün istatistiksel analizler MINITAB 15 istatistik paket programıyla yapılmıştır.

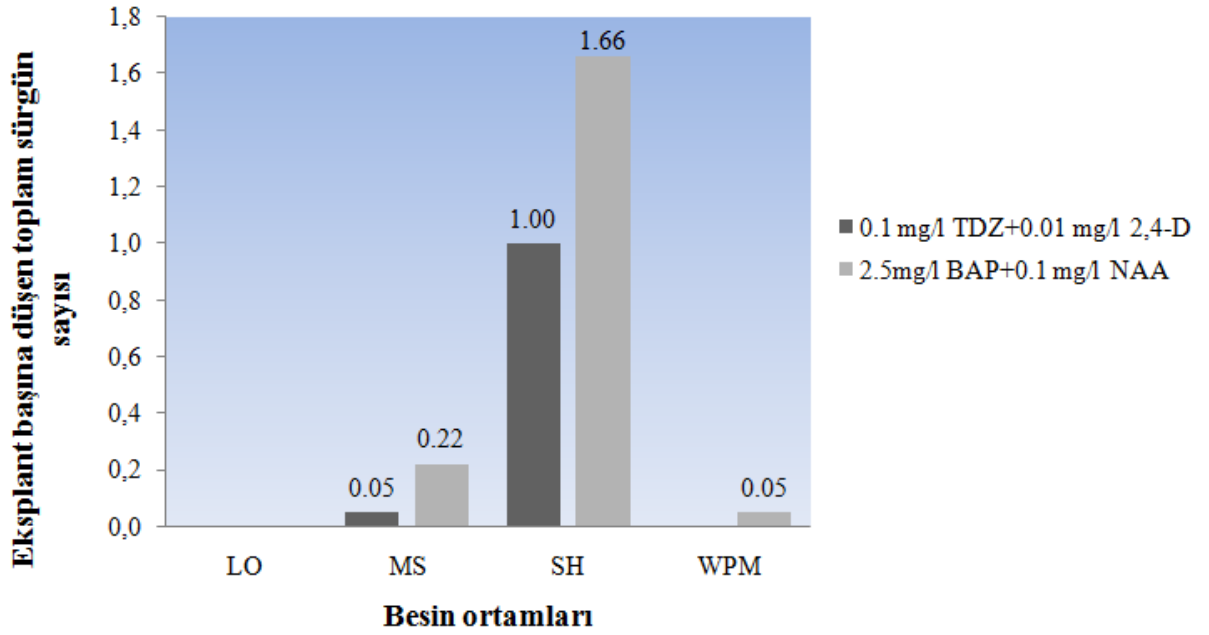
4. BULGULAR

4.1. Besin Ortamı ve BBD Testi

Toplam 18 eksplanttan alınan 1 cm'den büyük sürgünlerin sayılmasında (Şekil 4.1) en fazla sürgün sayısı 30 adet olup, eksplant başına 1.66 sürgün SH besin ortamında sayılmıştır. MS ve WPM ortamlarından elde edilen eksplant başına düşen sürgün sayıları sırasıyla 0.22 ve 0.05 olmuştur (Şekil 4.2). LO ortamında hiç sürgün oluşumu meydana gelmemiş ve yerleştirilen eksplantların tamamen karardığı gözlenmiştir. MS ortamındaki eksplantlara genelde kallus oluşumu göstermişlerdir. Besin ortamı ile birlikte test edilen BBD uygulamalarına bakıldığında SH besin ortamına 2.5 mg/L BAP ve 0.1 mg/L NAA uygulanmasıyla yaklaşık iki kat daha fazla sürgün edilmiştir.



