

**BAZI CEVİZ ÇEŞİTLERİNDE *İN VİTRO*
MİKROÇOĞALTIM**

HALİME TUBA YILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH

2018

T.C.

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI CEVİZ ÇEŞİTLERİNDE *İN VİTRO* MİKROÇOĞALTIM

HALİME TUBA YILDIRIM

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi SHEİDA DANESHVAR ROYANDAZAGH

TEKİRDAĞ – 2018

Her hakkı saklıdır

Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH danışmanlığında HALİME TUBA YILDIRIM tarafından hazırlanan “Bazı Ceviz Çeşitlerinde *In Vitro* Mikroçoğaltım” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. CÜNEYT AKI

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR – R. (Danışman)

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sefer DEMİRBAŞ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI CEVİZ ÇEŞİTLERİNDE *İN VİTRO* MİKROÇOĞALTIM

Halime Tuba YILDIRIM

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH

Türkiye’de ceviz bitkisinde doku kültürü ile ilgili çalışmalar günümüzde hız kazanmış ancak talebi karşılayacak seviyelere ulaşamamıştır. Yapılan çalışmada ceviz bitkisinin hızlı, klonal ve hastalıksız bir şekilde anaç ve fidan üretiminin sağlanması için mikroçoğaltım çalışması yapılmıştır. Bu amaçla bazı ceviz çeşitlerinden (Vlach, Chandler, Yalova-1) elde edilen koltukaltı tomurcuklarından elde edilen eksplantların sterilizasyonu için en az kontaminasyon ve kararma oranının %70’lik actijende, 5 dakika süreyle uygulanıp 3 kez 5 dakika steril saf su ile durulanmasıyla elde edilmiştir. Sürgün rejenerasyonu aşamasında kullanılan üç farklı ceviz çeşidinde farklılık görülmemiştir. Ancak kullanılan farklı doz ve kombinasyon bitki büyüme düzenleyicisi denemelerinde eksplant başına en fazla sürgün oluşumu 2 mg/L TDZ, 1 mg/L NAA, 0,2 mg/L GA₃ içeren MS besin ortamından 2,36 adet olarak elde edilmiştir. Rejenerasyon çalışmasında her üç çeşitte gelişim gösteren sürgünler köklendirme çalışmasında kullanılmış ancak sadece Yalova-1 çeşidinde köklenme görülmüştür. Sürgünlerin köklendirilmesinde modifiye olarak hazırlanmış MS besin ortamına 4 mg/L IBA ilave edilerek köklendirilmiştir. Köklenen sürgünler steril edilmiş torf-perlit (1:1) karışıma dikilip kontrollü bir şekilde 28 gün boyunca dış koşullara alıştırma işlemi yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Ceviz, mikroçoğaltım, *in vitro*, doku kültürü, sürgün rejenerasyonu

2018, 51 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

IN VITRO MICROPROPAGATION IN SOME WALNUT GENOTYPES

Halime Tuba YILDIRIM

Tekirdağ Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH

Nowadays, studies on walnut tissue culture has gained grounds in Turkey, however it has not reached to the level that can meet the demands. In the present study, micro-propagation was carried out in order to produce walnut's rootstock and seedling in a rapid, clonal, and disease-free way. For this purpose and in order to sterilize explants obtained from auxiliary buds of specific walnuts (Vlach, Chandler, Yalova-1), the least contamination and a 70% actigen was applied for 5 minutes, was rinsed three times, each time the action of rinsing took 5 minutes. For shoot regeneration no difference was observed in terms of shoot regeneration in the three different walnut varieties used. However, the different doses and combinations used in plant growth regulatory experiments, the maximum shoot formation per explant was 2,36 in MS medium containing 2 mg/L TDZ, 1 mg/L NAA, 0,2 mg/L GA₃. To develop shoots' rooting procedure, the roots were supplemented with 4 mg / L of IBA in a modified MS medium in the Yalova-1 variety. The rooted shoots were treated with sterilized turf-perlite (1:1) mixture and conditioned for 28 days in a controlled conditions.

Keywords: Walnut, micropropagation, *in vitro*, tissue culture, shoot regeneration

2018, 51 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Ceviz Hakkında Genel Bilgiler.....	2
1.2 Cevizin Sağlıklı Beslenmede Önemi.....	4
1.3. Ceviz Fidanı Yetiştiriciliğinde Anaç ve Çeşitler.....	5
1.4. Ceviz Bitkisinde Doku Kültürü Yöntemiyle Anaç Üretimi.....	6
1.5. Türkiye’de ve Dünya’da Ceviz Yetiştiriciliği.....	8
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	11
2.1. Sterilizasyon.....	11
2.2. <i>İn Vitro</i> Koşullarda Mikroçoğaltım.....	12
2.3. Köklendirme ve Alıştırma (Aklimatizasyon).....	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1 Bitki Materyali.....	20
3.1.2.Besin Ortamı ve <i>İn Vitro</i> Kültür Koşulları.....	20
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Rejenerasyon İçin Eksplant Alımı ve Sterilizasyon.....	23
3.2.2. Eksplantların Rejenerasyon İçin Hazırlanan Ortamlara Aktarılması.....	24
3.2.3 Köklendirme.....	27
3.2.4 Alıştırma (Aklimatizasyon).....	27

3.2.5. Rejenerasyon alışmalarının İstatistiksel Değerlendirmesi.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Yüzey Sterilizasyon Bulguları.....	29
4.2. Mikroçoğaltım alışması Bulguları.....	30
4.3. Köklendirmeye Ait Bulgular.....	33
4.4. Köklenen Sürgünlerin Dış Koşullara Alıştırılması (Aklimatizasyon).....	34
5. TARTIşMA.....	36
5.1. Yüzey Sterilizasyonu.....	36
5.2. <i>İn Vitro</i> Koşullarda Mikroçoğaltım.....	37
5.3. Köklendirme ve Alıştırma (Aklimatizasyon).....	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
7. KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEçMİş.....	51

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1.1 TÜİK Verilerine göre son on yılın ceviz ağacı meyve veren/vermeyen/üretim miktarları.....	9
Çizelge 3.1 Besin ortamlarında bulunan makro-mikro elementler ve vitaminler	21
Çizelge 3.2.Stok solüsyonlarda kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin çözücüleri ve seyreltilmesi.....	22
Çizelge 3.3. Mikroçoğaltım aşamasında kullanılan ortamlarda ki B.B.D oranları.....	25
Çizelge 3.4 Köklendirme çalışmasında kullanılan besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri.....	27
Çizelge 4.1 R-1, R-2 , R-3, R-4 , R-5, R-6, R-7	32
Çizelge 4.2. Modifiye olarak hazırlanan MS besin ortamında köklendirme sonuçları.....	33

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.2. Ceviz ağacı ve meyve görünümü.....	1
Şekil.1.1. Ceviz, yeşil kabuk, sert kabuk, dişi çiçek, yaprak	3
Şekil 3.1. Eksplant kaynağı olan ceviz fidanları	20
Şekil.3.2. Koltukaltı eksplantlarının fidanlardan alınma aşaması.....	23
Şekil 3.3. Steril kabin içerisinde eksplantların yüzey sterilizasyon işlemi.....	24
Şekil 3.4. Ceviz bitkisinden alınan koltuk altı eksplantlarının <i>in vitro</i> kültür görünümü.....	25
Şekil 3.5. Eksplantların kültüre alınma işlemi.....	26
Şekil 4.1.NaOCl uygulamasında kararan ve kontamine olan eksplantlar (a,b,c) ile actijen uygulamasında gelişen eksplantlar (d,e,f).....	30
Şekil 4.2. Eksplant başına sürgün sayısı	31
Şekil 4.3. Ceviz bitkisinden elde edilen sürgün uzunlukları a;Chandler, b;Vlach, c;Yalova-1.....	32
Şekil 4.4. Modifiye MS ortamlarında ki köklenme oranları; A: 1 mg/L IBA, B: 1.5 mg/L IBA, C: 2 mg/L IBA, D: 3 mg/L IBA, E: 4 mg/L IBA.....	34
Şekil 4.5. a; kültür tüpünde patlayan tomurcuk b; çoğaltım ortamından çıkan sürgünler c; gelişen sürgün d; kök kültür ortamına transfer edilen sürgün e; köklenen sürgün f; kök ortamında köklenen sürgün g; alıştırma (aklimatizasyon) aşamasında gelişen bitki h; dış koşullara alıştırma aşaması tamamlanmış ceviz.....	34

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikro molar
L	: Litre
g	: Gram
IBA	: İndol 3-butirik asit
BA	: Benziladenin
BAP	: 6-Benzylominopurine
DKW	: Driver & Kuniyuki ve McGranahan Besin Ortamı
TDZ	: Thidiazuron
NAA	: Naftalin asetik asit
2,4-D	: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
MS	: Murashige ve Skoog Besin Ortamı
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
HCl	: Hidroklorik Asit
HgCl ₂	: Civa II klorür
GA ₃	: Giberellik Asit
EBSSO	: Eksplant başına sürgün sayısı ortalaması
B.B.D.	: Bitki büyüme düzenleyicileri
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
OGM	: Orman Genel Müdürlüğü
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations

TEŞEKKÜR

Hazırlamış olduğum bu tez çalışmasında emeği olan, desteğini esirgemeyen ve bilgisiyle yol gösterici olan sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Sheida DANESHVAR ROYANDAZAGH'a, materyel temini konusunda ve birçok aşamada bilgisini ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Sefer DEMİRBAŞ'a, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan, lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini esirgmeden aktaran değerli hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Behiye Banu BİLGİN'e, laboratuvar çalışmalarında desteğini her zaman hissettiğim, bilgisi ve önerileriyle çalışmama destek olan sevgili hocam Araş. Gör. Elif Ceren PEHLİVAN'a, güler yüzüyle, tecrübeleriyle hayatımın bir çok yerinde yol gösterici olan sevgili hocam Dr. Araş. Gör. Raziye IŞIK'a, tüm laboratuvar imkanlarını sağlayan ellerinden geldiğince yardımcı olan tüm bölüm hocalarıma ve yüksek lisans eğitimimde tanıdığım sevgili arkadaşlarıma, çalışmakta olduğum Biotek Biyoteknoloji şirketinin fabrika müdürü olan sayın Zir. Müh. Erdem DOĞRU'ya, sayın Zir. Müh. Sercan TÜREN ve ailesine, yüksek lisans eğitimimde maddi ve manevi olarak her aşamasında destek olan, fikirleri, tecrübesi ve eğitimciliğiyle bana daima yol gösterici olan sevgili ablam Hatice Ece YILDIRIM SARAL'a ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz, 2018

Halime Tuba YILDIRIM

Ziraat Mühendisi

1.GİRİŞ

Türkiye konumu nedeniyle oldukça zengin bir coğrafik konuma sahiptir. Birçok bitkiye ev sahipliği yaptığı gibi sert kabuklu meyvelerinde önemli gen kaynakları bulunmaktadır (Şimşek 2016). Sert kabuklu meyveler arasında yer alan cevizin de Türkiye’de önemli gen kaynakları bulunmaktadır (Şekil 1.2). Türkiye’nin her bölgesinde yetiştiriciliği yapılan *Juglans regia* L., Anadolu cevizi olarak bilinmektedir. Yetiştirilen cevizden daha kaliteli ve yüksek verim alabilmek için uygun çeşit ve anaç kullanımı oldukça önemlidir.



Şekil 1.2. Ceviz ağacı ve meyve görünümü

1.1 Ceviz Hakkında Genel Bilgiler

Antik Roma' da cevizin ismi Jovis Glans ve Jüpiter'in meyvesi olarak adlandırılmaktadır. Cevizin ismi batı kaynaklarında ise Royalnut olarak bilinmektedir (Şen 2005). Ceviz, sistematik olarak; Bitkiler alemi Magnoliophyta (Manolyagiller, Çiçekli Bitkiler) bölümü, Magnoliopsida (Manolyalar, Çift Çenekliler) sınıfı, Juglandales (Cevizgiller) takımı, Juglandaceae (Cevizler) familyası ve *Juglans* (Ceviz) cinsi olarak adlandırılmaktadır. Ceviz yabani formları ile dünyanın birçok bölgesinde (Kuzey ve Güney Amerika'da, Kolombiya'da Arjantin'de Ant Dağları'nda, Japonya, Çin, Hindistan ve Türkiye'ye uzanan Güney Asya ve Güney Avrupa'ya kadar) çok geniş bir yayılım göstermektedir. $2n=32$ kromozoma ve 22 türe sahip olup, bu türler içerisinde en önemli ve yaygın olanı ise *Juglans regia* L.'dir. Bu tür tüm dünyada İngiliz, İran, Anadolu, Karpat Cevizi ve Adi Ceviz olarak bilinmektedir (Şen 1986).

Sert kabuklu bir meyve olan ceviz; yeşil kabuk, sert kabuk ve iç cevizden oluşmaktadır (Şekil 1.1). Yeşil kabuk kılıf ve çiçek örtüsünden, sert kabuk ise yumurtalık duvarından oluşmaktadır. İç cevizde embriyo bulunmaktadır. Tohum endosperm bulundurmaz ve yedek besin kotiledonda birikmektedir (Esen 2013). Genç dallar pürüzsüzdür, ilerleyen yıllarda ise gövdede çatlaklar oluşur ve kabuk rengi gri ve siyahımsı bir renk alır. Ceviz ağacı gerekli koşullar sağlandığında 25 m'ye kadar boylanabilmektedir. Büyük yuvarlak taç yapmasına rağmen taç özelliği çeşitlerine göre değişebilmektedir (Şen 1986).



Şekil.1.1. Ceviz, yeşil kabuk, sert kabuk, dişi çiçek, yaprak (Anonim 2018a)

Juglans regia L. haricinde ki diğer önemli ceviz türleri ise;

- *Juglans australis* Grisebach (Arjantin cevizi)
- *Juglans boliviana* (C.D.C) Dode (Bolivya cevizi)
- *Juglans californica* L. (Kaliforniya cevizi)
- *Juglans cathayensis* Dode (Çin cevizi)
- *Juglans cinerae* L. (Yağ cevizi)
- *Juglans ailantifolia* Carr (*J.sieboldiana* Maxim) (Japon cevizi)
- *Juglans ailantifolia* var. *Cordiformis* (Kalp cevizi)
- *Juglans hindsii* Japs. (Köylü cevizi)
- *Juglans jamaicensis* C.D.C. (Batı Hint Adaları cevizi)
- *Juglans major* Heller (Arizona cevizi)
- *Juglans mandshurica* Maxim (Mançurya cevizi)

- *Juglans microcarpa* Berlandier (Küçük ceviz)
- *Juglans mollis* Engelm (Guatemala cevizi)
- *Juglans neotropica* Diels (Ant Dağları cevizi)
- *Juglans nigra* L. (Siyah ceviz)
- *Juglans olanchana* Standley and Williams (Siyah sedir cevizi)'dir (Şen, 1986).

Ceviz ağacı ayrıca sert ve odunsu özelliğinden dolayı kerestecilik sanayisinde de kullanılmaktadır. Kaliteli mobilya üretiminde ve iç mekan dekorasyonunda oldukça fazla kullanılan bir ana malzemedir (Polat ve ark. 2014).

1.2 Cevizin Sağlıklı Beslenmede Önemi

Dünya genelinde sağlıklı beslenmeye yönelik bilinçlenme giderek artmaktadır. Sağlığımız için yağ asitlerince zengin olan ceviz tüketimi oldukça önemlidir. Düzenli beslenme alışkanlığında önemli bir yere sahip olan ceviz, fonksiyonel gıda olarak tanımlanmaktadır. Cevizin içeriğinde ki önemli yağ asitlerinden Omega 3 ve Omega 6'nın insan beslenmesinde önemli bir yeri vardır (Yiğit ve ark. 2005).

