

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORMAN MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

78119

TC MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI
TEKNİK OKULLAR GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

Betula medwedewii Reg. ve *Zelkova carpinifolia* (Pall.) C.Koch. subsp. *Yomraensis* Anşın & Gerçek
TÜRLERİNİN DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE ÜRETİLMESİ

Orm. Müh. Gökçen HANGİŞİ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"Orman Yüksek Mühendisi"

Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 17.06.1998

Tezin Savunma Tarihi : 02.06.1998

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zeki YAHYAOĞLU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali DEMİRCİ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ali Ömer ÜÇLER

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU

Mayıs 1998

TRABZON

78119

ÖNSÖZ

"*Betula medwediewii* ve *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis* Türlerinin Doku Kültürü Teknikleri İle Üretilmesi" konulu bu çalışma, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans Tez danışmanlığımı üstlenerek tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarında her türlü yardım ve teşviklerini esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Zeki YAHYAOĞLU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca tezimin hazırlanmasında fikirlerinden faydalandığım Değerli Hocalarım Doç. Dr. Ali Ömer ÜÇLER ve Doç. Dr. Ali DEMİRCİ'ye teşekkür ederim.

Betula medwediewii materyalinin alınmasında yardımcı olan Murgul Orman İşletme Şefi Orhan BIYIKLI ve Kabaca Köyünden Orhan Nuri HATİNOĞLU'na, *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis* materyali alınmasında yardımcı olan Arş. Gör. Salih TERZİOĞLU'na içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında elinden gelen bütün olanakları sağlayan Of Orman Fidanlığı Mühendisi Cemile BAHADIR'a ve laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan Trabzon Orman Fidalık Müdürü Sedat İBRAHİMAĞAOĞLU ve Müdür Yardımcısı Fevzi SARIGÜL'e teşekkür ederim.

Materyal temininde ve tezin yazılmasında yardımlarını esirgemeyen eşim Zafer ÖLMEZ'e ayrıca teşekkür ediyorum.

Trabzon, Mayıs 1998

Gökçen HANGİŞİ

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No:</u> |
|--|-------------------------|
| ÖNSÖZ..... | II |
| İÇİNDEKİLER..... | III |
| ÖZET..... | V |
| SUMMARY..... | VI |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | VII |
| TABLolar DİZİNİ..... | VIII |
| SEMBOLLER DİZİNİ..... | X |
| | |
| 1. GENEL BİLGİLER..... | 1 |
| 1.1. Giriş..... | 1 |
| 1.2. <i>Betula medwediewii</i> 'nin Genel Özellikleri..... | 2 |
| 1.3. <i>Zelkova carpinifolia</i> subsp. <i>Yomraensis</i> 'in Genel Özellikleri..... | 3 |
| 1.4. Literatür Özeti..... | 3 |
| | |
| 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR..... | 6 |
| 2.1. Materyal..... | 6 |
| 2.1.1. <i>Betula medwediewii</i> ile İlgili Materyal..... | 6 |
| 2.1.2. <i>Zelkova carpinifolia</i> subsp. <i>Yomraensis</i> ile İlgili Materyal..... | 6 |
| 2.2. Yöntem..... | 7 |
| 2.2.1. Materyalin Alınma Zamanı..... | 7 |
| 2.2.1.1. <i>Betula medwediewii</i> Materyalinin Alınma Zamanı..... | 7 |
| 2.2.1.2. <i>Zelkova carpinifolia</i> subsp. <i>Yomraensis</i> Materyalinin Alınma Zamanı..... | 7 |
| 2.2.2. Besin Ortamlarının Saptanması ve Hazırlanması..... | 7 |
| 2.2.2.1. Sakkaroz ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Seçimi..... | 9 |
| 2.2.2.1.1. <i>Betula medwediewii</i> 'de Denenen Ortamlar..... | 9 |
| 2.2.2.1.2. <i>Zelkova carpinifolia</i> subsp. <i>Yomraensis</i> 'te Denenen Ortamlar..... | 10 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2.2. Ortam pH'sının Ayarlanması..... | 11 |
| 2.2.3. Sterilizasyon..... | 12 |
| 2.2.3.1. Besin Ortamlarının Sterilizasyonu..... | 12 |
| 2.2.3.2. Materyalin Yüzeysel Sterilizasyonu..... | 12 |
| 2.2.3.3. Kullanılan Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu..... | 12 |
| 2.2.4. Materyalin Kültüre Alınması..... | 13 |
| 2.2.5. Kültür Koşulları..... | 13 |
| 2.2.6. Gelişme Süresince Yapılan Ölçüm ve Gözlemler..... | 14 |
| 2.2.6.1. Eksplantlardaki Gelişme ve Sürgün Oluşumu..... | 14 |
| 2.2.6.2. Sürgünlerin Köklendirilmesi..... | 14 |
| 2.2.7. Denemelerin Kurulması ve Değerlendirilmesi..... | 15 |
| 2.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi..... | 15 |
| 3. BULGULAR..... | 16 |
| 3.1. <i>Betula medwediewii</i> ile İlgili Bulgular..... | 16 |
| 3.1.1. Sürgün ve Kallus Oluşumuna Ait Bulgular..... | 16 |
| 3.1.2. Köklenmeye Ait Bulgular..... | 25 |
| 3.2. <i>Zelkova carpinifolia</i> subsp. <i>Yomraensis</i> 'e Ait Bulgular..... | 26 |
| 4. DEĞERLENDİRME..... | 28 |
| 4.1. <i>Betula medwediewii</i> ile İlgili Bulguların Değerlendirilmesi..... | 28 |
| 4.2. <i>Z. carpinifolia</i> subsp. <i>Yomraensis</i> ile İlgili Bulguların Değerlendirilmesi..... | 30 |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... | 31 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 33 |
| 7. ÖZGEÇMİŞ..... | 35 |