Şekil 4.1. 1 cm'den büyük sürgünlerin sayılması



Şekil 4.2. Besin ortamı belirlenmesi ve BBD uygulaması

4.2. Sürgün Oluşumunda Test Edilen Değişkenlerin Etkisi

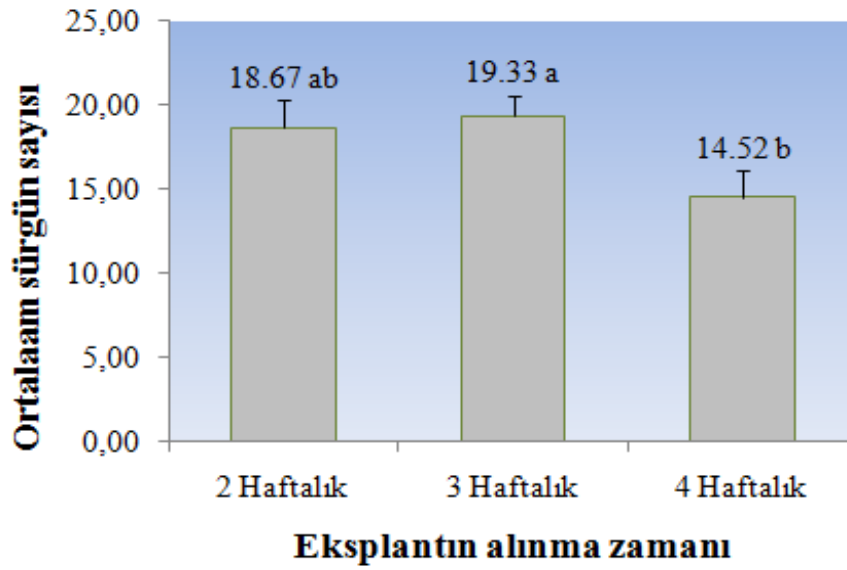
Elde edilen verilerin tek yönlü varyans analizi sonucunda test edilen değişkenlerden, eksplant alınan fide yaşının ve karanlıkta tutulma süresinin sürgün oluşumu üzerinde etkili olduğu (Çizelge 4.1 > ; $p < 0.05$) fakat eksplantın konumunun sürgün oluşumunda etkili olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca değişkenler arasında herhangi bir etkileşimde gözlenmemiştir.

Eksplantların alındığı fidelerin yaşının sürgün oluşumuna etkisine bakıldığında en yüksek ortalama sürgün sayısı 19.33 olarak 2 haftalık fideler kullanıldığında elde edilmiştir. Bu rakamı sırasıyla bir ve üç haftalık fideler 18.67 ve 14.52 ortalamaları izlemektedir. Tukey's HSD çoklu karşılaştırma testine göre iki haftalık fidelerden elde edilen ortalama üç haftalık fidelerden elde edilen ortalama sürgün sayısından istatistiksel düzeyde farklıdır (Şekil 4.3'de farklı harf taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır $p < 0.05$).

Çizelge 4.1. Sürgün oluşumu deneyinin tek yönlü varyans analizi

<i>Varyasyon kaynağı</i>	<i>sd</i>	<i>Kareler ortalaması</i>	<i>F değeri</i>	<i>Önem düzeyi (p)</i>	
Fide yaşı (FY)	2	367.5	3.18	0.045	*
Karanlık (K)	2	381.0	3.29	0.040	*
Eksplantın konumu (EK)	5	200.8	1.74	0.113	fd
FY*K	4	153.3	1.32	0.264	fd
FY*EK	10	77.7	0.67	0.749	fd
K*EK	10	67.4	0.58	0.826	fd
Hata	128	115.7			

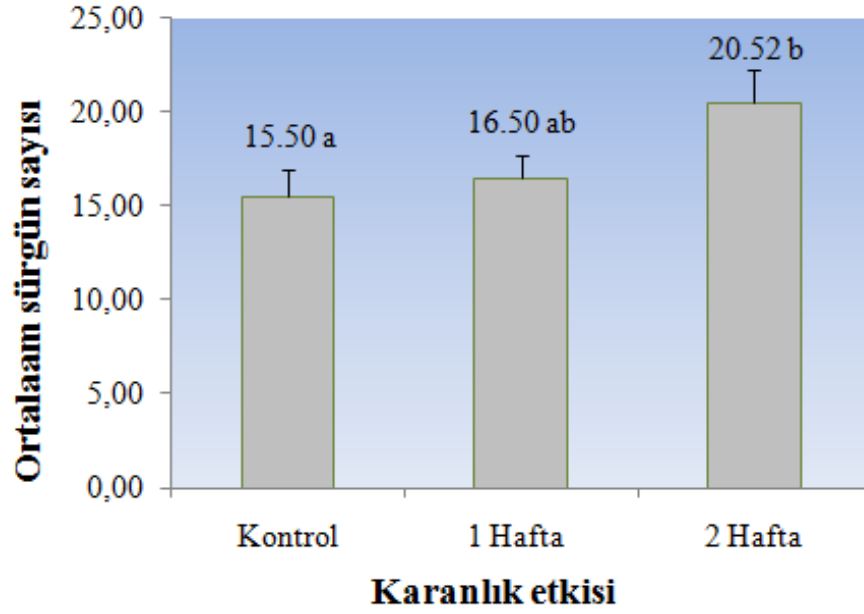
sd: serbestlik derecesi. fd: farklı değil, * p<0.05