Ceviz, en çok çerezlik olarak tüketilmektedir. Besin içeriği bakımından oldukça zengin olmasının yanında, vücudumuzun günlük ihtiyaç duyduğu birçok besin elementlerine sahiptir. Yüksek oranda yağ (%50'den fazlası) ve protein içerdiğinden dolayı besleyicilik değeri oldukça yüksektir. Ceviz yağının en önemli özelliği doymamış yağ asitleri bakımından zengin olmasıdır. Son yapılan çalışmalardan edinilen bilgilere göre ceviz tüketiminin kardiyovasküler ölümleri önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Cevizin bu özelliği, içerdiği polifenollerin antioksidan özelliğinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Yiğit ve ark. 2005). Ayrıca ceviz, içeriğinde ki omega-3 sayesinde beynin dostu bir gıda maddesidir. Hafızayı güçlendirici ve unutkanlığı önleyici etkileri vardır. İnsan beyninin %60'nın yağlardan meydana geldiği düşünülürse beynin düzgün bir işlevle çalışabilmesi için bu yağların önemi anlaşılmaktadır (Stevens ve ark. 1995).

İnsan vücudu için nadir besinlerden biri olan ceviz, 2,5–4,5 ng/g melatonin içermektedir. İçeriğinde ki melatonin sayesinde antiaging bakımından zengin olan on gıda arasında yer almaktadır. Ayrıca melatonin uyku sağlığının düzene sokulmasında oldukça önemli etkiye

sahiptir. İçeriğinde ki ellagic asit sayesinde de bağışıklık sistemini güçlendirerek kanseri önlemektedir. Günümüzün en büyük problemlerinden biri olan kanseri önlemek için günlük ceviz tüketimi düzenli bir şekilde sağlanması gerekmektedir (Şen 2017).

1.3 Ceviz Fidanı Yetiştiriciliğinde Anaç ve Çeşitler

Ceviz bitkisinde anaç ve fidan yetiştiriciliği Dünya’da ve Türkiye’de ticareti yapılan önemli tarım faaliyetleri arasındadır. Ceviz çeşitlerinin aşılınması ve çoğaltılması için kullanılan anaçlar; ağaç gelişimi, meyve verimi, ürün miktarı ve en önemlisi farklı ekolojik şartlara uyum, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı olması gibi özellikler bakımından önemlidir. Bu amaçla Dünya’da doku kültürü yöntemleriyle geliştirilerek yetiştirilen bir takım anaçlar mevcuttur. Cevizin Dünya genelinde kullanılan bazı anaç türleri aşağıda belirtilmiştir.

Juglans hindsii: Kaliforniya bölgesinde en yaygın kullanılan anaçtır. Derin ve verimli topraklarda tercih edilmektedir. Ağır ve yüksek kirece sahip topraklara toleransı yoktur. Phytophthora, nematod ve siyah çizgi olmayan topraklarda kullanılır.

Juglans regia: Tüm dünyada en yaygın kullanıma sahip olan Anadolu cevizi (*Juglans regia*) anacıdır. Siyah çizgi hastalığına karşı dayanıklıdır. Aşırı tuzlu topraklara, kök urlarına, nemotadlara, kök çürüklüğü etmeni olan Armillaria, kök kanserine ve taç çürüklüğüne duyarlı bir türdür.

Paradox (*J. hindsii* X *J. regia*) : Bu anacın en önemli özelliği *Phytophthora*’a türlerine ve nematodlara karşı ebeveynlerine göre daha dayanıklı olmasıdır. Hızlı gelişim göstermesinin yanında, Blackline hastalığına ve kök kanserine karşı duyarlıdır.

Paradox anacından son yıllarda geliştirilen klonal üç farklı anaç mevcuttur. Bunlar; Vlach, RX1 ve VX211’dir. VX211 anacı nematodlara karşı diğer paradox klon anaçlarına kıyasla daha dayanıklı olduğu bilinmektedir. RX1 anacı, *Phytophthora citricola* ve *P. citricola* türlerine karşı oldukça dayanıklı bir anaç çeşididir. Vlach, güçlü yapısıyla ilk klon paradoks anacıdır. Nematodlara karşı duyarlı olmasının yanında kök enfeksiyon hastalıklarına karşı dirençli olduğu bilinmektedir (Anonim 2018).

Royal (*J. nigra* X *J. hindsii*): Oldukça kuvvetli bir ceviz anacıdır. Çok hızlı büyür. Özellikle kereste yönünden değerli bir ağaçtır. Ancak yaygın bir kullanıma ulaşamamıştır.

Juglans major: Yüksek pH içeren topraklara uygundur. Diğer anaçlara göre fazla bir üstünlüğe sahip olmaması nedeniyle kullanımı yaygın değildir (Şen 1986).

Türkiye’de yetiştirilen yerli ceviz çeşitleri; Şen 1, Şen 2, Tokat 1, Yalova-1, Yalova-2, Yalova-3, Yalova-4, Şebin, Bilecik, Gültekin, Yavuz-1, Kaplan-86, Oğuzlar-77, Sütyemez-1, Maraş-18 ve Kaman 1’dir. Ülkemizde ceviz çalışmaları yeni gelişmekte olduğu için çeşit sayısı sınırlı kalmaktadır. Yabancı ceviz çeşitleri ise; Franguette, Scharsch Franquette, Hartley, Payne, Ashley, Eureka, Amigo, Chico, Sundland, Pedro, Cisco, Vina, Chandler, Serr, Hovward, Dublin’s Glory, Fernor, Fernette, Lara, Hebei, Stan (BLE 300), Rex (C 152), Sexton (UC90-31-10), Forde (UC95-26-37), Gillet (UC95-22-26) gibi çeşitler bulunmaktadır (Şen 1986).

1.4 Ceviz Bitkisinde Doku Kültürü Yöntemiyle Anaç Üretimi

Yüzyıllardır kolay, hızlı ve ucuz fidan çoğaltım tekniği olarak kullanılan tohumla çoğaltım, en çok kullanılan çoğaltım tekniği olarak bilinmektedir. Ancak ceviz çeşitlerini çoğaltmak için bu yöntem başarısız olmaktadır. Ceviz bitkisi, tek evcikli (erkek ve dişi organlar aynı çiçekte) olması, dikogami eğilimi göstermesi (erkek ve dişi organlı çiçeklerin ayrı zamanlarda açılması ve olgunlaşması), tozlamamanın rüzgar ile gerçekleşmesi nedeniyle heterozigot (genetik yapının farklı olması) yapıdadır. Bu sebepten dolayı tohumdan gelişen yeni bitki ana bitkinin özelliklerini taşımaz. Bu da istenilen tür ve çeşitte ceviz ağacı çoğaltımını engellemektedir. Generatif çoğaltma, genellikle çöğür üretimi ve ıslah çalışmaları için kullanılmaktadır. Fidan üretiminde ise vejetatif yöntemler kullanılmaktadır. Pratikte en çok kullanılan aşı ile çoğaltma, daldırma, çelikleme gibi yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bu gibi geleneksel ve zaman alıcı yöntemlerin yerine hızlı ve klonal anaçların elde edilmesi için bitki doku kültürü yöntemleri daha iyi bir seçenek haline gelmektedir (Şen 2011).

Cevizin anaç ve fidan yetiştiriciliği ülkemizde ticareti yapılan önemli tarım faaliyetleri arasında yer almaktadır. Çeşitli yöntemler kullanılarak yetiştiriciliğin yapılmasına rağmen günümüzde daha hızlı, hastalıksız ve virüslerden arındırılmış olarak çok sayıda klonal bitki anacını elde etmek önem kazanmıştır. Gün geçtikçe artan arza sahip olması yetiştiriciliğinin artmasında ki en önemli nedendir. Cevizde mikroçoğaltım, sahip olduğu avantajlarla birlikte istenilen hatların çok sayıda kitlesel olarak üretilmesine imkan sağlamaktadır (Fidancı, 2005).

Mikroçoğaltım; bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme özelliğine sahip bitki kısımlarının yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullarda yeni bitkilerin elde edilmesidir.

Bitkilerin *in vitro* koşullarda ki mikroçoğaltımın başarısı, eksplantların alındığı anaç bitkinin genotipi, sağlık durumu ve yetiştirme koşulları ile bağlantılıdır. Meristem ve sürgün ucu kültürlerinde donör bitkinin fizyolojik durumu, eksplantın tipi ve büyüklüğü ile alındığı mevsim, çeşit, kültür ortamındaki mineral tuzlar, şekerler, katılaştırıcı agar ve benzeri kimyasal maddeler, bitki büyüme düzenleyicileri, ışık, sıcaklık, nem, fotoperiyot gibi çevre şartları başarıyı oldukça etkileyen faktörlerdir ve göz ardı edilemez bilgilerdir. Optimal koşullar ise her bitki, tür ve çeşit için farklı olabilmektedir (Babaoğlu ve ark. 2002).

Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibariyle üç kısımda incelenebilmektedir. Bunlar; 1) organize olmuş meristematik hücreleri (hipokotil, yaprak) içeren somatik dokulardan rejenerasyon, 2) meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon, ve 3) mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon'dur. Birinci tip rejenerasyonda uç ve yan meristemlerden bitkiler çoğaltılır. Buna meristem kültürü yoluyla mikroçoğaltım denilir. Elde edilen hücreler tamamen donör bitkiye benzerdir. İkinci tip rejenerasyon; doğrudan bitki eksplantının bitki büyüme düzenleyicilerinin (etkisi sonucu, embriyo ve daha sonra bitkiyi oluşturması şeklinde olabilir. Üçüncü tip ise gametlerden haploid bitki elde etmedir. (Babaoğlu ve ark. 2002)

Doku kültürü yöntemleri tohum, çelik, daldırma ve aşılama gibi geleneksel ve zaman alan çoğaltım yöntemlerine karşı önemli bir seçenek haline gelmektedir. Fakat odunsu bitkilerin rejenerasyonu, otsu bitkilerin rejenerasyonuna göre oldukça zor bir sürece sahiptir Bu nedenle seçilen sert kabuklu meyve klonlarının rejenerasyonunda uygun fizyolojik dönem, eksplant seçimi ve toksik bileşiklerin zararlı etkilerinin üstesinden gelinmesi sürgün çoğaltım oranında ve sürgünlerin köklendirilmesinde oldukça önemlidir (Karvar 1990).

Klonal çoğaltım da genotipi korumak oldukça önemli olduğundan *in vitro* üretimde sürgün uçlarının (tepe tomurcukları) veya aksiller (koltukaltı) tomurcukların kullanılması meristem dokularının genotip bakımından aynı olduğundan dolayı tercih edilmektedir. Bu olay, meristem hücrelerin DNA sentezi ve mitoz bölünme düzeninin tam kontrol altında olması, böylece de somatik poliplodiye yol açan ekstra DNA duplikasyonlarının gerçekleşmemesi ve diğer genetik bozuklukları engelleyen ve sürekli hücre bölünmesinin olması özelliklerinden kaynaklanmaktadır (şirin 2014; Emiroğlu ve Gürel 2005; D'Amato 1977) .

Odunsu bitkilerdeki rejenerasyon çalışmaları otsu bitkilere göre daha uzun ve zahmetli süreçtir. Bu gibi sorunların önüne geçmek için dikkatli ve düzenli çalışmak rejenerasyon başarısında oldukça önemli bir yere sahiptir (Nas ve Read 2004). Bunun haricinde çalışmada bir diğer önemli nokta ise sterilizasyondur. Sterilizasyon çalışmalarında en çok kullanılan kimyasal ise sodyum hipoklorittir (NaClO). Bunun haricinde HgCl₂, H₂O₂, AgNO₃ gibi kimyasallar da sterilizasyon için kullanılabilir. Ayrıca Actijen (%100 doğal su bazlı ve % 0,015 aktif klor içeren sıvı, yer ve yüzey dezenfektanı) kullanılarak da yapılan sterilizasyon çalışmaları bulunmaktadır (Pehlivan ve ark 2017). Kontaminasyon gerçekleşmemesi için eksplantın üzerindeki mikroorganizmalardan veya endojen olan kontaminasyonlardan tamamen arındırılarak steril edilmiş olması gerekmektedir. Ayrıca uzun süre steril kültür ortamında bulunan eksplantlarda da kronik kontaminasyon oluşabilmektedir (Babaoğlu 2002).

Doku kültürü işlemi birçok aşamadan oluşmaktadır. Bunlar;

a) Uygun bir laboratuvar düzeninin kurulması,

b) Kullanılacak bitki eksplantlarının ve besin ortamlarının doğru seçimi, hazırlanması ve sterilizasyon işlemi,

c) Somatik ve gametik hücrelerden bitki rejenerasyonunun uyarılması (organogenesis, somatik embriyogenesis veya meristem çoğaltımı yoluyla),

d) Oluşan sürgünlerin çoğaltılması ve boylarının uzatılması,

e) Uzayan sürgünlerin köklendirilmesi,

f) Köklenen bitkilerin dış ortama alıştırılması (aklimatizasyon) aşamalarından oluşmaktadır (Babaoğlu ve ark. 2002).

1.5 Türkiye’de ve Dünya’da Ceviz Yetiştiriciliği

Türkiye’de birçok sert kabuklu meyve yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ceviz, ülkenin elverişli iklim ve toprak özelliklerinden dolayı oldukça yaygın olarak yetiştiriciliği ve ticareti yapılan ürünler arasında yer almaktadır. Ancak yetiştiricilikte istenilen seviyelere ulaşılamamıştır. TÜİK 2016-2017 verilerine göre, meyve veren ağaç sayısı 8.767, meyve vermeyen ağaç sayısı ise 7,895’dir. Cevizin 2017 yılı için toplam üretim miktarı 210,000 tondur. (izelde 1.1). Üretim kayıpları 4,560 ton iken kullanılabilir üretim miktarı ise 185,440, arz edilen ürün miktarı 292,240, ithalat 63,800 ve ihracat ise 7,917 tondur (TÜİK 2018).

FAO 2016 verilerine göre dünyada en fazla ceviz üretimi yapan ülke, 1,785,879 ton ile Çin ilk sırada yer almaktadır. 607,814 ton ile A.B.D ikinci, 405,281 ton ile İran üçüncü, 195,000 ton ile Türkiye dördüncü sırada yer almaktadır. Bu veriler göz önüne alınarak Türkiye'nin ceviz üretiminde ki payının artması için, fidan yetiştiriciliğinin ve ürün verimlerinin artırılması gerekmektedir. OGM'nin (Orman Genel Müdürlüğü) 2017 yılı ceviz eylem planında, 1,377 hektar ceviz ağaçlandırması yapılması planlanmış ve 1,336 hektar ceviz ağaçlandırması yapılmış ve yaklaşık 275,000 adet ceviz fidanı dikilmiştir (FAO 2018).

Çizelge 1.1. TÜİK Verilerine göre son on yılın ceviz ağacı meyve veren/vermeyen/üretim miktarları

Yıllar	Meyve Veren Ağaç Sayısı	Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı	Üretim (ton)
2008	5095	2952	170897
2009	5192	3200	177298
2010	5441	3643	178142
2011	5594	4045	183240
2012	5977	4541	203212
2013	6526	4878	212140
2014	7001	5374	180807
2015	7596	5560	190000
2016	8171	6873	195000
2017	8767	7895	210000

Yapılan istatiksel veriler sonucunda meyve veren ağaç sayısında yıllara oranla giderek artış görülmüştür. Ancak üretim miktarı 2013 yılına kadar artmış, sonraki bir kaç yıl düşüşün

ardından 2017 yılında tekrar eski seviyelere ulaşarak artışa devam ettiği görülmektedir (TK 2018).

Türkiye’de ceviz bitkisinde doku kültürü ile ilgili çalışmalar günümüzde hız kazanmış ancak talebi karşılayacak seviyelere ulaşamamıştır. Yeterli miktarda anaç ve fidan üretimi için mikroçoğaltım çalışmalarının artırılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, ceviz bitkisinin hızlı, klonal ve hastalıksız bir şekilde anaç ve fidan üretimini sağlanması için mikroçoğaltım çalışması yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Sterilizasyon

In vitro koşullarda yapılacak olan mikroçoğaltım çalışmalarında öncelikli olarak her bitki için uygun sterilizasyon yönteminin bulunması, mikroçoğaltım çalışmasının başarıya ulaşması için oldukça önemlidir. Dış koşullardan alınan bir eksplantın *in vitro* koşullarında kontaminasyona yol açmaması için en doğru sterilizasyon yönteminin belirlenmesi gerekmektedir. Bu sebeple daha önce ki yapılan çalışmalara ait literatür bilgileri önem arz etmektedir.