ÖZET

Bu çalışmada, populasyonlarının kaybolma tehlikesiyle karşı karşıya kalmış endemik türler olmaları ve birey sayısı az, üretim materyali temini güç olan *Betula medwediewii* ve *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis* taksonlarının doku kültürü tekniği ile üretimi amaçlanmıştır.

B. medwediewii'de vejetasyon dönemi içinde 6 farklı ortetin kuzey ve güneye bakan taraflarından alınan koltuk tomurcukları ile çalışılmıştır. Her ortetten alınan 40 adet örnek 4 mg/l BAP dozunun kullanıldığı WPM ortamında kültüre alınmıştır. Kültür aşılama işleminden 2, 6 ve 10 hafta sonra yapılan gözlemlerle, klonlar ve eksplantın alındığı yönlerin eksplantların yaşama yüzdeleri, kallus ve sürgün oluşturma durumları üzerine etkileri araştırılmıştır. 6 hafta sonunda oluşan uzun sürgünler 2 mg/l NAA dozu içeren WPM ortamında köklendirmeye alınmışlar ve 4 hafta sonunda köklenmişlerdir.

Vejetasyon dönemi dışında genç bir ortetten alınan eksplantlar ise farklı BAP+NAA dozlarından oluşan 8 farklı WPM ortamında kültüre alınmışlardır. En iyi gelişme 4 mg/l BAP dozunun kullanıldığı NAA bulunmayan ortamda elde edilmiştir. Diğer ortamlarda gelişme meydana gelmemiştir.

Z. carpinifolia subsp. *Yomraensis*'den alınan eksplantlar Zeatin, BAP, IAA ve IBA doz ve kombinasyonlarından oluşan MS ve WPM ortamlarında kültüre alınmışlardır. *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis*'te kallus oluşumu sağlanmış, sürgün gelişimi sağlanamamıştır.

Anahtar Kelimeler: *B. medwediewii*, *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis*, Doku Kültürü, Mikrovejetatif üretim

SUMMARY

Micropropagation of *Betula medwediewii* and *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis* by Tissue Culture Techniques

In this study, it was aimed propagation of *Betula medwediewii* and *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis* which have been difficult obtaining of the material, had few amount of individual and endemic species' by using tissue culture.

It was studied on bud explants of *Betula medwediewii* taken south and north side of 6 different ortets in growing season. 40 samples were obtained for every ortet and they were cultured into the WPM (Woody Plant Medium) included 4 mg/l BAP. 2, 6, and 10 weeks later from the explants were cultured, effects of the different clones and direction of taken exsplants from ortet were researched on the survival rate of the explants, callus and shoot formation. In the end of 6 weeks, formed long shoots were placed into WPM rooting media included 2 mg/l NAA. And the shoots were rooted 4 weeks later.

Bud explants taken from the young ortet during the dormancy season were cultured into the WPM media included different BAP + NAA concentrations.

The bud explants belonged *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis* were placed into WPM and MS (Murashige & Skoog) media included Zeatin, BAP, IAA, and IBA concentrations and combinations. Callus formation was realised but shoot formation was not realised for *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis*.

Key Words: *B. medwediewii*, *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis*, Tissue Culture, Micropropagation

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Şekil 1. <i>Betula medwediewii</i> Materyalinin Alındığı Ortetler, Murgul, Kabaca, 1500 m..... | 6 |
| Şekil 2. 2 Hafta Sonunda Eksplantların Alındığı Bakıya Göre Yaşayan Eksplant Yüzdesi..... | 17 |
| Şekil 3. 3 Nolu Klona Ait Tüplerde Bulunan Sürgünlerin 3 Hafta Sonraki Durumları..... | 17 |
| Şekil 4. 6 Hafta Sonunda Eksplantların Alındığı Bakıya Göre Yaşayan Eksplant Yüzdesi..... | 18 |
| Şekil 5. 10 Hafta Sonunda Eksplantların Alındığı Bakıya Göre Yaşayan Eksplant Yüzdesi..... | 19 |
| Şekil 6. 10 Hafta Sonunda 1 Nolu Ortamda Bulunan <i>B. medwediewii</i> Eksplantları..... | 21 |
| Şekil 7. 14 Hafta Sonunda 1 Nolu Ortamda Bulunan <i>B. medwediewii</i> Eksplantları..... | 22 |
| Şekil 8. 14 Hafta Sonunda 1 Nolu Ortamda Bulunan <i>B. medwediewii</i> Eksplantları..... | 22 |
| Şekil 9. KTÜ Serasından Alınan <i>B. medwediewii</i> Eksplantlarının 1 Nolu Ortamda, 4 Hafta Sonundaki Durumları..... | 23 |
| Şekil 10. KTÜ Serasından Alınan <i>B. medwediewii</i> Eksplantlarının 10 Hafta Sonundaki Durumları..... | 24 |
| Şekil 11. 1:1Turba + Perlit Karışımındaki <i>B. medwediewii</i> Fideciği..... | 25 |
| Şekil 12. 1:1Turba + Perlit Karışımındaki <i>B. medwediewii</i> Fideciği..... | 26 |
| Şekil 13. Kallus Oluşturan <i>Z. carpinifolia</i> subsp. <i>Yomraensis</i> Eksplantları.. | 27 |
| Şekil 14. Kallus Oluşturmeyan <i>Z. carpinifolia</i> subsp. <i>Yomraensis</i> Sürgün Parçaları..... | 27 |