Şekil 4.3. Fide yaşının sürgün oluşumu üzerindeki etkisi

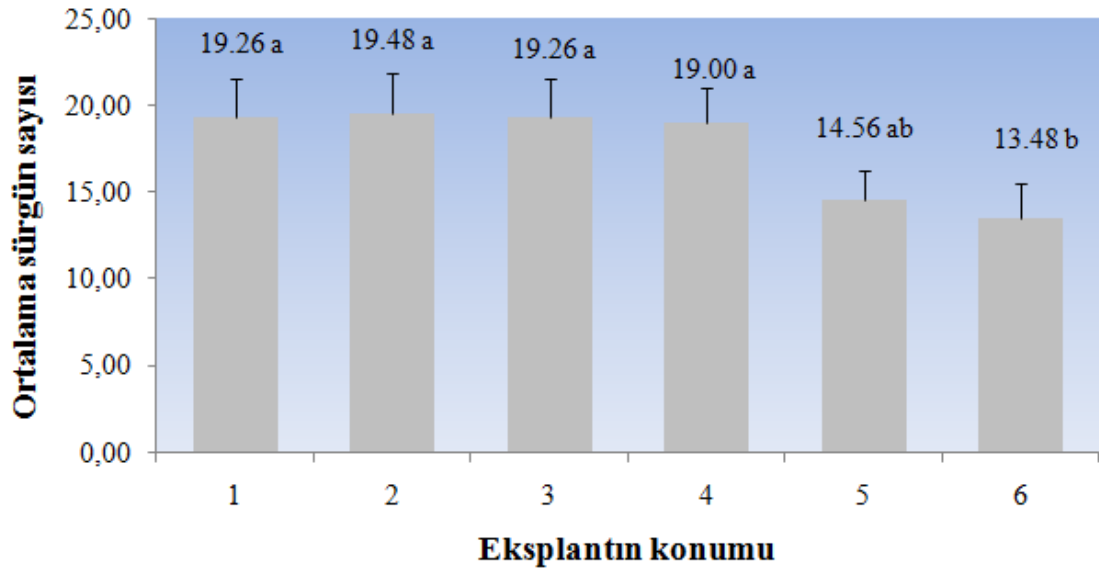
Karanlık uygulamasının indükleme aşamasındaki etkisine bakıldığında en fazla sürgün ortalamasına 20.52 olarak iki haftalık karanlık uygulamasında ulaşılmıştır. Kontrol ve bir haftalık karanlık uygulamasında elde edilen ortalamalar sırasıyla 15.50 ve 16.50 olmuştur.

Çoklu karşılaştırma testine göre sadece kontrol ve iki hafta arasındaki fark istatistiksel düzeyde farklı bulunmuştur (Şekil 4.4; farklı harf taşıyan ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır $p<0.05$)



Şekil 4.4. Karanlığın sürgün oluşumu üzerindeki etkisi

Varyans analizi sonucunda üçüncü değişken olan eksplant yerinin elde edilecek sürgün sayısı üzerinde bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Eksplant ortalamaları aşağıda Şekil 4.5'te görüldüğü gibi 13.48 ile 19.48 arasında değişmektedir. Özellikle eksplant 1-4 arasında elde edilen sürgün ortalamalarının aynı olduğu 5 ve 6. eksplantlarda bir düşüşün başladığı gözlenmiştir.



Şekil 4.5. Eksplant konumunun sürgün oluşumu üzerindeki etkisi

Yukarıda sonuçları verilen deneyden elde edilen sürgünlerin köklenme yüzdeleri analiz edildiğinde test edilen hiçbir değişkenin (fide yaşı, karanlık ve eksplant yeri) sürgünlerin köklenmesinde etkili olmadığı sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Köklendirme deneyinin tek yönlü varyans analizi

Varyasyon kaynağı	sd	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (p)	
Fide yaşı (FY)	2	0.051	2.14	0.12	fd
Karanlık (K)	2	0.025	1.05	0.35	fd
Eksplantın konumu (EK)	5	0.013	0.55	0.74	fd
Hata	145	0.024			