Cevizde mikroçoğaltım çalışması için sterilizasyon işleminde çoğunlukla sodyum hipoklorit kullanılmıştır.

Fu Yulan ve ark. (2003), *Carya illinoensis* bitkisinin sürgün uçları kullanılarak, en uygun sterilizasyon yönteminin önce %70 etil alkole batırılıp ve 15 dakika boyunca %0,2 HgCl' ye (birkaç damla Tween 20 ilave edilerek) karıştırılıp ve daha sonra 10 kez steril saf su ile durulanmasıyla elde edilmiştir. Eksplantlar karanlık ortamda ve aktif kömür ilave edilerek, kararma engellenmiştir. Penisilin ve streptomisin besin ortamına ilave etmenin kontaminasyon oluşmasını engellendiği bildirilmiştir.

Damiano ve ark. (2004), 'Montebello' ve 'Tonda Gentile Romana' fındık çeşitlerinin mikroçoğaltım protokolünü geliştirmek için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon işleminde etil alkol, NaOCl ve Na mertiyolat kullanılarak steril eksplantlar elde edilebileceği araştırılmıştır.

Fidancı (2005), Şebin ve KR-2 ceviz çeşitlerinden alınan ekplantların sterilizasyonu için öncelikle antibakteriyal sabunla tomurcuklar yıkanmış ve durulanana kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Ardından %10'luk NaOCl içerisine birkaç damla tween-20 damlatılıp 20 dakika boyunca sterilizasyon işlemi gerçekleştirilerek 3-4 kez steril distile su ile durulanıp sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Dong ve ark. (2007), cevizden alınan ekplantların rejenerasyonundan önce başarılı bir şekilde sterilizasyon gerçekleştirilmesi için, %70'lik etil alkolde bir süre bekletilen ekplantlar ardından %0,1 HgCl₂ ile sterilizasyon işlemi tamamlanıp ardından steril distile su ile durulandığı bildirilmiştir.

Sevgin (2010), yaptığı çalışmada eksplant olarak Nanporeil, Ferraduel, Ferragnes ve Tuano badem çeşitlerinde ön sterilizasyon için %70 etil alkolde 20 saniye bekletildikten sonra sterilizasyon için %20 oranında NaOCl içerisine 10 damla Tween-20 damlatılarak 15 dakika bekletilip ardından steril saf su ile durulanmıştır.

Gotea ve ark. (2012), Chandler, Franquette ve Jupaneşti ceviz çeşitlerinde sterilizasyon protokolünün belirlenmesi için 1 ve 1,2 cm boyutundaki tek nodlu eksplantları sterilizasyon işlemine tabi tutmuştur. Eksplantlar deterjanlı su ile yıkanıp ardından alkolle muamele ettikten sonra %5 NaOCl çözeltisi ile steril edilip sonrasında steril saf su ile durularak en uygun sterilizasyon protokolü belirlenmiştir.

Şirin (2014), Kaman 1 ve Kaman 5 ceviz çeşitlerinin koltukaltı tomurcuklarında sterilizasyon protokolü geliştirmek amacıyla, eksplantları %70'lik etil alkolde 1 dakika maruz bırakılıp ardından %0,2'lik HgCl₂ içinde 5 dakika boyunca sterilizasyon işlemi gerçekleştirmiştir. Cevizde yapılan rejenerasyon çalışmalarında yoğun olarak görülen kararmayı önlemek için 100 mg/L askorbik asit, 100 mg/L sitrik asit ilave edilerek önlenmeye çalışılmış, ayrıca 3, 24 ve 48 saat aralıklarla alt kültüre alınarak çalışmaya devam edildiği bildirilmiştir.

Pehlivan ve ark. (2017), *Vitis vinifera* sürgün uçlarına uyguladığı sterilizasyon işleminde %10 Actijen' e birkaç damla Tween-20 ekleyerek 5 ve 10 dakika boyunca sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve ardından sürgün uçları 3 kez steril saf su ile durulanmıştır.

2.2 *In Vitro* Koşullarda Mikroçoğaltım

Sterilizasyon aşaması tamamlanmış olan eksplantların *in vitro* koşullarda başarılı bir mikroçoğaltım çalışması gerçekleştirilebilmesi için uygun besin ortamı ile birlikte içeriğine ilave edilecek olan bitki büyüme düzenleyicilerinin (B.B.D) doğru ve uygun dozlarda kullanılması gerekmektedir. Her bitki için değişkenlik gösteren B.B.D. dozları ve besin ortamı içeriği, ceviz için de daha önce ki literatür çalışmalarından yararlanılarak en uygun protokol hazırlanması amaçlanmıştır.

Cornu ve Jay- Allemand (1989), *Juglans. regia*×*Juglans regia* hibritlerinin sürgün poliferasyonunda katılaştırıcı olarak Gelrite kullanılmasının Difto Bacto Agar'a oranla rejenerasyon çalışmalarında daha iyi sonuçlar elde edilebileceğini belirtmiştir.

Grusella ve Poxus (1990), cevizde yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında MS besin ortamına 0,5 mg/L BAP ilave edilerek en iyi sürgün rejenerasyonunun elde edildiğini bildirmiştir.

Dolcet-Sanjuan (1995), *Pistacia vera*'nın mikroçoğaltımı, uzama ve köklendirme işlemlerini MS ortamına MeJA ekleyerek gerçekleştirmiştir. Sürgün ucu kültürleri 5 µM BAP ve 0.05 µM IBA içeren bir MS ortamına aktarmıştır. Çalışmada, 0,3, 1 ve 3,2 µM MeJA ekleyerek sırasıyla 2,5, 3,0 ve 2,3 cm civarı sürgünler geliştirmiştir.

Scaltsoyiannes ve ark. (1997) *Juglans regia* L. yaptıkları rejenerasyon çalışmasında en iyi aksiller sürgünlerin 4,44 µM BAP ve 0,005 µM IBA içeren DKW (Driver ile Kuniyuki ve McGranahan, 1987) besin ortamında gerçekleştiğini bildirmiştir. Sürgün uzunluğunun en fazla 2,22 µM BAP içeren kültür ortamında olduğu belirtilmiştir.

Puthra ve ark. (2002), *in vitro*' da çimlendirilen tohumlardan alınan sürgün ucu / nodal eksplantları MS, WPM besin ortamlarında ve TDZ, BAP, NAA, IBA B.B.D'leri ile kıyaslanarak en iyi sonucu 0,05 ile 2 mg/L arasında değişen TDZ içeren WPM katı ortamından elde etmiştir.

Saadat ve ark. (2002) tarafından *Juglans regia* L. çoğaltılması, üç farklı besin ortamı DKW, MS, WPM ve üç farklı katılaştırıcı Phytigel, Difco Bacto agar ve Phytigel'in bir karışımı ve Difco Bacto Agar ile besin ortamları arasında ki farklılıkları incelemiştir. Elde edilen sonuçta eksplantların rejener olma oranı ve gelişim farklılıklarını incelemiştir. Eksplantların gelişimi DKW ortamı, MS ve WPM ortamlarına göre daha iyi sonuç verdiğini belirtmiştir. Phytigel katılaştırıcısının Difco Bacto Agar, Difco Bacto Agar + Phytigel ' den daha iyi sonuç verdiğini de çalışma da belirtmiştir.

Tetsumura ve ark. (2002) yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında, DKW besin ortamına 5 µM BAP ve 0,05 µM IBA ilave edilen kültür ortamlarında başarılı sonuç elde etmiştir.

Nas (2004), yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında poliaminlerin sürgün gelişimi ve uzaması üzerine etkileri araştırmıştır. *Corylus avellana* L. yeni gelişen sürgünlerinin tomurcukları, MS ortamında ve DKW besin ortamlarında kültüre almıştır. 0,2 mM putrescine + 0,2 mM spermidine + 0,05 mM spermine olarak besin ortamına eklemiştir. Ayrıca 6,7 µM, 11,1 µM ve 15,5 µM BAP arasında gözlem yapmıştır. Poliaminlerin hem sürgün başına tomurcuklanmayı hem de sürgün uzamasına güçlü bir etkisi olduğunu tespit etmiştir. BAP'nın ise etkisinin daha düşük kaldığını belirtmiştir. Poliaminlerin kullanıldığı ortamda sürgün uzamasının % 83 arttığını görmüştür. Sürgün uzunluğu poliaminli ortamda 4,0 cm seviyelerine ulaşırken

yokluğunda 2,0 cm civarında kalmıştır. Sonuç olarak, poliaminlerin rejenerasyon oranını yüksek oranda artırdığını ve eksplantların morfolojik yapısını geliştirdiğini ortaya koymuştur.

Fidancı (2005) yaptığı çalışmada, Şebin ve KR-2 ceviz çeşitlerinde üç farklı eksplant kullanmıştır (meristem, sürgün ucu, nodal segment) ve üç farklı ortamda kültür ortamları oluşturmuştur. Besin ortamı olarak; MS, DKW, WPM ortamlarını kullanmıştır. DKW ortamında daha iyi gelişim gözlemlenmiştir. Sürgün çoğaltımı ortamında 1,0 mg/L BAP ve 0,01mg/L IBA kullanılarak mikroçoğaltım gerçekleştirilmiştir.

Dong ve ark. (2007) eksplant kaynaklarını %70'lik etil alkol ve % 0,1 HgCl₂ ile steril etmiştir. Sürgün çoğaltımı, 4,4 µM BAP ile 4,9 µM ilave edilerek hazırlanan kültür ortamında gerçekleştirilmiştir.

Leal ve ark (2007), cevizin mikro çoğaltımında, alt kültüre alma süresiyle sürgün gelişimi ve köklenme arasında önemli bir parametre olduğunu belirtmiştir. Gelişim oranının ilk alt kültürlerde düşük olduğu, daha sonraki alt kültürlerde ise bu oranın arttığını açıklamıştır.

Bosela ve ark. (2008) tarafından siyah ceviz çeşidinde yapılan çalışmada, sürgün rejenerasyonunun (MS, DKW, ½ DKW) besin ortamı ve sitokinlerin (ZEA, KIN, BAP) arasında ki gelişim farklılıklarını incelemiş DKW ve ½ DKW ortamlarında gelişimin belirgin şekilde daha iyi olduğunu belirtmiştir.

Payghamzadeh ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada ceviz'deki olgunlaşmamış embriyoların *in vitro* çimlenmesi üzerine BAP, IBA ve genotiplerin etkilerini değerlendirmiştir. Cevizin olgunlaşmamış embriyoları DKW ortamında farklı bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamlarda kültüre almıştır. BAP ve IBA 'nın farklı konsantrasyonları arasında önemli farklılıklar gözlemlendiğini belirtmiştir. Olgunlaşmamış embriyo çimlenmesi için en iyi performans gösteren ortam, 0,01, 0,05 ve 0,1 mg/L IBA ile birlikte tek başına 1 mg/L ve 1,5 mg/L BAP ile desteklenmiş DKW ortamı olduğunu belirtmiştir.

Ashrafi ve ark. (2010), cevizin mikro çoğaltılmasında DKW besin ortamında modifiye edilerek hazırlanan farklı minerallerin etkilerini araştırmıştır. Yeni geliştirilerek hazırlanan besin ortamında sürgün gelişimlerinin daha iyi olduğunu belirtmiştir.

Amiri ve Gharati (2011) yaptıkları çalışmada, besin ortamında bulunan makro elementlerin mikroçoğaltım ve köklenme üzerinde ki etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada 1, 1/2, 1/3, 1/5 oranlarında DKW besin ortamı kullanmış, sürgün gelişimi ve çoğaltılmasında makro

elementlerin oranı artırılarak gelişimin de buna bağlı olarak arttığı yapılan çalışmada gözlenmiştir.

Al-Mizory ve Mayi (2012), cevizde nodal eksplantlarla yaptıkları çalışmada, kinetinin BAP'dan daha iyi sonuç verdiğini kaydetmiştir. Aynı çalışmada BAP ile kinetin ve BAP ile NAA'nın farklı kombinasyonları kullanılmış ve 2 mg/L BAP + 1 mg/L KİN kombinasyonundan en iyi sonucu almıştır.

Gotea (2012), Jupanesti, Chandler ve Franquette Fars ceviz çeşitlerinin *in vitro* ortamda gelişimi ve çoğaltılması için rejenerasyon çalışması yapmıştır. Üç tip katılaştırıcı madde ve farklı sitokinin konsantrasyonları kullanarak en iyi gelişim gösteren besin ortamında ki katılaştırıcı maddenin rolünü ve rejenerasyon için sitokinin rolü araştırmıştır. Phytigel ile jelleştirilen DKW kültür ortamında iyi bir gelişim oranı elde etmiştir. Çoğaltma aşamasında, DKW kültür ortamında 1 mg/L BAP, 2,1 g/L Phytigel ve %3 sukroz ile iyi bir sürgün gelişimi ve çoğaltımını gerçekleştirmiştir.

Mangal ve ark. (2012), embriyo kültürü yoluyla bitki rejenerasyonu ve elit genotiplerin çoğaltılması için daha yüksek ve daha hızlı bir oran elde ederek döllenme sorunlarının üstesinden gelmek için bir çalışma da cevizin embriyo kültürü yoluyla bitki rejenerasyonu için bir protokol elde etmiştir. En iyi gelişim, 3 µM BAP ve 5 µM IBA ile takviye edilmiş DKW ortamında %94,66 oranında olduğu saptanmıştır.

Şirin (2014), Kaman 1 ceviz çeşidinde yaptığı mikroçoğaltım çalışması ile en iyi sonucun 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA ya da 1 mg/L IBA ile elde edilebileceğini bildirmiştir.

Zarghami ve Salari (2015) yaptıkları çalışmada, Chandler, Hartely ve Z60 ceviz çeşitleriyle mikroçoğaltım ve köklendirme çalışması yapmıştır. Sürgün çoğaltım için 1,5 mg/L BAP ve 0,01 mg/L IBA içeren B.B.D kullanılarak en iyi sonucu elde etmiştir.

Moreno ve ark. (2015), phloroglucinol, karbon ve FeEDDHA kombinasyonlarının kullanılmasının mikroçoğaltım üzerinde gelişimi artıran ve kronik semptomları önlediğini belirtmiştir.

Kepenek ve Kolağası (2016) tarafından yapılan çalışmada, Chandler, Kaplan-86 ve Yalova-1 ceviz çeşitlerinin sürgün uçlarını kullanarak ceviz için rejenerasyon çalışmaları gerçekleştirmiştir. Yapılan çalışmada en yüksek ortalama sürgün oranı 5 mg/L TDZ + 2,5 mg/L IBA ortamından elde edilmiştir.

Tuan ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, farklı melez ceviz çeşitlerinde DKW ve Ruguni besin ortamları ve Oxoid agar, Kobe agar, Gelrite gibi katılaştırıcı maddeler kullanılarak denemeler kurmuştur. Ayrıca besin ortamlarına farklı konsantrasyonlarda BAP ilave edilmiştir. En iyi sürgün gelişiminin Ruguni besin ortamında ve Kobe agar ile gerçekleştirildiğini çalışma sonunda belirtmiştir.

Sekmen ve ark. (2017), ceviz'in *in vitro* koşullarda çoğaltım protokolü oluşturabilmek için, Chandler çeşidinin sürgünlerinde bir göz bulunan nodal segmentleri eksplant olarak kullanmıştır. DKW, DKW-C ve MS besin ortamları içerisinde ise üçer farklı hormon konsantrasyonları ile 9 farklı kültür oluşturmuştur. Yapılan çalışmada en iyi mikroçoğaltım sonucunun, DKW-C besin ortamı içerisinde 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA + 1 mg/L GA₃ hormonları ile aktif kömür ilavesi yapılan ortamda %45 oranında sürgün gelişiminin olduğunu belirtmiştir.