TABLolar DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Tablo 1. MS ve WPM Ortamlarının Hazırlanmasında Kullanılan Stok Eriyikler..... | 8 |
| Tablo 2. MS Vitamin Stok ve NaFeEDTA İçeriği..... | 8 |
| Tablo 3. WPM <i>Betula medwediewii</i> Başlangıç ve Çoğaltma Ortamı..... | 9 |
| Tablo 4. Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortama Eklenen BAP, NAA, Sakkaroz ve Agar Miktarları..... | 10 |
| Tablo 5. Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortama Eklenen BAP, NAA, Sakkaroz ve Agar Miktarları..... | 10 |
| Tablo 6. WPM Ortamında Kullanılan Zeatin, Myoinositol, Sakkaroz ve Agar Miktarları..... | 11 |
| Tablo 7. MS Ortamında Kullanılan BAP, IAA, Myoinositol, Sakkaroz ve Agar Miktarları..... | 11 |
| Tablo 8. MS Ortamında Kullanılan BAP, IBA, Myoinositol, Sakkaroz ve Agar Miktarları..... | 11 |
| Tablo 9. <i>Betula medwediewii</i> Köklendirme Ortamı..... | 14 |
| Tablo 10. 1 Nolu Ortama Konan Eksplantların 2 Hafta Sonraki Durumu..... | 16 |
| Tablo 11. 1 Nolu Ortama Konan Eksplantların 6 Hafta Sonraki Durumu..... | 18 |
| Tablo 12. 1 Nolu Ortama Konan Eksplantların 10 Hafta Sonraki Durumu..... | 19 |
| Tablo 13. Murgul'dan Alınan <i>B. medwediewii</i> Eksplantlarının 10 Hafta Sonraki Yaşama Yüzdeleri..... | 20 |
| Tablo 14. 1 Nolu Ortam İçin Yaşama Yüzdesi ile Klonlara Ait Varyans Analizi..... | 20 |
| Tablo 15. Yaşama Yüzdesi ile Klonlara Ait Duncan Testi..... | 20 |
| Tablo 16. 1 Nolu Ortam İçin Yaşama Yüzdesi ile Ortetlerin Bakılarına Ait Varyans Analizi..... | 21 |
| Tablo 17. KTÜ Serasından Alınan <i>B. medwediewii</i> Eksplantlarının 4 Hafta Sonundaki Durumları..... | 23 |
| Tablo 18. KTÜ Serasından Alınan <i>B. medwediewii</i> Eksplantlarının 8 Hafta | |

| | |
|--|----|
| Sonundaki Durumları..... | 24 |
| Tablo 19. KTÜ Serasından Alınan <i>B. medwediewii</i> Eksplantlarının 10 Hafta Sonundaki Durumları..... | 25 |



SEMBOLLER DİZİNİ

| | |
|-------|-----------------------------------|
| m | : Metre |
| cm | : Santimetre |
| mm | : Milimetre |
| BAP | : Benzilaminopurin |
| NAA | : Naftalen asetik asit |
| IBA | : İndol-3-butrik asit |
| IAA | : İndol-3-asetik asit |
| BA | : Benziladenin |
| WPM | : Woody Plant Medium besin ortamı |
| MS | : Murashige ve Skoog besin ortamı |
| mg | : Miligram |
| gr | : Gram |
| l | : Litre |
| subsp | : Alttür |
| var | : Varyete |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| HCl | Hidroklorik asit |

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüz koşullarında, ülkemiz ormanlarından üretilen odun hammaddesi, gereksinimi karşılayamayacak durumdadır. Öte yandan dünya nüfusunun sürekli artması ve yenilenemeyen kaynakların gün geçtikçe azalması karşısında, orman ve orman ürünlerine duyulan ihtiyacın gelecek yıllarda daha da artacağı tahmin edilmektedir. Bu nedenle günümüz ormancısı bu gün mevcut genetik rezervleri korumak ve bunları çeşitli şekillerde çoğaltmak durumundadır. Genetik ıslah çalışmaları olarak adlandırılan bu çalışmaların başarısı her şeyden önce, mevcut genetik çeşitliliğe ve kullanılan ıslah ve üretim yöntemlerinin kalitesine bağlıdır (1).