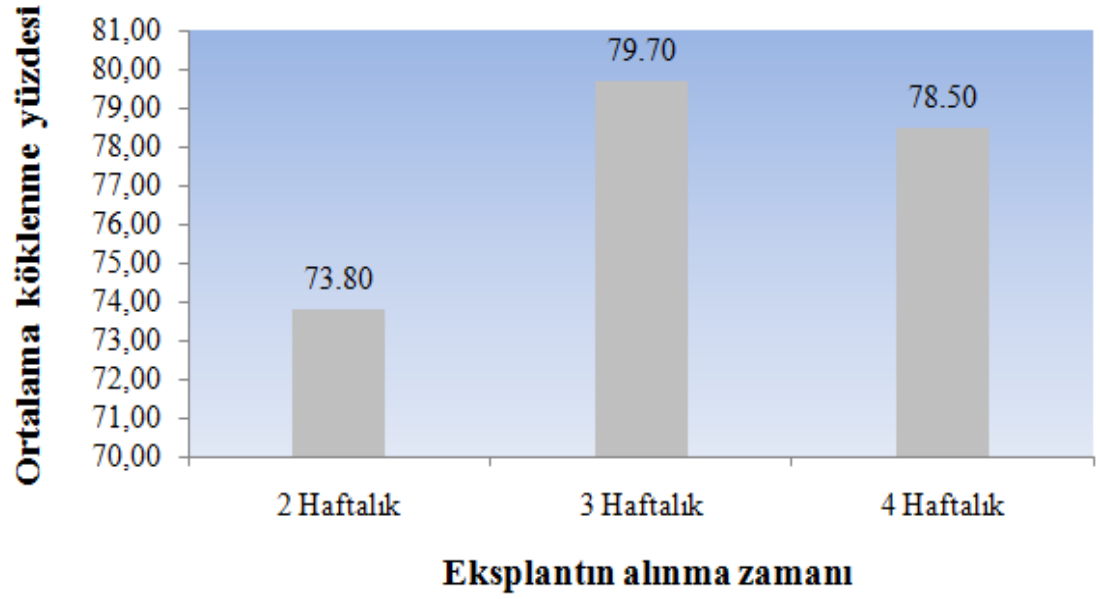
sd: serbestlik derecesi. fd: farklı değil, * p<0.05

Her bir değişken için ortalama köklenme oranlarına bakıldığında elde edilen değerlerin eksplant alınan fidenin yaşı için %73.80 -79.70 aralığında, karanlık uygulaması için %74.80 -79.10 aralığında ve eksplantın konumu için %73.90 - 79.80

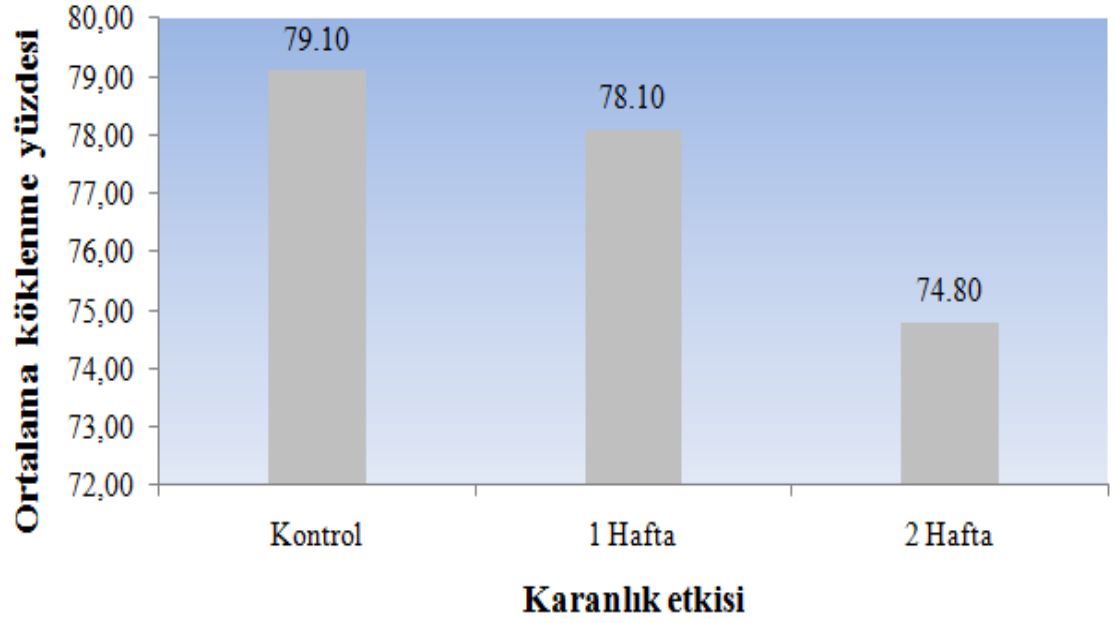
aralığında değiştiği görülmüştür (şekil 4.7, 4.8 ve 4.9). Kavanozlarda köklenen sürgünler şekil 4.6'de gösterilmiştir.