2.3 Köklendirme ve Alıştırma (Aklimatizasyon)

Odunsu bitkilerin *in vitro* koşullarda köklendirme işlemi otsu bitkilere göre oldukça zor olduğu bilinmektedir. Odunsu bitkiler arasında yer alan cevizde yapılan çalışmalarda da köklendirme işleminde çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır. Köklendirme ve alıştırma (aklimatizasyon) işleminde yapılan çalışmalara aşağıda yer verilmektedir.

Grusella ve ark. (1990), ceviz bitkisinde mikroçoğaltım ile geliştirilen sürgünlerin köklendirme çalışmalarında 1 mg/L IBA uygulamasının daha iyi sonuç verdiği belirtilmiştir.

Lievens ve ark. (1989) tarafından, rejenerasyon çalışmasından elde edilen mikro sürgünleri IBA'ya batırılarak 10 gün boyunca karanlık ortama bırakılması sonucunda %30 oranında köklenmeye ulaşıldığı belirtilmiştir.

Grusella ve Poxus (1990) ceviz bitkisinde yaptıkları mikroçoğaltım çalışmasında, yeterli uzunluğa ulaşan sürgünlerin köklendirilmesi için DKW besin ortamının en uygun içeriğe sahip olduğu belirtilmiştir. Köklenmenin DKW ortamına 2 mg/L IBA ve 1 mg/L riboflavin ilave edilip 10 gün karanlıkta bekletilmesiyle elde edildiği bildirilmiştir.

Heloir ve ark. (1996) ceviz bitkisinin *in vitro* koşullarda köklenmesi üzerine oksin ve poliaminlerin etkisini araştırmıştır. Sürgünler IAA'lı ortamda 48 saat karanlık koşullarda bırakıldığında etkisinin daha fazla olduğunun fakat daha sonra gelişimin durduğu belirtilmiştir.

Kök çıkışı olan sürgünlerin oksinsiz torf + pellt karışımına aktarılarak gelişiminin devam ettirilmesinin olumlu sonuçlanacağı belirtmiştir.

Sanjuan (1995)'ın yaptığı çalışmada oksinler ve sıcaklık arasında önemli bir etkileşim olduğunu görmüştür. 25°C'de köklenmenin 28°C'ye göre daha iyi olduğunu tespit etmiştir. Uygun sıcaklık ve oksinlerin varlığında besin ortamına eklenecek MeJA'nın gelişim için önemli etkisinin olduğu bildirilmektedir.

Dolcet-Sanjuan ve Claveria (1996), kök uzatma ortamındaki sukroz oranının düşürülmesiyle fotosentetik kapasitenin uyarılmasıyla toprağa alışma sırasında bitkilerin hayatta kalma oranının daha yüksek olduğunu belirtmiştir.

Scaltsoyiannes ve ark. (1997), gelişen sürgünlerin köklendirilmesi için DKW besin ortamında 40 g/L sukroz ve 4,4 µM IBA kullanarak 6 gün karanlıkta bekletmesiyle gerçekleştiğini belirtmiştir.

Puthra ve ark. (1998), mikroçoğaltım çalışması gerçekleştirilen sürgünlerin köklendirilmesi için IBA içeren (2,5 mg/L) yarı katı WPM ortamında maksimum köklenme (%80) oluşturmuştur.

Onay (2000) Antep fıstığında yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında mikro sürgünleri köklendirilme çalışması yapmıştır. Köklendirme çalışmasında en fazla sayıda kök, 9,8 µM IBA ilave edilen MS besin ortamından elde etmiştir. Köklü bitkileri, torf ve perlite 4-5 hafta dış koşullara alıştırmaya yaptıktan sonra sera koşullarına transfer etmiştir. Bitkilerin yaklaşık %50'si dış koşullara alıştırmaya işleminden sonra büyümeye devam ettiğini belirtmiştir.

Kamali ve ark. (2001) GF-677 anaçlarının köklendirme işleminde, besin ortamına 0,3 mg/L NAA ile 1,6 mg/L thiamine içeren ortamdan kök elde etmiştir. 7 günlük karanlık uygulamasının ise köklenme için olumlu sonuç verdiğini belirtmiştir.

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

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

Özkaynak ve Samancı (2005), mikroçoğaltımla elde edilen *in vitro* bitkilerin, *ex vitro* koşullara alıştırılmasında ki ani hava, su, nem, sukroz gibi değişikliklerin bitkilerde stres oranını artırdığını belirtmiştir. Başarılı bir alıştırma işlemi için bitkinin fizyolojik değişiklikleri dikkatle izlenerek yapılması gerektiği bildirmiştir.

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

Tilkat (2009) Antep fıstığı bitkisinden elde edilen mikro sürgünlerin köklendirilmesi için, 2 mg/L IBA ile desteklenen ortamda en iyi kök gelişimi sağlandıktan sonra köklü bitkiler, toprak, kum ve torf karışımı (1: 1: 1) ile doldurulmuş kaplara aktarılmıştır. Büyüme odasından ayrılarak bir seraya transfer edilmiştir.

Sevgin (2010) bademde yaptığı çalışmada köklendirme için mikro sürgünlerin bir hafta karanlıkta bırakılması köklenmeyi olumlu etkilemediği görülmüştür. En iyi köklenme, GF-677 (badem x şeftali) anacında 1 mg/L IBA içeren ortamda olduğu bildirmiştir.

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

Al-Mizory ve Mayi (2012) cevizde yaptıkları rejenerasyon çalışmasında elde edilen sürgünlerin köklenmesi %60 oranında 1 mg/L IBA içeren MS ortamında olduğu belirtilmiştir.

Moreno ve ark. (2015) melez ceviz çeşitlerinde yaptıkları çalışmada FeEDTA ile FeDDHA arasında ki farkları ve sukrozun köklenme oranına, kök uzunluğuna etkilerini araştırmıştır. FeEDTA ve 40-60 mg/L sukroz kullanımının köklenmeyi artıracığı belirtilmiştir.

Nas ve ark. (2013) badem bitkisinde yaptıkları çalışmada, tüm odunsu bitkilerde olduğu gibi köklenme aşamasının uzun sürdüğü ve otsu bitkilere göre daha zor olduğu belirtmiştir. Köklenme için en iyi sonucun alt kültür sayısının artmasıyla alındığı belirlenmiştir.

Şirin (2014) ceviz çeşitlerinde yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında, köklendirme için 4 mg/L IBA uygulamasının köklenme için başarısız olduğunu belirtmiştir.

Kepenek ve Kolağası (2016), elde edilen mikro sürgünlerin en iyi köklenmenin 5 mg/L IBA içeren besin ortamlarından elde edildiği bildirilmiştir.

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

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

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

İn vitro koşullarda mikroçoğaltım için kullanılacak eksplant materyali Vlach, Chandler ve Yalova-1 fidanlarından alınmıştır (Şekil 3.1). Vlach anacı üzerine aşılı Chandler fidanları Ceviz Üretim ve Pazarlama A.Ş. tarafından Yalova-1 çeşidi ceviz fidanı ise Edirne merkezden tedarik edilmiştir. Kullanılan eksplant koltukaltı sürgünlerinden elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Eksplant kaynağı olarak a ve b; Vlach anacı üzerine aşılı Chandler fidanları, c; Yalova-1 fidanı (Anonim 2018c)

3.1.2 Besin ortamı ve *in vitro* kültür koşulları

Yapılan çalışmalarda, %3 sukroz ilave edilerek hazırlanan MS besin ortamı ve köklendirme işleminde modifiye edilerek yeniden hazırlanan MS (Murashige ve Skoog 1962) besin ortamları kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Besin ortamları hazırlanırken saf su kullanılmış, ortam pH'sı bitkinin sağlıklı gelişim göstermesi için 1 N NaOH ve 1 N HCl ile istenilen en

uygun değer olan 5,6-5,8 aralığında ayarlanmıştır. Hazırlanan besin ortamlarına en son katılaştırıcı olarak %0,65 oranında Plant Agar ilave edilip 121°C’de 1.1 atm basınç altında 20 dakika otoklavlanmıştır. Besin ortamlarının içine otoklavlanlandıktan sonra çalışma için gerekli olan oksin, sitokinin ve giberrellik asit ilave edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin sterilizasyonu için mikro filtre kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Besin ortamlarında bulunan makro-mikro elementler ve vitaminler

Mikro Elementler	MS (mg/L)	Modifiye MS (mg/L)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
FeNaEDTA	36,70	36,70
H ₃ BO ₃	6,20	6,20
KI	0,83	0,83
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	16,90
	0,25	0,25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	8,60	17,00
ZnSO ₄ .7H ₂ O		
Makro Elementler		
CaCl ₂	332,02	332,02
KH ₂ PO ₄	170,00	265,00
KNO ₃	1900,00	1900,00
MgSO ₄	180,54	361,49
NH ₄ NO ₃	1650,00	1650,00
Vitaminler		
Glisin	2,00	2,00
Myo-Inositol	100	100
Nikotinik asit	0,50	0,50
Pyridoksine HCl	0,50	0,50
Tiamin HCl	0,10	0,10

Bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanılmadan önce stok solüsyonları 1/1 oranında hazırlanmıştır. Her B.B.D. farklı çözücüler ile çözdürüldükten sonra steril saf su ile seyreltilip vortekslendikten sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir. Stok solüsyonlar +4°C’de buzdolabında saklanmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Stok solüsyonlarda kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin çözücüleri ve seyreltilmesi

Bitki Büyüme Düzenleyicileri	Çözücü	Seyreltme
Sitokininler		
BAP (6-Benzilaminopürin)	NaOH	Steril Saf Su
TDZ (Thidiazuron)	DMSO	Steril Saf Su
Oksinler		
NAA (α -Naftalinasetik asit)	NaOH	Steril Saf Su
IBA (İndol-3-bütirik asit)	Ethanol ya da NaOH	Steril Saf Su
2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asit)	Ethanol ya da NaOH	Steril Saf Su
Giberellinler		
GA ₃ (Giberellik asit A3)	Ethanol	Steril Saf Su

3.2 Yöntem

3.2.1 Rejenerasyon için eksplant alımı ve sterilizasyon

Yapılan çalışmada ilk olarak ceviz bitkisinin üç farklı çeşidi olan Vlach, Chandler, Yalova-1 fidanların tepeden itibaren 1.-3. koltukaltı tomurcukları alınıp, yaprak vb. gibi fazlalıklardan temizlenmiştir (Şekil 3.2). Daha sonra ön sterilizasyon işlemi için antibakteriyel sıvı sabun ve fırça yardımıyla temizlenerek akan musluk suyu altında 2-3 saat kadar bekletildikten sonra eksplantlar %70'lik etil alkolde 2-3 dakika bekletilip saf su ile durulanmıştır. İkinci aşamada yapılan sterilizasyon işlemleri laminar hava akışlı steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Eksplantlar %70'lik Actijen ile ((Natural Protection System, NPS Biyosidal) %100 doğal su bazlı ve % 0,015 aktif klor içeren sıvı, yer ve yüzey dezenfektanı) 5 dakika boyunca steril edildikten sonra 3 kez 5'er dakika boyunca steril saf su ile durulanmıştır. Bir diğer sterilizasyon çalışmasında eksplantlar % 30 ve % 50 'lik NaOCl ile 5 dakika boyunca steril edilerek 3 kez 5'er dakika steril saf su ile durulanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. Koltukaltı eksplantlarının fidanlardan alınma aşaması



Şekil 3.3. Steril kabin içerisinde eksplantların yüzey sterilizasyon işlemi

3.2.2 Eksplantların rejenerasyon için hazırlanan ortamlara aktarılması

Koltuk altı tomurcuklarından gelişen sürgünlerin mikroçoğaltımı için %0,44 MS (Murashige and Skoog 1962), %3 sukroz, %0,01 aktif kömür eklenerek besin ortamı saf su ile hazırlanmış ardından pH 5,8'e ayarlanmıştır. En son besin ortamına katılaştırıcı madde olarak % 0,65 Plant Agar eklenmiştir. Hazırlanan besin ortamı 121°C'de 1.1 atm basınç altında 20 dakika boyunca otoklavda steril edilmiştir.

Hazırlanan kültür ortamlarına BAP, TDZ, NAA, IBA, 2,4 D, GA₃ bitki büyüme düzenleyicileri eklenerek yedi farklı kültür ortamı hazırlanmıştır (Çizelge 3.3). Mikroçoğaltım için hazırlanan yedi ortam R-1, R-2, R-3, R-4, R-5, R-6, R-7 olarak adlandırılmıştır. *In vitro* kültürler 3 tekerrürlü olmak koşuluyla 21 gün boyunca kültüre alınmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. Ceviz bitkisinden alınan koltuk altı eksplantlarının *in vitro* kültür görünümü

Çizelge 3.3. Mikroçoğaltım aşamasında kullanılan ortamlarda ki B.B.D oranları

Ortamlar/ B.B.D.	BAP	TDZ	NAA	GA ₃	2,4-D
R-1	2 mg/L	-	0,5 mg/L	0,2 mg/L	-
R-2	1,5 mg/L	-	0,5 mg/L	0,2 mg/L	-
R-3	-	2 mg/L	1 mg/L	0,2 mg/L	-
R-4	-	1,5 mg/L	1 mg/L	0,2 mg/L	-
R-5	-	-	0,5 mg/L	-	1 mg/L
R-6	-	-	1 mg/L	-	1 mg/L
R-7	-	-	0,3 mg/L	-	0,5 mg/L



Şekil 3.5. Eksplantların kültüre alınma işlemi

Bütün kültür ortamına aktarılan eksplantlar beyaz ve kırmızı led ışıkları altında 16 saat ışık 8 saat karanlık fotoperiyodunda $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığında tam kontrollü bitki büyütme odalarında geliştirilmiştir (Şekil 3.4).

3.2.3 Köklendirme

Köklendirme çalışması 2 cm ve daha uzun olan sürgünlerde gerçekleştirilmiştir. Köklendirme çalışması 2 farklı besin ortamında gerçekleştirilmiştir. MS (Murashige and Skoog 1962) besin ortamı ve Modifiye olarak hazırlanan %0,44 MS %3 sukroz, 0,1 mg/L demir şelat-EDDHA ve %0,65 Plant Agar ilave edilerek hazırlanan besin ortamı 121°C 1.1 atm basınç altında 20 dk boyunca steril edilmiştir. Besin ortamlarının içerisine steril kabinde 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L IBA ilave edilmiştir (Çizelge 3.4). Sürgünler besin ortamına 3 tekerrürlü olacak şekilde aktarılmıştır. Kök kültür ortamları dört gün karanlıkta bekletildikten sonra kırmızı beyaz led ışık altında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyodunda 24±2°C sıcaklığında bitki büyütme odalarında bekletilmiştir.

Çizelge 3.4 Köklendirme çalışmasında kullanılan besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri

MS Besin Ortamı	Modifiye MS Besin ortamı
(K-1) 1 mg/L IBA	(A) 1 mg/L IBA
(K-2) 1,5 mg/L IBA	(B) 1,5 mg/L IBA
(K-3) 2 mg/L IBA	(C) 2 mg/L IBA
(K-4) 3 mg/L IBA	(D) 3 mg/L IBA
(K-5) 4 mg/L IBA	(E) 4 mg/L IBA

3.2.4 Alıştırma (Aklimatizasyon)

Köklenen sürgünler saf su ile yıkandıktan sonra 1:1 oranında steril torf-perlit karışımı içeren beherlere dikilmiş ve sulanmıştır. Nemini koruması için beherin üstü streç film ile sarılarak hava girişi engellenmiştir. Streç film birer gün arayla delinerek hava girişi yavaş yavaş arttırılmıştır. 24 günün sonunda köklü bitkiler tamamen açılıp saksılara aktarılmıştır.

Kök oluşmayan sürgünler ise; 500 ve 1000 ppm IBA solüsyonunda 15 sn bekletilmiştir. Ardından 1:1 oranında steril edilmiş torf-perlit karışımı içeren beherlere dikilmiştir. Nem kaybı olmaması için streçle sarılmıştır. Birer gün arayla hava girişi yavaş yavaş arttırılmıştır. 14 gün boyunca sürgün canlılığı ve köklenme oluşumu kontrol edilmiştir.