Orman ağaçları ıslahında bu güne kadar çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve bu yöntemler halen kullanılmaktadır. Orman ağaçlarının ıslah çalışmalarında vejetatif çoğaltmanın önemli rolü bulunmaktadır. Genetiksel olarak aynı özellikleri taşıyan selekte edilmiş genotipleri üretmek için vejetatif üretim yöntemleri kullanılır (2).

Odunsu bitki türlerinin vejetatif olarak çoğaltılmasını geniş bir şekilde gerçekleştirmek için; çelikle üretim (makro vejetatif üretim) ve in vitroda üretim (mikro vejetatif üretim) gibi iki teknikten söz edilmektedir (2).

Vejetatif üretmenin geleneksel yöntemi çelikle üretmedir. Yalnız, odunsu bitkilerin çelikle üretilmesinde, verilen süre içerisinde çoğaltılan bireylerin sayısı genel olarak azdır. Çoğu kez uygun yer ve uygun bitkisel materyalin bulunamaması hızlı üretimin kısıtlanmasına neden olmakta, bu da doku kültürü ile üretimi daha avantajlı kılmaktadır (3).

Doku kültürü deyiminin tam anlamı, ağzı kapatılmış özel cam tüp ya da kavanozlarda sentetik ve steril beslenme ortamlarında fidan üretimidir (4). Bilinen diğer klasik üretim yöntemlerinden farklı olarak bitkinin çeşitli kısımlarından alınan küçük bir doku parçası (eksplant), steril edildikten sonra çeşitli besin maddeleri içeren sentetik steril gıda ortamında (in vitro) ve uygun çevre koşullarında (ışık, rutubet ve sıcaklık) kültüre alınmaktadır (5).

Doku kültürünün, vejetasyon dönemine bağlı kalmaksızın, yıl boyunca çalışılabilmesi, bir klonu sınırsız bir şekilde üretmeye imkan vermesi, haploid ve poliploid bireyler elde edilebilmesi, genetik çeşitliliği sağlamak için gen bankaları kurulabilmesi, zengin tohum yıllarının seyrek olduğu ve tohumlarının saklanması zor olduğu ağaç türlerinin üretilmesi, az bir alanda çok sayıda fidan elde edilebilmesi, kuraklık, hava kirliliği, soğuk, hastalık vb. durumlara dayanıklı bireylerin seçilerek üretilmesi gibi pek çok avantajı bilinmektedir (2, 4, 6). Bu avantajlar ülkemizde de doku kültürünün bazı orman ağaçlarının üretiminde kullanılmasını gerekli kılmıştır. Özellikle çelikle ve tohumla üretimi zor ve uzun süreli, üretim materyali temini zor olan bitki türlerinde doku kültürü yöntemine baş vurulmaktadır (7, 8).

Bu çalışmada, popülasyonlarının kaybolma tehlikesiyle karşı karşıya kalmış endemik türler olmaları ve birey sayısı az, üretim materyali temini güç olan *Betula medwediewii* ve *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis* taksonlarının doku kültürü tekniği ile üretimi amaçlanmıştır.

1.2. *Betula medwediewii*'nin Genel Özellikleri

Çoğunlukla 4-5 m boylarında bir çalıdır. Dallar kalın ve yukarıya yöneliktir. Sürgünler tüylü, tomurcuklar büyük ve üzeri yapışkandır. Yapraklar geniş yumurta biçiminde olup kıvrımlı yaprağına benzemektedir. Yaprak kenarları düzensiz çift sıralı dişlidir. Orta ve yan damarların birleşim yerlerinde alt yüzde tüyler bulunur (9).

Erkek çiçek kurulları kısa saplı ve dik durur. Bu yönüyle diğer *Betula* türlerinden ayrılır. Meyve pulunun orta lobu yandakilerin iki katıdır. Nus dar kanatlıdır (9).

Yerel bir dağılışı vardır. Kafkasya ile Kuzeydoğu Anadolu'da yayılır. Artvin-Murgul Şavval Tepe (1560 m) Yörelerinde, Rize Vartar Yaylasında (2000 m), Artvin Atilla ormanlarında seyrek olarak relik halde rastlanır. Çoğunlukla ladin ormanlarında, orman gülleri ve kuş üvezi çalılıkları arasında bulunur. Doğal yayılış alanı dışında botanik bahçelerinde ve parklarda süs bitkisi olarak önemli bir yeri vardır (9, 10). Henüz ülkemizde bu ağacımız herhangi bir parkımızda yetiştirilmiş değildir (10).

1.3. *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis*'in Genel Özellikleri

Dünya üzerinde Batı ve Doğu Asya'da beş *Zelkova* türü yayılmaktadır. Bunlardan yalnız birisi *Zelkova carpinifolia* ülkemizde Kars, Muş, Siirt ve Hakkari gibi Doğu Anadolu illeri içinde ender olarak yayılan Hyrcano-Euxine bir elementtir. Gürgen yapraklı Zelkovanın genel coğrafi yayılışı ise Doğu Anadolu'dan başka, Kuzey İran ve Kafkasya olarak bilinmektedir. Ancak, Trabzon-Yomra yöresinde saptanan bu yeni *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis* taksonu, meşe, gürgen, karaağaç, defne ve sandal gibi türlerle bir arada, tek tek ya da küçük gruplar halinde bulunmaktadır (11).