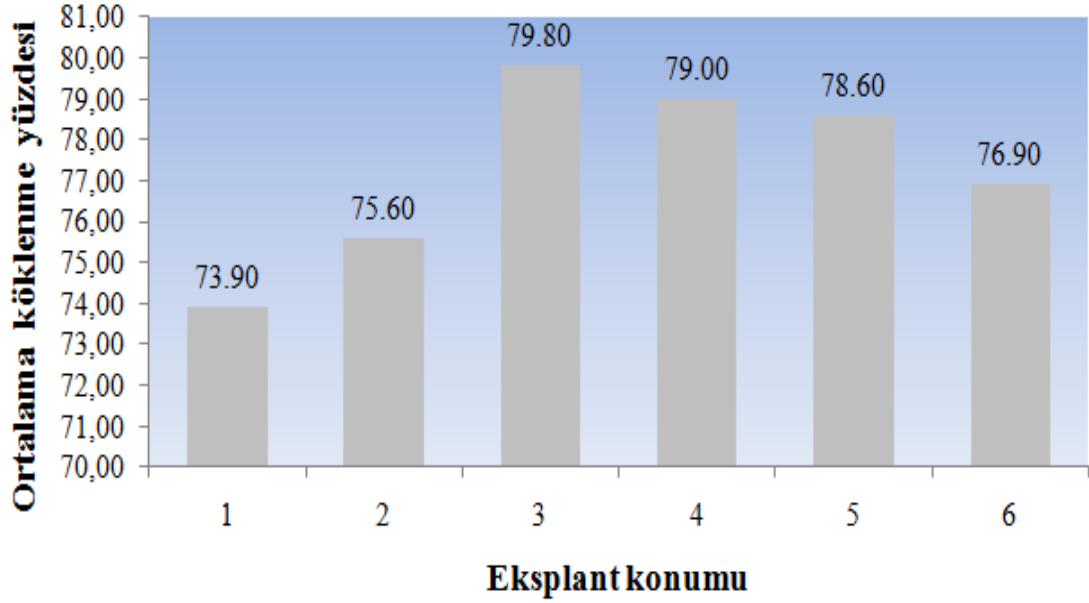
şekil 4.6. 10 hafta sonunda köklenen sürgünler



şekil 4.7. Eksplant alınan fidenin yaşına göre sürgünlerin ortalama köklenme yüzde değerleri



Şekil 4.8. Karanlık etkisine göre sürgünlerin ortalama köklenme yüzde değerler



Şekil 4.9. Eksplantın konumuna göre sürgünlerin ortalama köklenme yüzdeleri

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada ½ MS besin ortamında tohumların çimlenmesi rahatlıkla gerçekleşmiş olup Anadolu sığılası tohumlarının aseptik olarak çimlendirilmesinde kullanılan besin ortamının kritik bir değişken olmadığını daha önceki yapılan çalışmalardan Kim vd (1997) çimlendirme ortamı olarak RW besin ortamını ve Vendrame vd (2001) ise modifiye edilmiş BL besin ortamında çimlendirme işlemini gerçekleştirmişlerdir.

Besin ortamlarının belirlenmesi için yapılan çalışma sonucunda test edilen besin ortamları ve BBD uygulamaları arasında SH ile birlikte 2.5 mg/L BAP ile 0.1 mg/L NAA kullanımının Anadolu sığılasında hipokotilden direkt organogenesis yöntemi ile rejenerasyon için uygun olduğu belirlenmiştir. Amerikan sığılasında yapılan benzer bir çalışmada Sommer ve Brown (1980) besin ortamı kullanılmıştır (Kim vd 1997). Diğer taraftan Erdağ ve Emek (2005) Anadolu sığılasında *in vitro* koşullarda eksplant olarak yaprakları kullandıkları çalışmalarında WPM besin ortamını kullanmışlardır. Bu çalışmada alınan sonuçlar ise WPM ortamının hipokotilden sürgün indüklemesi için uygun besin ortamı olmadığını göstermektedir.