3.2.5 Rejenerasyon çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi

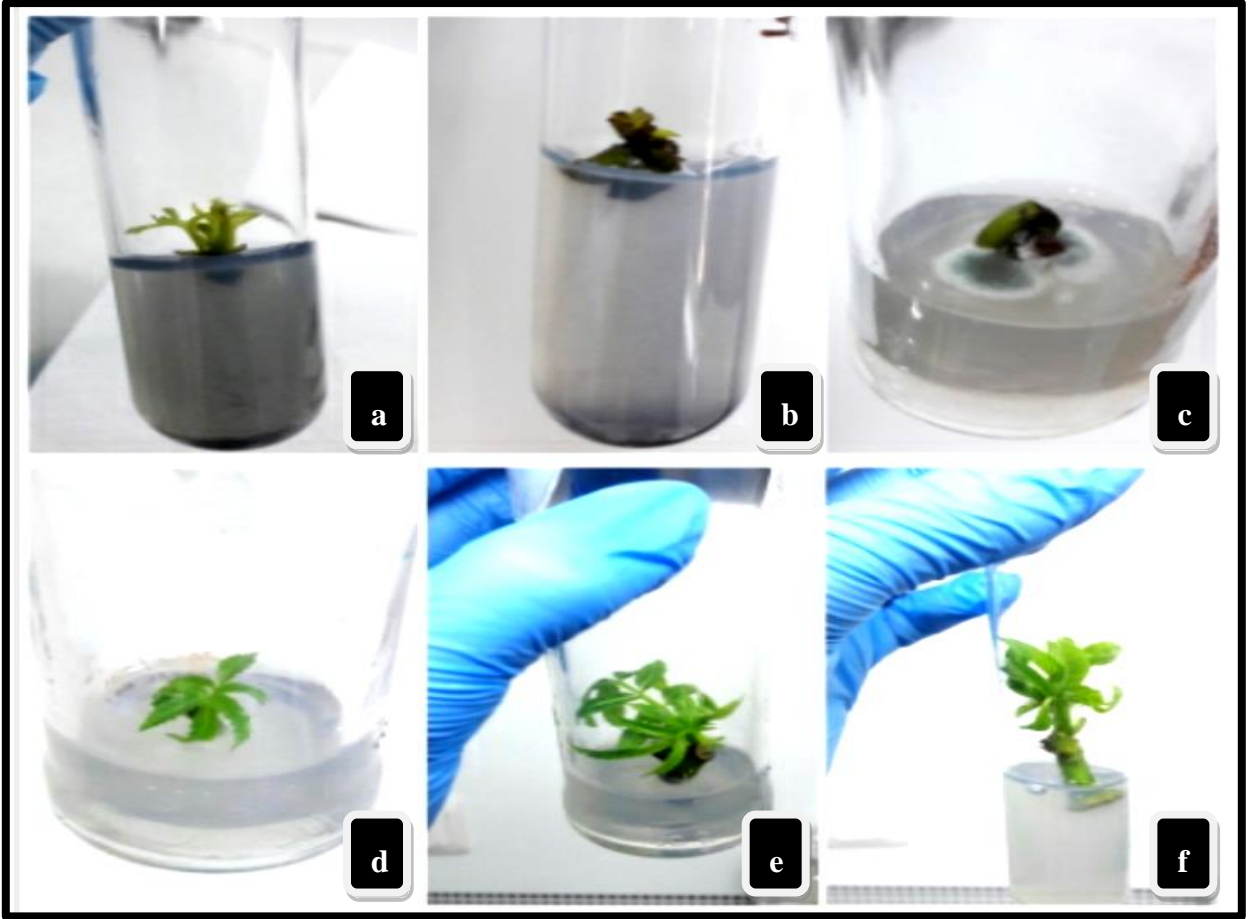
Ceviz bitkisinin üç farklı eşidinde (Vlach, Chandler, Yalova-1) rejenerasyon ortamlarının farklı kombinasyon ve dozlarına göre denemeler 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) ver. 22 istatistik programında One-Way Anova post hoc testlerinden Duncan testi ile yapılmıştır (Snedecor ve Cochran 1982).

4. BULGULAR

4.1 Yüzey Sterilizasyon Bulguları

Üç farklı ceviz (Vlach, Chandler, Yalova-1) çeşidinden alınan koltukaltı (apikal meristem) eksplantlarının yüzey sterilizasyonu için öncelikle eksplant yüzeyi antibakteriyel sıvı sabun ile yıkandıktan sonra 2-3 saat devamlı akan musluk suyunda durulanmıştır. Ardından %70'lik etil alkole 30-40 saniye maruz bırakılmıştır. Yüzey sterilizasyonu için steril kabinde manyetik karıştırıcı kullanılarak 500 rpm'de Actijen ve NaOCl kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Actijen temizlik solüsyonu ile %70 ve %90 dozlarında 5 dakika süre ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Sodyum hipoklorit kullanılarak ise %30 ve %50 dozlarında 5 dakika süre ile yüzey sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra her iki sterilizasyon aşaması 3 kez 5'er dakika boyunca steril saf su ile durulanmıştır. Sterilizasyon sonuçları 7 ile 14 günlük süre aralığında kontaminasyon oranı olarak 7-14 gün arası tüplere aktarılan eksplantlarda oluşan kontaminasyon ve kararma miktarı belirlenerek kontaminasyon oranı belirlenmiştir. (Şekil 4.1.)

NaOCl ile gerçekleştirilen sterilizasyon işleminde kararma ve kontaminasyon oranı Actijen'e oranla daha yüksek seviyede olmuştur. Actijen solüsyonunda ise %90-5 dakika süreyle yapılan sterilizasyon işleminde kararma oranının fazla olmasından dolayı çalışmaya Actijen solüsyonu ile %70-5 dakika süresi ile devam edilmeye karar verilmiştir.



Şekil 4.1. NaOCl uygulamasında kararan ve kontamine olan eksplantlar (a,b,c) ile actijen uygulamasında gelişen eksplantlar (d,e,f)

4.2. Mikroçoğaltım Çalışması Bulguları

Sterilizasyon aşamasından sonra sağlıklı olan Vlach, Chandler ve Yalova-1 çeşitlerinden alınan eksplant sayısı az olduğu için eksplantlar işaretlenerek ancak bir arada (ayırılmadan) sürgün rejenerasyon ortamlarına aktarılmıştır. Bu aşamada koltuk altı tomurcuklarından gelişen sürgünlerin mikroçoğaltımı için %0,44 MS, %3 sukroz, %0,01 aktif kömür eklenerek besin ortamı manyetik karıştırıcıda saf su ile hazırlanmıştır ve ardından pH 5,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra ortama katılaştırıcı madde olarak %0,65 Plant Agar eklenmiştir. Hazırlanan besin ortamı 121°C'de 1.1 atm basınç altında 20 dakika boyunca otoklavda steril edilmiştir.

Hazırlanan kültür ortamlarına (R-1, R-2, R-3, R-4, R-5, R-6, R-7) bitki büyüme düzenleyicileri eklenerek yedi farklı kültür ortamı hazırlanmıştır. Bu tez çalışmasında rejenerasyon aşamasında yapılan analizler çeşit üzerinden değil farklı bitki büyüme düzenleyicileri üzerinden

yapılmıştır. Üç farklı ceviz çeşidinden alınan eksplantlar karışık bir şekilde 3 tekerrürlü olmak koşuluyla 21 gün boyunca kültüre alınmıştır. 21 günlük kültürün sonunda vlach, chandler ve Yalova-1 çeşitleri arasında regenerasyon açısından farklılık görülmemiştir her üç çeşitten 7 farklı bitki büyüme düzenleyici içeren kültür ortamına alınan eksplantlarda; eksplant başına gelişen sürgünler, sürgün oluşum yüzdesi, sürgün uzunluğu ortalaması, eksplant başına yaprak sayısı ortalaması olarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1).

Eksplant Başına Sürgün Sayısı Ortalaması: Duncan testi sonucuna göre eksplant başına sürgün oluşum sayısı %0,00 ile %2,36 arasında değişmiştir. Eksplant başına en az sürgün oluşum sayısı R-5 R-6 besin ortamlarında gözlemlenmiştir. Eksplant başına en fazla sürgün oluşum sayısı R-3 besin ortamından elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Eksplant başına sürgün sayısı

Sürgün oluşum Yüzdesi : Sürgün oluşumu %0,00 ile %61,06 arasında değişmiştir. Sürgün oluşum yüzdesi en yüksek R-3 besin ortamından elde edilmiştir.

Sürgün Uzunluğu Ortalaması: Sürgün uzunlukları %1,06 ile %2,36 arasında değişim göstermiştir. Ancak daha sonra kültür ortamında uzamaya devam etmiştir (Şekil 4.2). En kısa sürgünler R-1, R-2 ve R-3 besin ortamlarından elde edilirken, en uzun sürgün ise R-4 besin ortamından elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Ceviz bitkisinden elde edilen sürgün uzunlukları a; Chandler, b; Vlach, c; Yalova-1

Eksplant Başına Yaprak Sayısı Ortalaması : %2,22 ile %5,02 arasında değişim göstermiştir. En az yaprak sayısı R-2 besin ortamından elde edilirken en fazla yaprak sayısı R-3 besin ortamından elde edilmiştir.

Çizelge 4.1 R-1, R-2 , R-3, R-4 , R-5, R-6, R-7

Uygulama (mg/L)	E.B.S.S.O.**	S.O.Y.**	S.U.O.*	E.B.Y.S.O**
R-1	1,53 ± 0,50 a	33,30 ± 16,70 b	1,70 ± 0,26 a	3,75 ± 1,08 ab
R-2	1,0 ± 0,86 ab	22,20 ± 19,22 bc	1,06 ± 0,92 ab	2,22 ± 1,95 bc
R-3	2,36 ± 0,32 a	61,06 ± 9,58 a	1,93 ± 0,11 a	5,02 ± 0,54 a
R-4	1,83 ± 1,60 a	16,63 ± 16,65 bc	2,36 ± 2,12 a	3,17 ± 2,80 ab
R-5	0 ± 0,00b	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 c
R-6	0 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 c
R-7	0 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 c	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 c
(F)	p=0,004	p=0,000	p=0,015	p=0,002

** p≤0,01, * p≤0,05

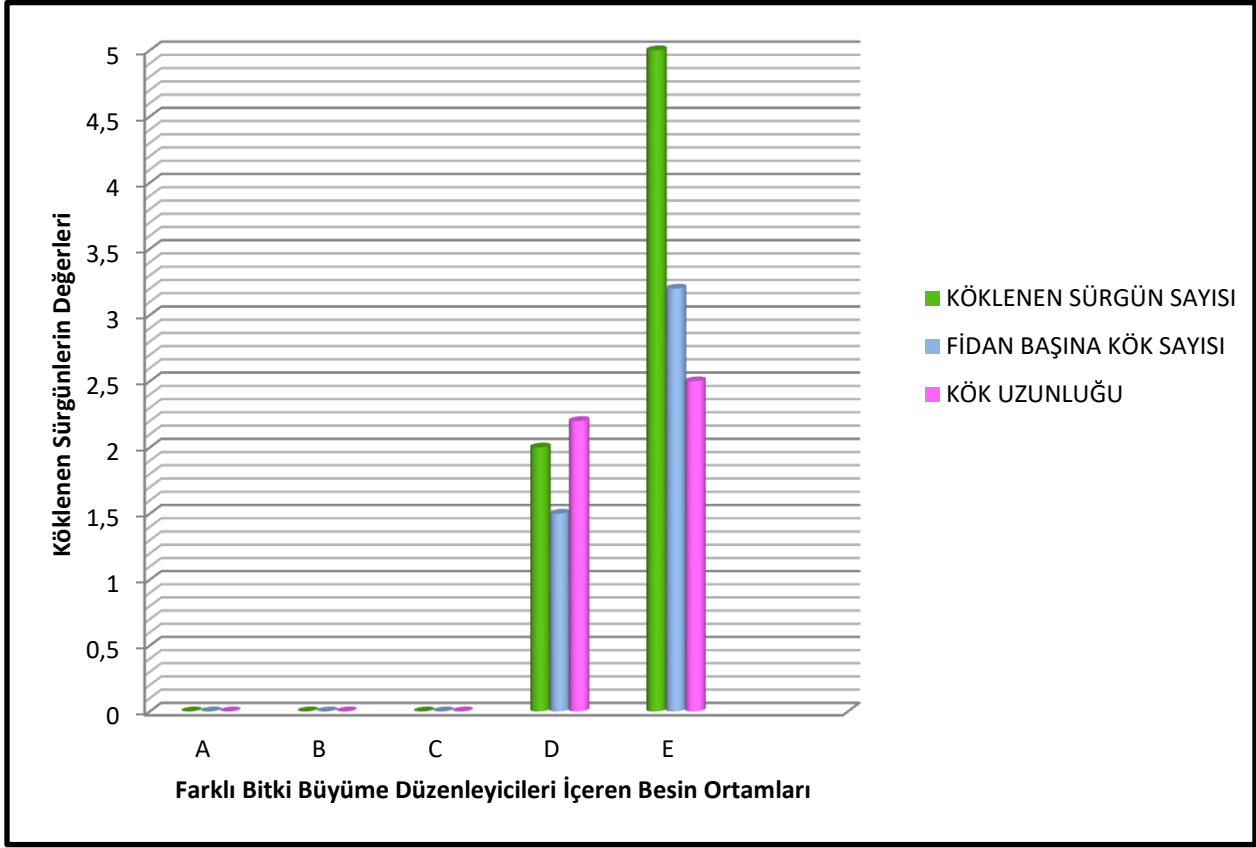
Not: E.B.S.S.O.; Eksplant başına sürgün sayısı ortalaması, S.O.Y.; Sürgün oluşum yüzdesi, S.U.O.; Sürgün uzunluğu ortalamaları, E.B.Y.S.O; Eksplant başına yaprak sayısı ortalaması

4.3 Köklendirme

In vitro şartlarda sürgün rejenerasyonunun sağlandığı besin ortamlarında köklenmeyi sağlamak özellikle odunsu bitkilerde mümkün olmamaktadır. Odunsu bitkilerde en büyük problemlerden biri köklenme sorunudur ve genelde sürgünler uzun süre içinde köklenmektedir. Bu nedenle sürgünlerin sitokin içerermeyen, fakat köklenmeyi teşvik edici B.B.D (IBA, NAA, IAA gibi) bulunduğu ortamlara transfer edilmesi gerekmektedir. Odunsu bitkilerin köklendirilmesinde besin ortamının içeriğindeki bitki büyüme düzenleyicilerinin önemi kadar besin ortamlarının içeriğinde ki makro ve mikro elementler ile vitaminlerin miktarı da oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle köklendirme ortamında kullanılacak besin ortamı değiştirilerek yeni bir modifiye olarak hazırlanan MS ortamı ve MS besin ortamını kullanılmıştır. 3 farklı çeşit Vlach, Chandler ve Yalova-1 çeşitlerinin lateral tomurcuk (koltukaltı sürgünleri) eksplantlarından rejenere olan sürgünler 1- 2 cm uzunluğuna geldiklerinde kesilerek 3 tekerrürlü olacak şekilde 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L IBA ve 0,1 mg/L demir şelat-EDDHA içeren modifiye MS ve MS ortamlarına aktarılmıştır. Her üç çeşidin sürgünlerinden MS besin ortamında köklenme gözlemlenmezken modifiye MS besin ortamında Yalova-1 çeşidinde ilk köklenme belirtileri 6 hafta sonra ortaya çıkmıştır ve sürgünler 3 haftada bir alt kültüre alınmıştır (Çizelge 4.2). Farklı dozlarda kullanılan IBA'nın 6 hafta sonra köklenen sürgünlerin oranına ait verilere göre 3mg/L ve 4 mg/L IBA içeren modifiye MS ortamlarında köklenme gözlemlenmiştir. En yüksek köklenme 4 mg/L IBA içeren modifiye MS ortamında kültüre alınan Yalova-1 çeşidinin sürgünlerde ortaya çıkmıştır (Şekil 4.3). Köklenen sürgün oranı ise %83,3 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Modifiye olarak hazırlanan MS besin ortamında köklendirme sonuçları