2-3 (-5) m boylarında bir çalıdır. Yaprakları genellikle esas türe göre daha küçük, bir kenarındaki diş sayısı daha azdır. Üst yüzü tıpkı dağ karaağacı gibi zımpara şeklinde pürüzlü ve tüylü, ender olarak tüsüzdür. Odununda öz ışınları heteroselülerdir. Düşük yükseltilerde (30-100 m), meşe ve gürgen çalılıkları arasında bulunmaktadır (11).

1.4. Literatür Özeti

Günümüzde in vitroda çeşitli bitki türlerinin doku kültürü teknikleri ile üretilmesinde, kallus kültürü, organ kültürü, embriyo kültürü, hücre ve protoplast kültürü kullanılmaktadır (1, 5, 16). Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki üretimi gerçekleştirilmesinde üç farklı yöntem izlenmektedir. Bunlar; eksplantlarda mevcut koltuk tomurcuklarından sürgünlerin gelişmesi, eksplantlar üzerinde direk olarak adventif tomurcukların farklılaşması ve hücre ya da kallus kültürlerinde somatik embriyoların oluşmasıdır. Embriyo kültürü ile bitki rejenerasyonu ise embriyoların direk olarak kültür ortamında kültüre alınmasıyla sağlanmaktadır (1).

Bu çalışmada, *B. medwediewii* ve *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis* türlerinde, yukarıda sayılan yöntemlerden organ kültürü yani bitkinin koltuk tomurcukları kullanılarak rejenere fidecik elde edilmeye çalışılmıştır.

Dünyada ve ülkemizde *B. medwediewii* ve *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis* türleriyle ilgili direk olarak yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak *Betula* ve *Zelkova* cinsleriyle ilgili yapılmış araştırmalar bulunmaktadır.

Huhtinen ve Yahyaoğlu (17), *Betula pendula*'da yaptıkları çalışmada, kinetin ve IAA'yı MS ortamına 0.5 mg/l ve 25 mg/l ekleyerek, kallus kültürü ile sürgün oluşumu elde etmiş ve bu sürgünleri ortalama 0.01 mg/l 2.4-D ekleyerek köklendirmişlerdir.

Yahyaoğlu (18), *Betula pendula* ve *Picea abies* kambial dokularını kullandığı araştırmasında *Betula pendula*'da rejenere fidecik, *Picea abies*'te ise kallus oluşumu elde etmiştir.

Üçler (1), *Populus tremula* ve *Tilia rubra* üzerine yaptığı çalışmada, *P. tremula*'da organ kültürüyle, *T. rubra*'da ise embriyo kültürüyle rejenere fidecik elde etmiş, in vitro ve in vivoda köklendirme işlemi gerçekleştirmiştir.

Vihera-Aarnio ve Ryyänen (19), yaptıkları bir çalışmada, *B. pendula*'nın tohumda elde edilen fidanları, aşılama yoluyla elde edilen fidanları ve doku kültürü ile üretilen fidanları gelişme, taç yapısı, çiçeklenme ve tohum verimi açısından sera koşullarında karşılaştırmışlardır. 4 yıl sonunda, mikrovegetatif yolla üretilen bitkiler, aşılı fidanlardan yaklaşık 2 kat daha fazla tohum vermişlerdir. Böylece, seralarda kurulacak tohum bahçelerinde aşılı fidan yerine doku kültürü yoluyla üretilen fidanlar kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Vijayakumar ve ark. (20) nesli tükenmekte olan *Betula uber* üzerine yaptıkları bir çalışmada, bu türe ait tomurcukları seradaki ve doğadaki bireylerden toplamışlar, MS ortamında kültüre almışlardır. 4 hafta sonra 2-3 cm uzunluğunda, 3-4 yapraklı sürgünler oluşmuştur. 20 C sıcaklık ve 16 saat ışık altında perlit içerisinde saksıya alınan sürgünler 4-6 hafta içerisinde kök geliştirmişlerdir.

Perez ve Postigo (21)'nin yaptığı bir çalışmada *Betula celtiberica*'nın genç fidanlarından kesilip alınan sürgün parçalarından genç bitkileri başarılı bir şekilde üretmişlerdir. 0.1 mg/l BAP içeren ortam karşısında 0.6 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınmadan 20 gün sonra sürgün oluşumunun ve sürgün boyunun daha iyi olduğu gözlenmiştir. 0.2 mg/l IBA konsantrasyonunda 1 hafta sonunda kökler gelişmeye başlamıştır.

Ballester ve Vietez (22), Huşun mikrovegetatif üretimini etkileyen faktörler üzerine yaptıkları çalışmada, ortamlara ve eksplantın çeşidine göre çoğalma ve gelişme oranlarını araştırmışlardır. BAP ve NAA'nın 5 farklı kombinasyonundan oluşan ortamlara tepe tomurcuğu, yan tomurcuk ve sürgün parçası konulmuş, her ortamda tepe ve yan tomurcukların benzer sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir. Sürgün parçalarının gelişimi, 4

ortamda diğerlerinden daha iyi olmuştur. Sürgünlerin yaklaşık olarak % 95'i IBA içeren ortamda köklenmiştir.