Test edilen BBD uygulamalarına bakıldığında 2.5 mg/l BAP ile 0.1mg/l NAA kombinasyonunun sürgün indüklemesinde daha etkili olduğu görülmüştür. Amerikan sığılasında yapılan çalışmada tek olarak TDZ etkisi araştırılmış ve bu türde kullanılabileceği gösterilmiştir (Kim vd 1997). Adı geçen çalışmada en iyi cevap verilen TDZ ile 2,4-D uygulamasının Anadolu sığılasında kullanılmasıyla olumlu sonuca ulaşamamıştır. Diğer iyi cevap veren BAP ile NAA uygulaması Erdağ ve Emek (2005) tarafından yapraklardan aldıkları eksplantlardan sürgün oluşumunda kullanılmıştır. Hipokotillerin eksplant olarak kullanıldığı bu çalışmada ise aynı BBD kombinasyonunun Anadolu sığılasında hem yaprak hem de hipokotil eksplantları için uygun olduğunu göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar eksplantın alındığı fide yaşının 2 ve 3 haftalık, sürgün oluşumu sırasında 2 hafta karanlık uygulamasının sürgün sayısını artırdığını istatistiksel olarak göstermektedir. Bu sonuçlar Anadolu sığılasında hipokotilin eksplant olarak direkt organogenesis yolu ile çoğaltılmasında sağlanması için gereken koşullar olduğunu işaret etmektedir. Diğer taraftan bu elde edilen sürgünlerin köklenme yüzdelere bakıldığında test edilen değişkenler bakımından istatistiksel düzeyde farklılık bulunmamasına rağmen sürgün oluşumu için gerekli olan koşullardan daha farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, 2 haftalık karanlık uygulaması sürgün oluşumu aşamasında pozitif etki yaparken bu uygulamadan gelen sürgünlerin köklenme yüzdesi daha düşük çıkmıştır. Bu sonuç hipokotil eksplantının sürgün oluşumu ve köklenme aşamalarında farklı tepki verebildiğini göstermektedir. Mikroçoğaltımda elde edilen sürgünlerin köklenmesi sağlanmadan bitkicik elde etmek mümkün olmadığı için köklenme başarısının göz ardı edilmemesi faydalı olacaktır. Bu çalışmada eksplant alınan fide yaşının 3 hafta olması hem sürgün oluşumunda hem de köklendirme aşamasında uyum gösteren değişken olarak ortaya çıkmıştır. Köklenme başarısı göz önüne alındığında da ışıktaki veya 1 hafta karanlıkta bekletilen eksplantlardan elde edilen sürgünlerin daha fazla köklendiği görülmüştür.

Eksplantın alındığı konuma bakıldığında sürgün oluşumu ve köklenme bakımından tüm konumlar arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuç, Kim vd (1997) tarafından Amerikan sığılasında yaptıkları çalışmanın sonuçları ile sürgün oluşumu aşamasında uyumlu olduğu göstermiştir. Aynı çalışmada eksplant konumunun köklenme üzerindeki etkisi hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise herhangi bir BBD uygulaması olmamasına rağmen ½ MS besin ortamında ortalama %77 oranında köklenme elde edilmiştir. Amerikan sığılasında (Kim vd 1997) IBA kullanılmadan ancak %57 oranında, Anadolu sığılasında ise ancak 2 mg/L IBA kullanıldığında %83 oranında köklenme elde edilebilmiştir. Bu çalışmada elde edilen %77 rakamı ileride yapılacak çalışmalarda sürgün köklenmesinin IBA kullanılarak artırılabilirliğini göstermektedir.

Köklenme üzerine yapılan çalışmada ise en iyi köklenme sonucuna 3 haftalık bireylerde ulaşılmıştır. Sürgün sayısının en fazla olduğu yaş grubu da aynı olup ileride yapılacak çalışmalarda 3 haftalık bireylerin seçilmesi doğru olacaktır. Ancak karanlık uygulamasının köklenmede etkisi olmadığı tam aksine 7 hafta boyunca aydınlıkta bekletilen bireylerde ve bu değere çok yakın olan 1 hafta karanlıkta bekletilmiş bireylerde köklenme yüzdesinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Karanlık uygulaması arttıkça sürgün oluşumuna ters olarak köklenme yüzdesi azalmaktadır. Bu yüzden daha sonraki yürütülecek çalışmalarda 1 hafta karanlıkta bekletilen 3 haftalık fidelerin seçilmesi, oluşan fideciklerin yaşam yüzdesini arttıracığından üretim yapılacak çalışmalarda bu ikilinin seçilmesi daha doğru olacaktır.