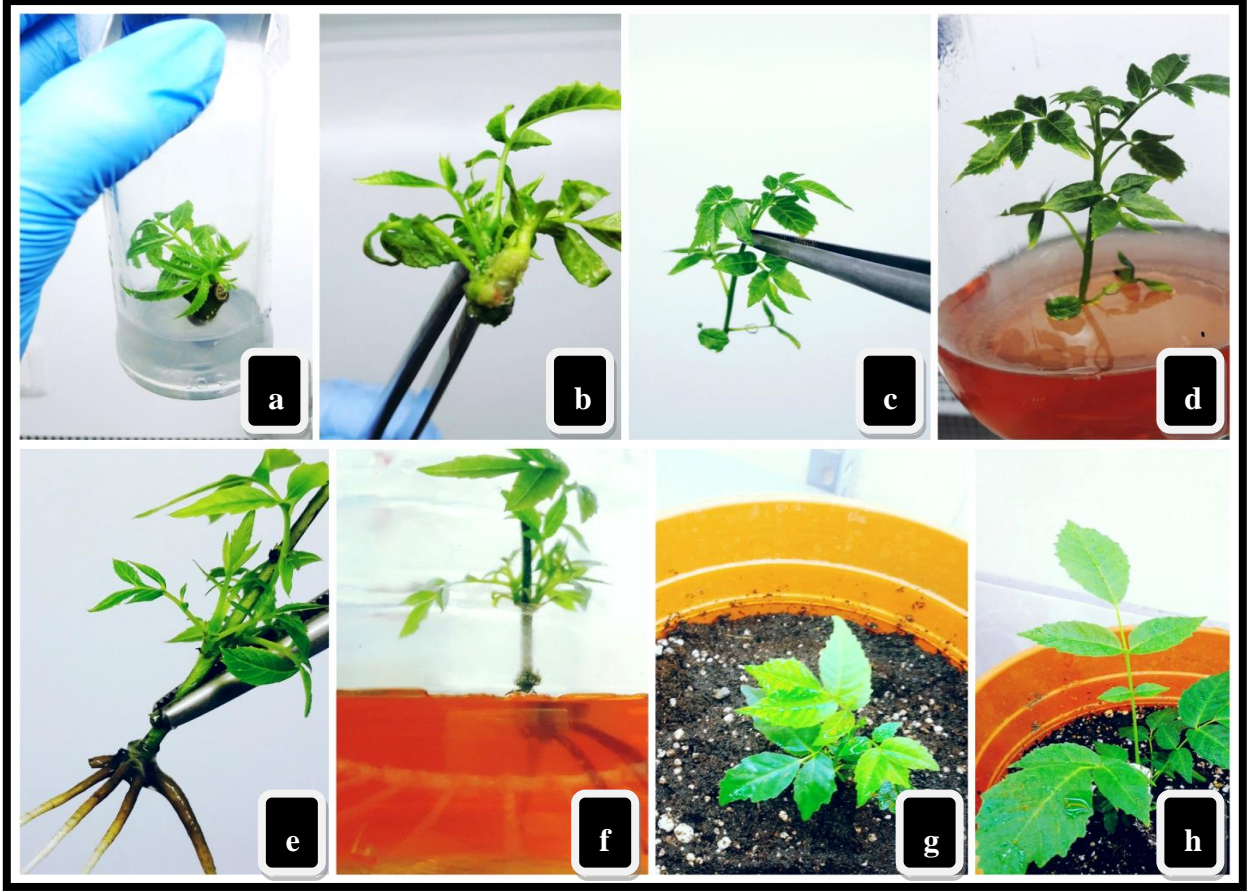
Ortam	Köklenen sürgün sayısı	Kök oluşum yüzdesi	Kök sayısı ortalaması	Kök uzunluğu ortalaması
A-1 mg/L IBA	0	0	0	0
B- 1,5 mg/L IBA	0	0	0	0
C- 2 mg/L IBA	0	0	0	0
D- 3 mg/L IBA	2	%33,3	1,5	2,2
E- 4 mg/L IBA	5	%83,3	3,2	2,5



Şekil 4.4. Modifiye MS ortamlarında ki köklenme oranları; A: 1 mg/L IBA, B: 1,5 mg/L IBA, C: 2 mg/L IBA, D: 3 mg/L IBA, E: 4 mg/L IBA

4.4 Köklenen Sürgünlerin Dış Koşullara Alıştırılması (Aklimatizasyon)

4-7 cm uzunluğunda ceviz mikro fidanları musluk suyu ile yaprak ve köklere zarar vermeyecek şekilde besin ortamından arınıncaya kadar yıkanıp cam beherlerde otaklavda 121°C'de 1.1 atm basıçta 20 dakika boyunca steril edilmiş nemli torf perlit (1:1) karışımına aktarılmıştır. Beherdeki bitkilerin üzeri streçle hava almayacak şekilde sarılıp iklim odasında büyümeye bırakılmıştır. İkinci hafta streç üzerinde delikler açılarak 1 hafta arayla kademeli olarak nem oranı düşürülmüştür. Streç tamamen 28 gün sonunda açılmıştır. Daha sonra bitkiler saksılara aktararak 24±1°C ve %50 nem içeren iklim odasında büyümeye bırakılmış ve 7 bitkiden 5 tanesi sağlıklı olarak gelişime devam etmiştir ve dış koşullara alıştırılmıştır (Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.5. a; kültür tüpünde patlayan tomurcuk (3 haftalık) b; çoğaltım ortamından çıkan sürgünler (3 haftalık) c; gelişen sürgün (3 haftalık) d; kök kültür ortamına transfer edilen sürgün (1 haftalık) e; köklenen sürgün (6 haftalık) f; kök ortamında köklenen sürgün g; alıştırma (aklimatizasyon) aşamasında gelişen bitki (2 haftalık) h; dış koşullara alıştırma aşaması tamamlanmış ceviz (7 haftalık)

5. TARTIŞMA

Ceviz bitkisi, bir evcikli (erkek ve dişi organlar aynı çiçekte) olması, dikogami eğilim göstermesi (erkek ve dişi organlı çiçeklerin ayrı zamanlarda açılması ve olgunlaşması), tozlaşmanın rüzgar ile gerçekleşmesi nedeniyle heterezigot (genetik yapının farklı olması) yapıdadır. Bu sebepten dolayı tohumdan gelişen yeni bitki ana bitkinin özelliklerini taşımamaktadır (Şen 1986). Bu da istenilen tür ve çeşitte ceviz fidanı çoğaltımını engellemektedir. Bu nedenle yapılan kaynak incelemeleri sonucunda istenilen hatların hızlı ve hastalıksız olarak klonal bir şekilde üretilmesi oldukça önemlidir ve istenilen özelliği taşıyan fidan yetiştirmek için *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım teknikleri başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

5.1. Yüzey Sterilizasyonu

Bu çalışmada, bitkisel materyal olarak kullanılan fidanlardan alınan eksplantların yüzey sterilizasyonu için %70 ve %90 konsantrasyonda Actijen ile 5 dakika ve %30 - %50 konsantrasyonda 5 dakika süreyle NaOCl kullanılmıştır. Ancak en iyi sterilizasyon sonucunun %70'lik Actijen solüsyonundan elde edilmiştir. Buna benzer olarak Pehlivan ve ark. (2017), *Vitis vinifera* sürgün uçlarına uyguladığı sterilizasyon işleminde %10 Actijen' e birkaç damla Tween-20 ekleyerek 5 ve 10 dakika boyunca sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ardından sürgünler 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bir diğer çalışmada, Gotea ve ark. (2012) Chandler, Franquette ve Jupanesti çeşitlerinde sterilizasyon için eksplantları deterjanlı su ile yıkayıp ardından alkolle muamele ettikten sonra %5 NaOCl çözeltisi ile steril edip sonrasında steril saf su ile durularak başarılı bir sterilizasyon protokolü bildirmiştir. Başka bir çalışmada ise Fidancı (2005), Şebin ve KR-2 ceviz çeşitlerinden alınan ekplantların sterilizasyonu için öncelikle antibakteriyel sabunla tomurcuklar yıkayıp durulanana kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Ardından %10'luk NaOCl içerisine birkaç damla tween-20 damlatılıp 20 dakika boyunca sterilizasyon gerçekleştirilerek 3-4 kez steril distile su ile durulanıp sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Bir diğer çalışmada HgCl₂ ile sterilizasyon yöntemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Dong ve ark. (2007), ceviz eksplantlarının %70'lik etil alkolde bir süre bekletilen ekplantlar ardından % 0,1 HgCl₂ ile sterilizasyon işlemi tamamlanıp ardından steril distile su ile durulandığı bildirilmiştir. Fu Yulan ve ark. (2004), *Carya illinoensis* (Pikan cevizi) sürgün uçları kullanılarak gerçekleştirdiği mikroçoğaltım çalışmasında sterilizasyon yönteminde öncelikli olarak %70 etil

alkole batırılıp sonrasında 15 dakika boyunca %0,2 HgCl ile (birkaç damla Tween 20 ilave edilerek) karıştırılıp ve daha sonra 10 kez steril saf su ile durulanmasıyla elde edilmiştir. Eksplantlar karanlık ortamda ve besin ortamına aktif kömür ilave edilerek, kararma engellenmiştir. Penisilin ve streptomisin besin ortamı içerisine ilave etmenin kontaminasyon oluşmasını engellendiği bildirilmiştir. Nas (2013) bademde sterilizasyon işleminin %1 aktif klor içeren NaOCl içine 10 damla tween-20 ilave ederek 15 dakika boyunca sterilizasyon işlemini tamamlayıp 3 kez steril saf su durulandıktan sonra başarılı bir sterilizasyon yönteminin optimize edildiğini bildirmiştir.

5.2 *In Vitro* Koşullarda Mikroçoğaltım

Ceviz (*Juglans regia* L.), çerezlik ve kereste sanayisinde kullanılan önemli bir çerezlik odunsu bitkidir. Çerezlik olarak besin değerinin yüksek olması, kerestecilik olarak ise sert ve dayanıklı odunsu özelliğinden dolayı tercih edilmektedir. Bu gibi çerezlik ve kereste ihtiyaçlarını karşılamak için yeterli miktarda fidan yetiştiriciliğinin yapılması gerekmektedir. Vejetatif çoğaltım teknikleri ise bu konuda başarı sağlamaktadır ve fidan üretiminde yaşanan zorluklar ile uzun sürelerde üretilmesine alternatif bir çözüm haline gelen vejetatif çoğaltım tekniklerinden biri olan *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım çalışmaları hastaliksız ve klonal fidan anacı üretiminde hız kazanmıştır. Ceviz bitkisinin klonal üretiminde bir takım zorluklarından biride odunsu bitkiler otsu bitkilere göre daha zor rejenere olurken ceviz bitkisinde yoğun bir şekilde salgılanan fenolik bileşikler mikroçoğaltım işlemini daha fazla güçleştirmektedir (Karvar 1990). Dünya’da ceviz üretiminde ilk sırada yer alan Çin, 1,785,879 ton üretim yapmaktadır. Ardından A.B.D ve İran gelirken Türkiye 195,000 ton üretim ile dördüncü sırada yer almaktadır (FAO 2016). Türkiye’nin coğrafik konumu ve ikliminin ceviz yetiştiriciliğine elverişli olmasına rağmen üretimde dünyada ilk sıralarda yer almamaktadır. Diğer ülkelerde doku kültürü yöntemlerinden olan mikroçoğaltımla ceviz anacı üretim çalışmaları daha gelişmiş ve hızlı vaziyettedir. Türkiye’nin de klonal ceviz anacı üretimi artırması için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir. Yapılan çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılan koltuk altı tomurcuklarının BAP, IBA, GA₃ bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonları içeren besin ortamında eksplant başına sürgün sayısı ortalaması ve sürgün oluşum ortalaması olarak en yüksek 2 mg/L TDZ, 1 mg/L NAA, 0,2 mg/L GA₃ kültür ortamından elde edilmiştir. En uzun sürgün ise 1,5 mg/L TDZ, 1 mg/L NAA ve 0,2 mg/L GA₃ içeren besin ortamından elde edilmiştir. Ceviz bitkisinin

mikroçoğaltım çalışmalarına bakıldığında Gotea (2012), Jupanesti, Chandler ve Franquette Fars ceviz çeşitlerinin *in vitro* ortamda gelişimi ve çoğaltılması için çalışmalar yapmıştır. Üç tip katılaştırıcı madde ve farklı sitokinin konsantrasyonları kullanılarak en iyi gelişim gösteren besin ortamındaki katılaştırıcı maddenin rolü ve rejenerasyon için sitokinin önemi araştırılmıştır. Phytigel ile katılaştırılan DKW kültür ortamında iyi bir gelişim oranı elde edilmiştir. Çoğaltma aşamasında, DKW kültür ortamına 1 mg/L BAP, 2,1 g/L phytigel ve %3 sukroz ile iyi bir sürgün gelişimi ve çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Buna benzer olarak, Grusella ve ark. (1987) cevizin doku kültürü yöntemi ile çoğaltılması üzerine yaptıkları çalışmada, sürgün oluşumu üzerine farklı sitokinin türleri ve konsantrasyonlarının etkileri araştırmıştır. Çalışmada en iyi sonuç 1 mg/L BAP uygulamasından elde edilmiştir. Gelişim aşamasında elde edilen sürgünleri uzatmak için, farklı konsantrasyonda GA₃ ve fenolik bileşikleri azaltmak için aktif kömür içeren ortamlara aktarılmış ve en iyi sürgün uzunluğu 0,1 mg/L GA₃ içeren ortamdan elde edilmiştir. Bir diğer çalışmada Fidancı (2005), Şebin ve KR-2 ceviz çeşitlerinde üç farklı eksplant kullanmış (meristem, sürgün ucu, nodal segment) ve üç farklı ortamda kültür ortamları oluşturmuştur. Besin ortamı olarak; MS, DKW, WPM ortamları kullanılmıştır. Çalıştığı besin ortamlarında DKW ortamının daha iyi gelişim gösterdiğini belirtmiştir. Sürgün çoğaltımı için ise 1 mg/L BAP ve 0,01 mg/L IBA kullanarak mikroçoğaltımı gerçekleştirmiştir. Yine besin ortamı ve katılaştırıcı ile ilgili Saadat ve ark. (2002) cevizin çoğaltılmasını, üç farklı besin ortamı (DKW, MS, WPM) ve üç farklı katılaştırıcı (Phytigel, Difco Bacto agar ve Phytigel'in bir karışımı ve Difco Bacto agar) ile besin ortamları arasındaki farklılıklar incelenmiştir. Elde edilen sonuçta eksplantların rejenere olma oranı ve gelişim farklılıkları incelenmiştir. Eksplantların gelişimi DKW ortamı, MS ve WPM ortamlarına göre daha iyi sonuç verdiği belirtilmiştir. Phytigel katılaştırıcısının Difco Bacto Agar, Difco Bacto Agar + Phytigel ortamından daha iyi sonuç verdiği de çalışmada belirtilmiştir. Sitokinlerin kombinasyon halinde kullanılmasıyla Al-Mizory ve Mayi (2012) cevizde nodal eksplantları ile, kinetin BAP'dan daha iyi sonuç verdiği kaydedilmiştir. Aynı çalışmada BAP ile Kinetin ve BAP ile NAA'nın farklı kombinasyonları kullanılmış ve 2 mg/L BAP+ 1 mg/L KİN kombinasyonundan en iyi sonuç alınmıştır. Sekmen ve ark. (2017) cevizin *in vitro* koşullarda çoğaltım protokolü oluşturabilmek için, Chandler çeşidinin sürgünlerinden bir göz bulunan nodal segmentler eksplant olarak kullanmıştır. DKW, DKW-C ve MS besin ortamları içerisinde ise üçer farklı hormon konsantrasyonları ile 9 farklı kültür oluşturmuştur. Yapılan çalışmada en iyi mikroçoğaltım sonucunun DKW-C besin ortamı içerisinde 1 mg/L BAP