Chalupa (23), Avrupa ladini, sarıçam, duglas, larix ve 16 yapraklı türde yaptığı çalışmada, embriyo kültürü, organ kültürü ve kallus kültürünü kullanmıştır. Düşük dozda (1 mg/l) BA içeren MS ve WPM ortamlarını kullanmıştır. Geniş yapraklılarda WPM ve MS ortamlarında 0.2 ve 2 mg/l BA dozlarını, düşük tuz içeren köklendirme ortamında ise IBA veya NAA hormonlarını kullanmıştır. En iyi sonuç genç fideciklerden elde edilen eksplantlarda sağlanmıştır.

Ide ve Yamamoto (24), 17 yaşındaki 8 *Betula maximowicziana* ağacından aldıkları kış tomurcuklarını kültüre almışlardır. Sürgün gelişimi için, BAP, NAA ve 2.4-D'nin konsantrasyonlarını içeren MS ve Anderson'un ortamlarını kullanmışlardır. 60 gün sonunda 5 mm uzunluğunda 9 sürgün köklendirme ortamına alınmış, 17 gün sonra hem BAP hem de BAP ve 2.4-D'nin bulunduğu ortamlarda köklenme meydana gelmiştir.

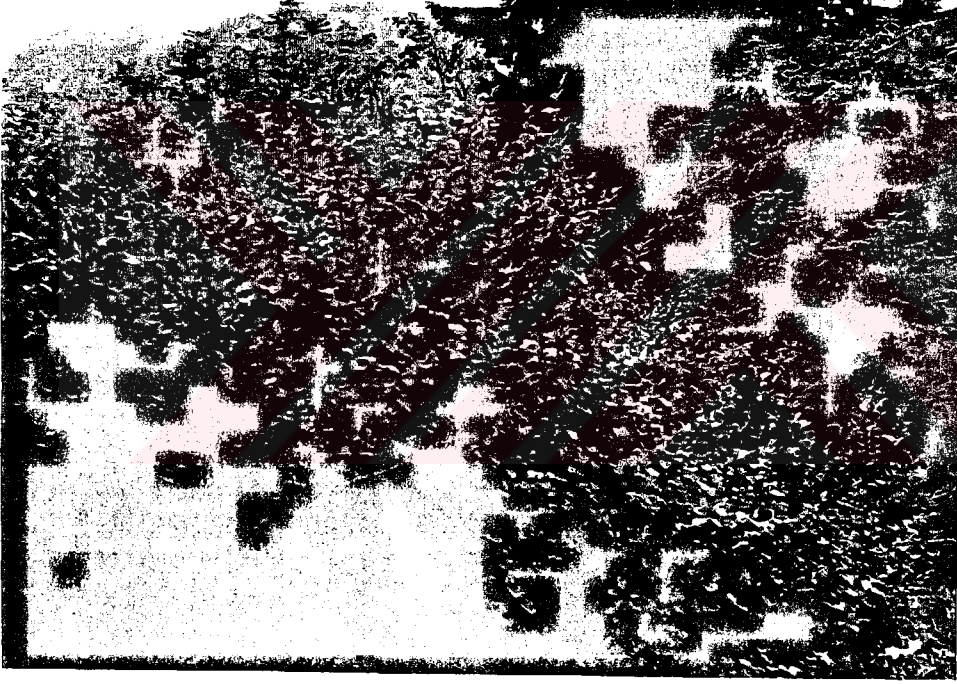
Saito ve ark. (25) *Betula platyphylla* var. Japonica Hara'nın yaprak saplarını ve sürgün parçalarını kullanarak, sürgün oluşumu ve gelişimini BAP'ın 0.7 mg/l olarak eklendiği IS ortamında sağlamışlardır. Köklenme IAA eklenen ortamda gerçekleşmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. *Betula medwediewii* ile İlgili Materyal

Denemelerde kullanılan ortetlere ait sürgünler, Murgul Orman İletme Müdürlüğü, Kabaca Bölgesi, Şavval Tepe Mevkiinde doğal olarak yetişen 6 farklı *Betula medwediewii* klonundan ve Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi Serasında bulunan fidandan elde edilmişlerdir (Şekil 1).



Şekil 1. *Betula medwediewii* Materyalinin Alındığı Ortetler, Murgul, Kabaca, 1500 m

2.1.2. *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis* ile İlgili Materyal

Denemelerde kullanılan materyal, Trabzon İli, Yomra İlçesinde doğal olarak yayılış gösteren *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis* ortetlerinden elde edilmişlerdir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Materyalin Alınma Zamanı

2.2.1.1. *Betula medwediewii*'de Materyalin Alınma Zamanı

Murgul, Kabaca Bölgesinden, sürgünlerin tümü vejetasyon döneminin içinde alınmıştır. Sürgün örnekleri 24 Temmuz 1997'de 6 farklı ortetten alınmıştır. KTÜ Orman Fakültesi serasında bulunan genç ortete ait sürgünler ise 13 Şubat 1998 tarihinde alınmıştır. Yaklaşık 10-15 cm uzunluğunda kesilen sürgünler, alüminyum folyolar içine sarılarak laboratuvara ulaştırılmış ve çalışmalarda kullanılabilecek kadar +4 °C'de saklanmıştır.