6. SONUÇ:

Bu çalışmanın sonuçları Anadolu sığılasının *in vitro* olarak çoğaltılmasında aseptik olarak çimlendirilmiş genç fidelerden elde edilen hipokotil parçalarının eksplant olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar genel olarak aşağıda sırasıyla kısaca verilmiştir.

- SH besin ortamı sürgün oluşum ortamı olarak kullanılabilir.
- Bütün mikroçoğaltım aşamaları düşünüldüğünde üç haftalık fidelerden alınan eksplantların kullanılması en çok sürgün sayısını vermiştir.
- Elde edilen sürgünlerin köklenme başarısına bakıldığında karanlık uygulaması olumlu sonuç vermiştir.
- Eksplantın alındığı konumun sürgün oluşumu ve köklenmesinde belirleyici bir etkisi saptanamamıştır.

7.KAYNAKLAR:

- ACAR, M.İ. 1988. Sığla (*Liquidambar orientalis* Mill.) ağaçlamalarında köklü çelik kullanımının gerek ve önemi. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları Dergisi No: 68.
- ACAR, M.İ. 1989. L. *orientalis* Mill. Balzamlı Eterik Yağının GC-MS-DS Sistemi ile Analiz Edilerek Birleşiminin Belirlenmesi. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları Ankara.
- ACAR, M.İ., GEMİCİ, Y., GENÇ, A. ve ÖZEL, N. 1993. Anadolu Sığla (*Liquidambar orientalis* Mill.) Ormanlarının ve Günümüzdeki Durumu. 2. Uluslararası Ekoloji ve Çevre Sorunları Sempozyumu. Türk-Alman Kültür İşleri Kurulu Yayın Dizisi No: 3 Ankara.
- ACAR, M.İ. ve KIZILEL, M. 1988. Sığla Ormanlarının Dünyü, Bugünü ve Geleceği. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Dergi Serisi, Cilt:34, Sayı:1, No:67.
- ALAN, M. ve KAYA, Z. 2003. EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for oriental sweet gum (*Liquidambar orientalis*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 6 pages.
- AKMAN, Y., KETENOĞLU, O. ve KURT, L. 1992. Fethiye-Marmaris ve Bucak Çevrelerinde Yetişen *Liquidambar orientalis* Mill. Topluluklarının Floristik Yapısı. Doğa-Turkish Journal of Botany. Vol:16, 273-286.
- ATAY, İ. 1985. Sığla Ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill.) Önemi ve Silvikültürel Özellikleri. İ. Ü. Orman Fakültesi Dergisi, Seri:B, Cilt:35, Sayı:1.
- BOZKURT, Y., GÖKER, Y. ve KURTOĞLU, A. 1989. Sığla Ağacının Bazı Özellikleri. İ. Ü. Or. Fak. Der. Seri B, Cilt:39, Sayı:1.
- DAVIS, P. H. 1972. Flora of Turkey & The East Aegean Island. Cilt IV.
- DURU, M.E., 1993. *Liquidambar orientalis* var. *orientalis* ve *Liquidambar orientalis* var. *integriloba* Yapraklarından Elde Edilen Uçucu Yağın Analizi. Yüksek L. Tezi. Erzurum
- EFE, A., 1988. *Liquidambar orientalis* Mill. (Sığla Ağacı)' in Morfolojik ve Palinolojik Özellikleri Üzerine Araştırmalar. İ.Ü. Orman Fakültesi Doktora Tezi.
- ERDAĞ, B. ve EMEK, Y. 2005. In Vitro shoot regeneration of *Liquidambar orientalis* Miller. Journal of Biological Sciences 5(6): 805-808.
- GENÇ, A. 1994. Sığla Ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill.) Genetik Varyasyonundan Aşı Yoluyla Yararlanma. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Raporlar Serisi, No:57.