+ 0,5 mg/L IBA + 1 mg/L GA3 hormonları ile aktif kömür ilavesi yapılan ortamda %45 oranında sürgün gelişimi elde edildiği belirtilmiştir. Nas (2004), fındıkta yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında poliaminlerin sürgün gelişimi ve uzaması üzerine etkilerini araştırmıştır. Yeni gelişen sürgünlerinin tomurcukları, MS ortamında ve DKW besin ortamlarında kültüre alınmıştır. 0,2 mM putresin + 0,2 mM spermidin + 0,05 mM spermin olarak besin ortamına eklemiştir. Ayrıca 6,7 µM, 11,1 µM ve 15,5 µM BA ortamlarında gözlem yapılmıştır. Poliaminlerin hem sürgün başına tomurcuklanmayı hem de sürgün uzamasına güçlü bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. BA'nın etkisin ise daha düşük kaldığı belirtilmiştir. Poliaminlerin kullanıldığı ortamda sürgün uzamasını %83 artış görülmüştür. Sürgün uzunluğu poliaminli ortamda 4,0 cm seviyelerine ulaşırken yokluğunda 2,0 cm civarında kalmıştır. Sonuç olarak; poliaminlerin rejenerasyon oranını yüksek oranda artırdığını ve eksplantların morfolojik yapısını geliştirdiği açıklanmıştır. Yang (1994), Antep fıstığının sürgün uçlarını eksplant olarak kullanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri eklenmiş olan MS ortamı, G ortamı, Gamborg B5 ortamı ve WPM üzerinde kültüre almıştır. MS 0,5 mg/L BA + 0,1 mg/L IBA ile takviye edilmiş ortam diğer ortamlara göre daha iyi sürgün oluşturmuştur. Mneney (2002) Tanzania da kaju (*Anacardium occidentale* L.) elit klon olarak kullanılan AC4 anacını klonal olarak çoğaltmak için mikroçoğaltım çalışmaları yapmıştır. Sürgün çoğalmasını, sürgünün uzamasını ve kök gelişimini etkileyen kültür faktörlerini araştırmıştır. Tam değerlere sahip makro element içeren MS ortamı sürgün çoğalması ve sürgün uzamasında en iyi olduğu bulunmuş ve stok bitkilerinin yaşlarının artması, aksiller tomurcukların filizlenme ve uzamaya yönelik kabiliyetlerinde ciddi düşüşlerin olduğu belirtilmiştir. Altı sitokinin arasından 30 µM uygulanan BAP ve 5 µM ZEA 'nin sırasıyla aksiller sürgün çoğalması ve sürgün uzaması için en iyi sitokinin ve en iyi doz olarak belirlenmiştir. Onay (2000), olgun Antep fıstığı ağaçlarında mikroçoğaltım çalışmıştır. MS ortamında, BAP ile desteklenmiş *Pistacia vera* olgun ağaçlarının nodal bölümlerinden birden fazla sürgün alınarak gerçekleştirmiştir. En çok sürgün çoğaltılması, 8,8 µM BA içeren MS ortamında kültürlenmiş *in vitro* sürgünlerden alınan sürgün uçlarından elde edilmiştir. Benmahioul (2012) yaptığı çalışmada antep fıstığının aksiller tomurcuklarını kullanarak mikroçoğaltımını ve *ex vitro* köklenmesini sağlamıştır. En yüksek sürgün çoğalması, Gamborg B5 vitaminleri içeren ve 4 mg/L BA ile takviye edilmiş MS ortamlarında kültürlenmiş eksplantlardan elde edilmiştir. 2 mg/L meta-topolin (mT) ilavesi uygun morfolojik özelliklere sahip optimum sayıda sürgün üretirken, KIN ilavesinin antepfıstığı sürgün çoğalması için uygun bulunmamıştır. Prando

ve ark. (2014) Avrupa birliği ülkelerinde büyük bir ekonomik değere sahip *Corylus avellana* fındık çeşidi ile yaptığı çalışmada, besin ortamına Hindistan cevizi suyu ekleyerek büyüme ve gelişime etkisi araştırılmıştır. Alınan tekli aksiller tomurcuklar, Hindistan cevizi suyu (%20) BAP, IBA ve GA3 ile zenginleştirilmiş DKW ortamında kültüre alınmıştır. Eksplant başına en iyi tomurcuk, sürgün gelişimi ve uzaması, 2 mg/L BAP, 0.01 mg/L IAA ve 0.5 mg/L GA3 ortamından elde edilmiştir. Hindistan cevizi suyunun çoğalmayı hızlandırıcı olumlu etkisi olduğu belirtilmiştir. Koç (2014) sakız ağacında yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında, 1 mg/L BAP ve 0.3 mg/L GA₃ ortamının maksimum sürgün gelişimine katkı sağlayacağını belirtmiştir. Köse (2015) yaptığı Garnem ve GF-677 anaçlarında yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında, kardeşlenmesini BA ve TDZ bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı dozlarının sürgün çoğaltılması, sürgün uzunluğu ve sürgün sayısı bakımından etkileri MS besin ortamında araştırmıştır. Garnem anacında yapılan rejenerasyon çalışması sonucu en iyi kardeşlenme 20 µM BA ve 6.8 µM TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. GF-677 anacında ise kardeşlenme 5 µM BA ve 2.27 µM içeren ortamdan daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

5.3. Köklendirme ve Alıştırma (Aklimatizasyon)

Odunsu bitkilerde yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında en büyük problem köklendirmedir. Elde edilen mikro sürgünlerin köklendirilmesi zaman alıcı bir süreçtir. Ceviz diğer odunsu bitkilere göre daha zor ve uzun sürede köklenmektedir (Fidancı 2005). Daha önce yapılan çalışmalarda başarısız sonuçlar bulunsa da yapılan araştırmalarda sürgün köklendirme çalışmalarında başarılı sonuçlar da bulunmaktadır. Daha hızlı ve kolay köklendirme yolunu bulmak için de daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Yapılan tez çalışmasında köklendirme için 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L IBA içeren modifiye MS besin ortamlarına aktarılmıştır. İlk köklenme belirtileri Yalova-1 çeşidinde 6 hafta sonra ortaya çıkmıştır. 3 mg/L ve 4 mg/L IBA içeren modifiye MS besin ortamlarında köklenme gözlemlenmiştir. En yüksek köklenmenin ise 4 mg/L IBA içeren modifiye MS besin ortamında kültüre alınan sürgünlerde ortaya çıkmıştır. Köklü sürgünler, cam beherlerde steril edilmiş nemli torf perlit (1:1) karışımına aktarılmıştır. Beherdeki bitkilerin üzeri streçle hava almayacak şekilde sarılıp iklim odasında büyümeye bırakılmıştır. İkinci hafta streç üzerinde delikler açılarak 1 hafta arayla kademeli olarak nem oranı düşürülmüştür. Streç tamamen 28 gün sonunda açılmıştır. Daha sonra bitkiler steril torf perlit (1:1) içeren saksılara aktarılarak 24±1°C ve %50 nem içeren iklim

odasında büyüme bırakılmış ve bitkiler gelişimini tamamladıktan sonra 7 bitkiden 5 tanesi dış koşullara alıştırılmıştır. Yapılan köklendirme çalışmasına benzer olarak Fidancı (2005) yaptığı çalışmada, Şebin ve KR-2 ceviz çeşitlerinden mikroçoğaltımla elde edilen sürgünlerin en yüksek köklenme, kök sayısı, kök uzunluğu ve kök kalınlığı yönünden her iki çeşitte de 4 mg/L IBA dozunda gerçekleştiğini belirlemiştir. Yine benzer olarak Kepenek ve Kolağası (2016), elde edilen mikro sürgünlerde en iyi köklenmenin 5 mg/L IBA içeren besin ortamlarından elde ettiğini bildirmiştir. Daha düşük dozda IBA içeren ortamlardan elde edilen köklenme sonuçları da bulunmaktadır. Al-Mizory ve Mayi (2012) yaptıkları rejenerasyon çalışmasından elde ettikleri sürgünlerin köklendirmesini %60 oranında sağlamıştır. Bu sonuç için 1 mg/L IBA içeren MS ortamının kullanıldığı belirtilmiştir. Kullanılan besin ortamındaki makro ve mikro elementlerin oranının düşürülerek köklenmeye daha fazla teşvik ettiğini belirten çalışmada, Amiri ve Gharati (2011) besin ortamında bulunan makro elementlerin köklenme üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada 1, 1/2, 1/3, 1/5 oranlarında DKW besin ortamı kullanılmıştır. Kök çıkışı ve gelişimi, en düşük makro element varlığında gerçekleştiği bildirilmiştir. Tuan ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada farklı melez cevizlerinde en iyi kök gelişiminin 12 µM IBA içeren DKW ortamına ilave edilen vermikülit+gelrite kültür koşullarında gerçekleştiğini belirtmiştir. Zarghami ve Salari (2015) yaptıkları çalışmada ise köklendirme için farklı IBA konsantrasyonlarını değerlendirmiş ve Chandler çeşidinde 3 mg/L IBA içeren ortamın en iyi sonucu verdiğini bildirmiştir. Bu sonuçların yanında Şirin (2014) yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında, köklendirme için 4 mg/L IBA uygulamasında köklenmenin başarısız olduğunu belirtmiştir. Dong ve ark. (2007) çoğaltılan sürgünlerin köklendirilmesi için ¼ oranında DKW içeren IBA ilave edilmemiş vermikülit ortamının kullanıldığını belirtmiştir. Köklenme oranının ise %60.5 düzeyinde olduğu bildirilmiştir. Tetsumura ve ark. (2002) köklendirme için sürgünlerin, DKW ortamında 25 µM IBA içeren ve vermikülit + gelrite karışımında 5 gün karanlıkta bekletilmesiyle elde edilebileceğini yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada Scaltsoyannes ve ark. (1997) gelişen sürgünlerin köklendirilmesi için DKW besin ortamında 40 g/L sukroz ve 4,4 µM IBA kullanarak 6 gün karanlıkta bekletmesiyle köklenmenin gerçekleşebileceği belirtilmiştir. Nas ve ark. (2013) bademde yaptığı mikroçoğaltım çalışmasında tüm odunsu bitkilerde olduğu gibi köklenme aşamasının uzun sürdüğü ve otsu bitkilere göre daha zor olduğunu belirtmiştir. Köklenme için en iyi sonucun ise alt kültür sayısının artmasıyla alındığı belirtilmiştir. Tilkat (2009) Antep fıstığında yaptığı mikroçoğaltım çalışması sonucunda elde ettiği sürgünlerin

köklendirilmesi için 2 mg/L IBA ile desteklenen ortamda en iyi kök gelişimi sağlandıktan sonra köklü bitkileri toprak, kum ve torf (1: 1: 1) ile doldurulmuş kaplara aktarmıştır. Büyüme odasından ayrılarak bir seraya transfer edildiği belirtilmektedir. Yine Antep fıstığında Onay (2000) mikro sürgünlerin köklendirilmesi için, IBA' nın MS ortamında ilave edilmesiyle elde edilmiştir ve en fazla sayıda kökün 9.8 µM IBA ile yapılan çalışmada oluşmuştur. Köklü bitkiler torf ve perlitte 4-5 hafta alıştırma yapıldıktan sonra sera koşullarına transfer edilmiştir. Bitkilerin yaklaşık %50'si bir yıldan sonra büyümeye devam etmiştir. Kamali ve ark. (2001) GF-677 anacından elde edilen sürgünlerde en yüksek köklenmenin besin ortamına 0,3 mg/L NAA ile 1,6 mg/L tiamin içeren ortamda elde edildiğini belirtmiştir. 7 günlük karanlık uygulaması ise köklenme için olumlu sonuç vermiştir. Sevgin (2010) ise köklendirme için mikro sürgünlerin bir hafta karanlıkta bırakılmasının köklenmeyi olumlu etkilemediğini belirtmiştir. En iyi köklenmenin GF-677 (badem x şeftali) anacında 1 mg/L IBA B.B.D içeren ortamda olduğunu bildirmiştir. Benmahoul (2012) yaptığı çalışmada, Antep fıstığının aksiller tomurcuklarından elde ettiği mikro sürgünlerin *ex vitro* köklenmesini sağlamıştır. *Ex vitro* köklenme tepkisi sürgünlerin %2 IBA'ya batırılmasından sonra elde edilmiştir. Köklü bitkiler torf-perlit-vermikülit (1:1:1) karışımı içeren plastik kaplara aktarıldıktan sonra seraya aktarılmıştır. 2 ay sonra köklü klon bitkilerin %81,5' nin hayatta kaldığı görülmüştür. Sevgin (2010), badem bitkisinde yaptığı mikroçoğaltım sonucunda köklen bitkileri dış koşullara alıştırma için kökleri çeşme suyu altında iyice yıkanarak besin ortamı ve agardan arındırılmıştır. Daha sonra 3:1 oranında torf ve perlit karışımı içeriğine aktarılıp üzeri şeffaf plastik bardak ile kapatılarak nem kaybetmesi engellenmiştir. 23±2 °C sıcaklığa sahip iklim odasında 16/8 (aydınlık/karanlık) fotoperiyot altında gelişime bırakılmıştır. Bir hafta sonra nem düşürülmeye başlanmış ve ikinci haftanın sonunda tamamen üzeri açılmıştır. Dış ortama aktarıldıktan bir ay sonra gelişim gösteren sağlıklı bitkiler seraya transfer edilip büyümeleri sağlanmıştır. Köse (2015) Garnem ve GF-677 anaçlarında yaptığı mikroçoğaltım çalışmasının ardından köklendirilen bitkilerin dış koşullara alıştırılması için steril edilmiş topraklı kavanozların içine besin ortamı ile birlikte aktarılmıştır. 2-3 ay boyunca steril topraklı kavanozlarda bitkilerin gelişmesi sağlandıktan sonra 8x8 cm torf bulunan saksılara alınarak bitkilerin dış koşullara alıştırılması sağlandığı belirtilmektedir. Türközü (2014) Tarhun bitkisinde yaptığı çalışma sonunda dış koşullara alıştırma aşamasında nem ve iklimlendirme koşullarının optimize edilmesinin önemli olduğunu ve havadaki nemin yeterli olmaması halinde bitkilerin yaşama şansının olmadığını belirtmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Cevizin ekonomik olarak anaç ve fidan yetiştiriciliğinin yapılmasında hastalıksız, hızlı ve klonal bir şekilde üretim oldukça önemlidir. Türkiye’de ceviz anaç üretimi sadece tohumla gerçekleştirilirken az sayıda yurt dışından klonal anaçlar ithal edilmektedir. Tohumla yapılan üretimlerde istenilen hatların elde edilmesi ve hastalıklardan ari olması imkansız olmaktadır. *In vitro* koşullarda mikroçoğaltım tekniği kullanılarak fidan üretimi gerçekleştirip istenilen özelliğe sahip fidan üretim imkanı sağlanacaktır. Ülkemizde giderek artan anaç talebini karşılamak ve ihraç eder bir konuma gelmek isteğinden yola çıkılarak bu çalışmada *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım çalışması yürütülmüştür. Bu sebeple yapılan çalışmada ceviz fidanlarından alınan eksplant materyallerinden mikroçoğaltım işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir ve bundan sonra yapılacak mikroçoğaltım çalışmalarına yön verebilecek sonuçlar alınmıştır.

Yapılan çalışmada eksplant materyallerinin sterilizasyonu için NaOCl’nın yeterli uygunlukta olmadığı eğer uygun dozda kullanılmazsa eksplantlarda yoğun kararmalara yol açtığı görülmüştür. Ancak actijenle yapılan sterilizasyon çalışmasında ceviz eksplantlarının sterilizasyonunda daha az kararma ve yanma olduğu belirlenmiştir.