2.2.1.2. *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis*'te Materyalin Alınma Zamanı

Zelkova sürgünlerinin alınma işlemi vejetasyon dönemi içinde yapılmıştır. Sürgün örnekleri 19 Ekim 1997 tarihinde 2 adet ortetten, 15 Kasım 1997 ve 18 Nisan 1998'de başka bir ortetten, Yomra İlçesi, 100 m yükseltiden alınmıştır. Sürgünler yine yaklaşık 10-15 cm uzunluğunda kesilmiş ve alüminyum folyolara sarılarak laboratuvara götürülmüş, deneysel çalışmalarda kullanılabilecek kadar +4 °C'de saklanmıştır.

2.2.2. Besin Ortamlarının Saptanması ve Hazırlanması

Bitki doku kültürlerinde dikkate alınması gereken faktörlerden bir tanesi çeşitli mineral besin elementleri ve vitaminleri içeren besin ortamlarıdır (1). Günümüze kadar birçok sentetik besin ortamı geliştirilmiştir. Bu çalışmada, Murashige ve Skoog tarafından geliştirilmiş MS (12) ve Llyod ve McCrown tarafından geliştirilmiş WPM (Woody Plant Medium) (13) adlı iki temel besin ortamı kullanılmıştır. Bu besin ortamlarının hazırlanmasında kullanılan stokların içerikleri Tablo 1'de verilmiştir.

1 litre MS besin ortamı hazırlamak için Tablo 1'de verilen stok eriyiklerden; MS MAKRO STOK'tan 100 ml, MS MİKRO STOK'tan 10 ml ayrıca, 100 ml NaFe EDTA, 100 mg Myo inositol, 10 ml MS Vitamin Stok, 20 gr sakkaroz kullanılmıştır.

Tablo 1. MS ve WPM Ortamlarının Hazırlanmasında Kullanılan Stok Eriyikler (12, 13, 14, 15).

| MS | | WPM | |
|---------------------------------------|----------------|---|----------------|
| Besin Maddeleri | Miktarı (mg/l) | Besin Maddeleri | Miktarı (mg/l) |
| MAKRO STOK | | MAKRO STOK I | |
| NH ₄ NO ₃ | 16500 | NH ₄ NO ₃ | 4000 |
| KNO ₃ | 19000 | Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O | 5560 |
| CaCl ₂ | 3320 | KH ₂ PO ₄ | 1700 |
| MgSO ₄ | 1800 | MgSO ₄ | 1800 |
| KH ₂ PO ₄ | 1700 | | |
| | | MAKRO STOK II | |
| MİKRO STOK | | H ₂ SO ₄ | 9900 |
| H ₃ BO ₃ | 620 | | |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 2230 | MİKRO STOK III | |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 860 | H ₃ PO ₃ | 620 |
| KI | 83 | NaMoO ₄ .2H ₂ O | 25 |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 25 | | |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 2.5 | MİKRO STOK IV | |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 2.5 | MnSO ₄ .4H ₂ O | 2240 |
| | | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 860 |
| | | CuSO ₄ .5H ₂ O | 25 |

1 litre WPM besin ortamı hazırlamak için, Tablo1'de verilen stok eriyiklerden MAKRO STOK I ve II'den 100'er ml, MİKRO STOK III ve IV'ten 10'ar ml alınarak 1 litrelik ölçü silindirine konmuştur. Ortama 100 ml NaFeEDTA (Tablo 2), 10 ml MS Vitamin Stok (Tablo 2), 20 gr sakkaroz eklenmiştir.

Tablo 2. MS Vitamin Stok ve NaFeEDTA İçeriği (15).

| MS Vitamin Stok | Miktarı (mg/l) | NaFe EDTA Stok | Miktarı (mg/l) |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| Nicotinic Asit | 50 | NaFe EDTA | 390 |
| Pyridoxin HCl | 50 | | |
| Thiamine HCl | 10 | | |
| Glycine | 200 | | |

Her iki ortamın hazırlanmasında ortamlara değişik dozlarda bitki büyüme düzenleyicileri (Hormon ve Sitokinin) eklenerek ortamın hacmi saf suyla 1 litreye tamamlanmıştır. Ortam daha sonra behere boşaltılarak, manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmış, hassas bir pH metre ile 0.1 molar ve 1 molarlık NaOH ve HCl ilave edilerek ortamın pH'sı ayarlanmıştır. Ortama 6.5-7 gr agar eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcılarda şeffaf bir renk alıncaya kadar agarın tam olarak çözünmesi için kaynatılmıştır. Kaynayan ortam 15 x 200 mm'lik kültür tüplerine ya da 60 x 100 mm

ebatlarında kapaklı cam kavanozlara aktarılmıştır. Tüplere aktarılan ortamların ağzı alüminyum folyo ile kavanozlar kapakla sıkıca kapatılmış, otoklavda 120 °C ve 1 atm. basınç altında 20 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur. Köklendirme ortamı hazırlanırken de aynı işlemler tekrarlanmıştır.