- GENÇ, A. 1999. Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.)'nın Doku Kültürü Tekniği İle Üretilmesi. Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü, Teknik Bülten No:14.
- GENÇ, A., AKGÜL, E., ÖZEL, N. ve UMUT, B. 1993. Sığla (*Liquidambar orientalis* Mill.) Ormanlarının Yetiştirme Ortamı Özellikleri ile Gençleştirilmesi Üzerine Araştırmalar. Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Teknik Bülten Serisi.
- GÖKMEN, H., 1973. Kapalıtohumlular (Angiospermae) 1. Cilt S: 266-272 Orman Genel Müdürlüğü Yayın No: 564 Ankara.
- GÜL, S. 1986. Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.) Kabuk Sıyrıntılarından Yağ Elde Etme Yöntemleri Üzerine Araştırmalar. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Bülten Serisi, No:178.
- HUŞ, S., 1949. Sığla Ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill.) Ormancılık Bakımından Önemi ve Sığla Yağının Kimyasal Araştırılması Orman Genel Müdürlüğü Yayın No: 83: 7-27.
- ICKERT-BOND, S.M., PIGG, K.B. and WEN, J. 2005. Comparative Infructescence Morphology in *Liquidambar* (Altingiaceae) and Its Evolutionary Significance. *American Journal of Botany* 92(8): 1234–1255.
- KESERCİOĞLU, T. 1973. Türkiye Bitkileri Üzerine Sitotaksonomik, Anotomik ve Morfolojik Araştırmalar *L. orientalis* Mill. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi İlmi Raporlar Serisi No: 173
- KETENOĞLU, O., KURT, L. ve KURT, F. 2003. Sığla (Günlük) Ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill) Ekolojik Özellikleri. *Çevre ve İnsan Dergisi* Sayı:56, Çevre Bakanlığı Yayını.
- KIM, M. K., SOMMER, H. E., BONGARTEN, B. C. and MERKLE, S.A. 1997. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. *Plant Cell Reports* 16: 536–540.
- KÖHLER, H. A. 1887. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen und kurz erläuterndem Texte, Gera-Untermhaus.
- LLOYD, G and MCCOWN. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *B., Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30, 421
- PEŞMEN, H. 1972. The Genus *Liquidambar* L., İu Davis Flora of Turkey and East Aegean Islands, Vol: 4, page: 264-265, Edinburg.
- SCHENK, R.U. and HILDEBRANDT, A.C. 1972. Media and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell culture. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.

- SOMMER, H. E. and BROWN, C. L. 1979. Application of Tissue Culture To Forest Tree Improvement. In WR Sharp et al., eds, Plant Cell and Tissue Culture Principles and Applications. Ohio State Univ. Press, Columbus Ohio, pp: 461-491.
- SUTTER, E. and BARKER, P. 1984. Tissue Culture Propagation Of Selected Mature Clones Of Liquidambar styraciflua Intern Plant Propagators Soc. Comb. Proc. Vol 33: 113-117.
- TOPÇUOĞLU, A. 1968. Sığla Ormanlarının Islahı, Bakımı, Sığla Yağı İstihali ve Kıymetlendirilmesi. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Teknik Haber Bülteni Yıl 7 Sayı 28 Ankara
- VENDRAME, A. W., HOLLIDAY, C. P. and MERKLE, S.A. 2001. Clonal propagation of hybrid sweetgum (*Liquidambar styraciflua* x *L. formosana*) by somatic embryogenesis. Plant Cell Rep 20: 691- 695.

8. EKLER:

EK-1: TERİMLER SÖZLÜĞÜ

Aseptik: Steril koşullar altında

Eksplant: Bitkiden alınan parçacık

Ex sitü: Canlının yaşadığı doğal ortam dışında

İndükleme: Oluşum

İn sitü: Canlının yaşadığı doğal ortam

In vitro: Laboratuvar ortamında ya da yapay koşullarda

Klonlama: Herhangi bir organizmanın eşeysiz olarak üretilmesi

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

ÖZGEÇMİŞ

Kadriye Özmen 1985 yılında Antalya da doğdu. İlkokulu Antalya’da tamamladıktan sonra Orta okul ve Lise eğitimini İzmir de tamamladı. Lisans eğitimini 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü Botanik Ağırlıklı programı başarılı bir şekilde bitirdi. 2008 Eylül ayında başladığı 2011 Haziran ayında bitirdiği Yüksek Lisans eğitimini Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladı. Halen Özel Antalya Kolejinde Biyoloji öğretmeni olarak çalışmaktadır.