Mikroçoğaltım için bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisinin oldukça önemli olduğu anlaşılmıştır. Eksplant başına sürgün sayısı ortalaması ve sürgün oluşum ortalaması olarak 2 mg/L TDZ, 1 mg/L NAA, 0,2 mg/L GA₃ kültür ortamından elde edilmiştir. En uzun sürgün ise 1,5 mg/L TDZ, 1 mg/L NAA ve 0,2 mg/L GA₃ içeren besin ortamından elde edilmiştir. Farklı sitokinin dozlarıyla da cevizde başarılı sonuçlar alındığı önceki yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında belirtilirken TDZ ile de başarılı sonucun alınabileceği anlaşılmıştır. Çoğaltılan sürgünlerin köklendirilmesi için ise en fazla 4 mg/L IBA içeren modifiye MS besin ortamında kültüre alınan Yalova-1 sürgünlerinde ortaya çıkmıştır. Ancak köklenme uzun sürede oluşmuştur. Daha hızlı ve kolay köklendirme için yeni çalışmalara devam edilmesi gerekmektedir. Özellikle köklendirme çalışmasında MS besin ortamının yeterli olmadığı farklı oranlarda makro ve mikro elementler ile vitaminlerin kombinasyonu olarak yeni hazırlanan modifiye MS besin ortamında daha yüksek köklenme sonucunun elde edilebileceği belirlenmiştir.

Köklenen bitkilerin dış koşullara başarılı bir şekilde alıştırılması diğer aşamalar kadar önemlidir. Nem düzeyini kaybetmeden kontrollü bir şekilde alıştırma işlemi gerçekleştirmeyle başarılı bir sonuca ulaşılabileceği belirlenmiştir. Köklü bitkiler musluk suyu ile yaprak ve köklere

zarar vermeyecek şekilde besin ortamından arınıncaya kadar yıkanıp cam beherlerde steril edilmiş nemli torf perlit (1:1) karışımına aktarılmıştır. Beherdeki bitkilerin üzeri streçle hava almayacak şekilde sarılıp iklim odasında büyümeye bırakılmıştır. İkinci hafta streç üzerinde delikler açılarak 1 hafta arayla kademeli olarak nem oranı düşürülmüştür. Streç tamamen 28 gün sonunda açılmıştır. Daha sonra bitkiler steril torf perlit (1:1) içeren saksılara aktarılarak $+24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %50 nem içeren iklim odasında büyümeye bırakılmış ve bitkiler gelişimini tamamladıktan sonra dış koşullara alıştırmıştır.

Yapılan mikroçoğaltım çalışmasının sonuç olarak, ticari ceviz anaç ve fidan yetiştirilmesine uygun imkanların sağlanması için yardımcı olacağı düşünülmektedir. Ülkemizin ceviz fidanı yetiştiriciliğinde istenilen seviyelere ulaşip talebi karşılaması, kaliteli ve sağlıklı anaçların üretilmesinde gelişmiş ülkelerle birlikte ceviz ihracaatı pazarına girmesi için daha fazla çalışmaların yürütülmesi ön görülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Anonim (2018a). <https://bilki.bg/encyclopedia-bilki/oreh.html>
- Anonim (2018b). Sierra Gold Nurseries. Garden Highway, Yuba City, California.
- Anonim (2018c). <https://www.cevizfidani.com.tr/yalova-1-ceviz-fidani>
- Amiri M E and Gharati S (2011). Influence of Medium Composition on Multiplication of Walnut (*Juglans regia* L.) Growth. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(8), pp. 1482-1485.
- Al-Mizory L S M, Mayi A A (2012). *In vitro* Propagation of Walnut (*Juglans regia*) by Nodal Explants. Journal of Agricultural Science and Technology. B, 2(6B): 665.
- Ashrafi E N, Vahdati K, Ebrahimzadeh H, Mirmasoumi M (2010). Analysis of *In-Vitro* Explants Mineral Contents to Modify Medium Mineral Composition for Enhancing Growth of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.8 (2): 325-329.
- Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (2002). Bitki Biyoteknolojisi-I, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi, 367, Konya.
- Benmahioul B, Dorion N, Kaid-Harche M, Daguin F (2012). Micropropagation and *ex vitro* rooting of pistachio (*Pistacia vera* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 108(2): 353-358.
- Bosela M J and Michler C H (2008). Media Effects on Black Walnut (*Juglans nigra* L.) Shoot Culture Growth *in vitro* Evaluation of Multiple Nutrient Formulations and Cytokinin Types. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 44(4):316-329.
- Cornu D, Jay-Allemand C (1989) Micropropagation of Hybrid Walnut Trees (*Juglans nigra* x *Juglans regia*) Through Culture and Multiplication of Embryos. *Ann Sience For* 46: 113-116.
- Damiano C, Catenaro E, Giovinazzi J, Frattarelli A, Caboni E (2004). Micropropagation of hazelnut (*Corylus avellana* L.). In VI International Congress on Hazelnut 686: 221-226.
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E (1995). Improved Shoot-Tip Micropropagation Of *Pistacia Vera* L. And The Beneficial Effects Of Methyl Jasmonate. *Journal Of The American Society For Horticultural Science*. 120(6): 938-942.
- Dolcet-Sanjuan R, Claveria E, Camprubi A, Estaun V, Calvet C (1996). Micropropagation of Walnut Trees (*Juglans regia* L.) and Response to Arbuscular Mycorrhizal Inoculation. *Agronomie, EDP Sciences*, 1996, 16 (10), 639-645.
- Dong P, Lichai Y, Qingming W, Ruisheng G (2007). Factors Affecting Rooting of *In Vitro* Shoots of Walnut Cultivars, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82:2, 223-226.
- Emiroğlu Ü, Gürel E, (2005). Bitki Islahında Doku Kültürü Tekniklerinin Kullanımı Tohum Bilimi ve Teknolojisi. 91-155 Ege Üniversitesi Tohum Teknolojisi ve Araştırma Merkezi, Bornova İzmir.

- Esen Ö B, (2013). Cevizin (*Juglans Regia* L.) Farklı Kısımları ve Ceviz İçeceği ile Sağlıkla İlgili Özellikleri. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- FAO, (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/home/en/>.
- Fidancı A (2005). Şebın ve K2 Ceviz Çeşitlerinin *In Vitro*'da Hızlı Çoğaltılma Tekniklerinin Belirlenmesi, Bahçe Ceviz 34 (1): 239 – 245.
- Fu Y, Gu F, Wu W (2003). Sterilization of *Carya illinoensis* Explants in Tissue Culture. Journal of Anhui Agricultural University. 31(2): 169-172.
- Heloır M C, Kevers C, Hausman F J and Gaspar T (1996). Changes in the Concentrations of Auxins and Polyamines During Rooting of *In-Vitro*-Propagated Walnut Shoots. Tree Physiology 16, 515—519.
- Gotea R (2012). *In vitro* Propagation Of Several Walnut Cultivars Rodica Gotea, Ionuț Gotea, Radu E. Sestras, Kourosh Vahdatı 2. Bulletin Uasvm Horticulture. 69: 1.
- Gruselle R, Badia N, Boxus Ph, (1987). Walnut Micropropagation: First Result. ISHS Acta Horticulturae 212: Symposium on *In Vitro* Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants. 212: 511-516.
- Grusella R, Boxus P (1990). Walnut Micropropagation. ISHS Acta Horticulturae 284: I International Symposium on Walnut Production. 284:45-52.
- Kamali K, Majidi E, Zarghami R (2001). Micropropagation of GF-677 Rootstocks (*Prunus amygdalus x P. persica*). Seed and Plant 17: 175-177.
- Karvar S (1990). Bademin (*Prunus amygdalus* Batsch) *In Vitro* Vejetatif Çoğaltımında Besin Ortamı İçeriğinin Sürgün Verimine Etkileri. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kepenek K, Kolağasi Z (2016). Micropropagation of Walnut (*Juglans regia* L.). Acta Physica Polonica A. 130(1): 150-156.
- Koç İ, Onay A, Özden Çiftçi Y (2014). *In Vitro* Regeneration and Conservation of the Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.). Turkish Journal of Biology, 38: 653-663.
- Köse S (2015). Garnem ve Gf-677 Anaçlarının *In Vitro* Çoğaltımı ve Rejenerasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Isparta.
- Leal D, Sanchez-Olate M, Aviles F, Materan M, Uribe M, Hasbun R, Rodriguez R (2007). Micropropagation of *Juglans regia* L. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. 381-390.
- Lievens C, Pylyser M, Boxus P H (1989). First Results About Micropropagation of *Anacardium occidentale* By Tissue Culture. Fruits.44(10): 553-557.
- Mangal M, Sharma M (2012). Walnut Regeneration Through Embryo Culture. Progressive Horticulture. 44(1):120-123.
- Mnoney E E, Mantell S H (2002). Clonal Propagation of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) by Tissue Culture. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 77(6): 649-657.

- Moreno R J L, Morales A V, Gradaille M D, Gomez L (2015). Towards Scaling-up the Micropropagation of *Juglans major* (Torrey) *Hellervar.* 209 x *J. regia* L., a Hybrid Walnut of Commercial Interest. Proceedings of the IUFRO Working Party 2.09.02 Conference “Integrating Vegetative Propagation, Biotechnologies and Genetic Improvement for Tree Production and Sustainable Forest Management”, 25-28.
- Murashige, G, Skoog F (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Nas M, Read P (2004). A Hypothesis for the Development of a Defined Tissue Culture Medium of Higher Plants and Micropropagation of Hazelnuts. *Scientia Horticulturae*, 101(1), 189-200.
- Nas M N, (2004). Inclusion of Polyamines in the Medium Improves Shoot Elongation in Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Micropropagation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 28(3), 189-194.
- Nas M N, Bölek Y, Sevgin N (2013). Shortcut to Long-distance Developing of a Tissue Culture Medium: Micropropagation of Mature Almond Cultivars as a Case Study. *Turkish Journal of Botany*, 37(6), 1134-1144.
- OGM, (2018). Orman Genel Müdürlüğü. <https://www.ogm.gov.tr>.
- Onay A (2000). Micropropagation of Pistachio From Mature Trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 60(2): 159-163.
- Özkaynak E, Samancı Ö (2005). Mikroçoğaltımda alıştırma. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 19 (36): 28-36.
- Payghamzadeh K, Kazemitabar S K (2010). *In Vitro* Germination of Pecan (*Carya illinoensis*) Embryo. *Biharean Biologist*. 4(1): 37-43.
- Payghamzadeh K, Kazemitabar S K (2010). The Effects of BAP, IBA and Genotypes on *In Vitro* Germination of Immature Walnut Embryos. *International Journal of Plant Production*. 4(4): 309-322.1
- Pehlivan E C, Kunter B, Royandazagh S (2017). Choice of Explant Material and Media for *in vitro* Callus Regeneration in Sultana Grape Cultivar (*Vitis vinifera* L.) Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty The Special Issue of 2nd International Balkan Agriculture Congress*, 30-34.
- Polat C, Dindaroğlu C (2014). Ceviz Ağacının (*Juglans regia* L.) Alçak Ahşap Yüzey Oymacılığında Kullanımı İle Bazı Ekolojik Özelliklerinin İrdelenmesi: Kahramanmaraş Örneği. III. Uluslararası Odun Dışı Orman Ürünleri Sempozyumu , 47-60.
- Prando M S, Chiavazza P, Faggio A, Contessa C (2014). Effect of Coconut Water and Growth Regulator Supplements on *In Vitro* propagation of *Corylus avellana* L. *Scientia Horticulturae*. 171, 91-94.
- Puthra G T, Anil S R (2002). *In vitro* Grafting Of Cashew (*Anacardium Occidentale* L.). *Scientia Horticulturae*. 92(2): 177-182.
- Saadat Y A, Hennerty M J (2002). Factors Affecting the Shoot Multiplication of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae*. 95(3): 251-260.

- Sanchez-Zamora A, Cos-Terrer J, Frutos-Tomas D, Garcia-Lopez R (2006). Embryo Germination and Proliferation *In Vitro* of *Juglans regia* L. *Scientia Horticulturae* 108: 317–321.
- Scaltsoyiannes A, Tsoulpha P, Panetsos K P, Moulalis D (1997). Effect of Genotype on Micropropagation of Walnut Trees (*Juglans regia*). *Silvae Genetica* 46, 6.
- Sevgin N (2010). Badem (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A Weeb)’in in vitro Mikroçoğaltılması ve Mikrosürgünlerin Köklenmesini Etkileyen Bazı Faktörlerin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kahramanmaraş.
- Sekmen, Ş., Sesli, Y., Sarısu H C (2017) Chandler Ceviz Çeşidinde *In Vitro* Çoğaltım Protokolünün Oluşturulması. *Bahçe Dergisi* Vol.46-2, 169-174.
- Snedecor G W, Cochran, W.G. 1982. *Statistical Methods* (7th edition). Iowa: The Iowa State University Press.
- Stevens LJ, Zental SS, Deck JL, Abate ML, Watkins BA, Lipp SR, Burgess JR (1995). Essential Fatty Acid Metabolism in Boys With Attention-deficit Hyperactivity Disorder *American Journal of Clinical Nutrition*, 62(4):761-768.
- Şen M (1986). Ceviz Yetiştiriciliği. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 229, Samsun.
- Şen M (2005). Türkiye’de Cevizin Dünü Bugünü ve Yarını. *Bahçe Ceviz Dergisi*, 34 (1): 15 – 27.
- Şen S M (2011). Ceviz Yetiştiriciliği, besin değeri folklorü.
- Şen (2017). Cevizin Besin Değeri ve Sağlıklı Beslenmede ki Önemi. *Bahçe Dergisi*, 46 (Özel Sayı 2): 1–9.
- Şimşek M, Gülsoy E (2016). Ceviz ve İçerdiği Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Açısından Önemi Üzerine Yapılan Bazı Çalışmalar. *İğdır Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(4): 9-15.
- Şirin E (2014). Kaman 1 Ve Kaman 5 Ceviz Çeşitlerinin (*Juglans regia* L.) Mikroçoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Üniversitesi. Tokat.
- Tetsumura T, Tsukuda K, Kawase K (2002). Micropropagation of Shinano Walnut (*Juglans regia* L.). *J. Japon. Soc. Hort. Sci.* 71:5 661-663.
- Tilkat E, Onay A, Yıldırım H, Ayaz E (2009). Direct plant regeneration from mature leaf explants of pistachio, *Pistacia vera* L. *Scientia Horticulturae*. 121(3): 361-365.
- Tuan P E, Meier-Dinkel A, Holtken A M, Wenzlitschke I, Winkelmann T (2016). Paving the Way for Large-scale Micropropagation of *Juglans* 3 Intermedia Using Genetically Identified Hybrid Seed. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 126:153–166.
- TÜİK, (2018). Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr/Start.do>
- Türközü D, Yaşar F, Ellialtıoğlu Ş, Yıldırım B (2014). Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) Bitkisinin Doku Kültürü Yoluyla Çoğaltılması Üzerinde Çalışmalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarla Bitkileri Dergisi*, 24(3): 300- 308
- Yang Z, Lüdders P (1994). in vitro Propagation of Pistachio (*Pistacia vera* L.)/in vitro Vermehrung von Pistazie (*Pistacia vera* L.). *Gartenbauwissenschaft*. 30-34.

Yiğit A, Ertürk Ü, Korukluoğlu M (2005). Fonksiyonel Bir Gıda: Ceviz. Bahçe Dergisi, 34(1).

Zarghami R, Salari A (2015). Effect of Different Hormonal Treatments on Proliferation and Rooting of Three Persian Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes. Pakistan Journal of Biological Sciences, 18 (6), 260.

ÖZGEÇMİŞ

Halime Tuba YILDIRIM 1991 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğretim ve Lise eğitimini Antalya'da tamamladı. 2011 yılında Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünü kazandı. Bir yıl İngilizce hazırlık eğitiminin ardından, 2016 yılında Lisans eğitiminden mezun oldu. Mezuniyetinin ardından aynı yıl Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2018 yılının Nisan ayı itibariyle Biotek Biyoteknoloji Tarım ve Bitki Ürünleri San.Tic.Ltd.Şti.'de AR-GE mühendisi olarak çalışmaktadır.