2.2.2.1. Sakkaroz ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Seçimi

Sakkaroz odunsu bitki türlerinde büyüme ve farklılaşmanın desteklenmesi için en iyi karbonhidrat olarak gösterilmektedir (1).

Bitkilerin doku kültürü ile üretiminde bitki büyüme düzenleyicilerinin çok büyük önemi vardır. Bunların bir bölümü doğal olabileceği gibi (IAA ve Zeatin) sentetik de olabilir (BAP, IBA) (1, 16).

Çeşitli bitki dokularının çoğaltılmasında sürgün oluşumunu sağlamak için çoğunlukla sitokinler kullanılmaktadır. BAP ve Kinetin en çok kullanılan sitokinlerdir. Bunun yanında doğal bir sitokin olan zeatin de kullanılabilir. Boy büyümesinde ve kök oluşumunda ise IBA, NAA ve IAA hormonları etkili olmaktadır (1, 16).

2.2.2.1.1. *Betula medwediewii*'de Denenen Ortamlar

Denemelerin başlangıcında *B. medwediewii*'den alınan tomurcuklar daha önce *B. pendula*'da kullanılan ve oldukça başarılı olan WPM (13) ortamına konmuştur (Tablo 3).

Tablo 3. WPM *Betula medwediewii* Başlangıç ve Çoğaltma Ortamı (15).

| İçerik | Miktarı ⁱ |
|------------------------|----------------------|
| WPM Makro Stok I | 100 ml |
| WPM Makro Stok II | 100 ml |
| WPM Mikro Stok III | 10 ml |
| WPM Mikro Stok IV | 10 ml |
| Na ₂ FeEDTA | 100 ml |
| MS Vitamin Stok | 10 ml |
| Myoinositol | 100 mg |
| BAP | 4 mg |
| Sakkaroz | 20 gr |
| Agar | 7 gr |
| pH | 5.7 |

Murgul, Kabaca Bölgesinden 6 farklı ortetin, kuzey ve güney taraflarından alınan tomurcuklar 26. 07.1997 tarihinde Tablo 3'te gösterilen WPM ortamına her klonun kuzeyinde ve güneyinden 20'şer adet olmak üzere toplam 40'ar adet tomurcuk kültüre alınmıştır. Klonlar ve kuzey ile güneyden alınan eksplantlar arasında gelişme açısından ve yaşama yüzdesi bakımından fark olup olmadığı araştırılmıştır.

Daha sonra KTÜ Orman Fakültesi serasının bahçesindeki genç ortetten alınan eksplantlar Tablo 4 ve 5'te gösterilen BAP + NAA'nın değişik dozlarından oluşan 8 farklı WPM ortamına konmuş ve bu dozların sürgün ve kallus oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Tablo 4. Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortama Eklenen BAP, NAA, Sakkaroz ve Agar Miktarları

| | 1. Ortam | 2. Ortam | 3. Ortam | 4. Ortam |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|
| BAP (mg/l) | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| NAA (mg/l) | --- | 1.0 | 2.0 | 3.0 |
| Sakkaroz (gr/l) | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| Agar (gr/l) | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 |

Tablo 5. Sürgün Oluşumu ve Gelişimi İçin Ortama Eklenen BAP, NAA, Sakkaroz ve Agar Miktarları

| | 5. Ortam | 6. Ortam | 7. Ortam | 8. Ortam |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|
| BAP (mg/l) | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| NAA (mg/l) | --- | 1.0 | 2.0 | 3.0 |
| Sakkaroz (gr/l) | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| Agar (gr/l) | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 |

2.2.2.1.2. *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis*'te Denenen Ortamlar

03.10.1997 ve 19.10.1997 tarihlerinde Yomra'dan, 2 farklı klondan alınan eksplantlar Tablo 6, 7 ve 8'de gösterilen farklı Zeatin, BAP, IAA ve IBA dozlarından oluşan ortamlara 10'ar adet konmuştur. Bu çalışmada öncelikle Zelkovanın sürgün verdiği ortam saptanmaya çalışılmıştır. Bunun için de MS ve WPM ortamları denenmiştir.

Tablo 6. WPM Ortamında Kullanılan Zeatin, Myoinositol, Sakkaroz ve Agar Miktarları

| | 1. Ortam | 2. Ortam | 3. Ortam | 4. Ortam |
|---------------------------|----------|----------|----------|----------|
| <i>Zeatin (mg/l)</i> | 6.0 | 4.0 | 6.0 | 4.0 |
| <i>Myoinositol (mg/l)</i> | 100.0 | 100.0 | 200.0 | 200.0 |
| <i>Sakkaroz (gr/l)</i> | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| <i>Agar (gr/l)</i> | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 |

Tablo 7. MS Ortamında Kullanılan BAP ve IAA, Myoinositol, Sakkaroz ve Agar Miktarları

| | 5. Ortam | 6. Ortam |
|---------------------------|----------|----------|
| <i>BAP (mg/l)</i> | 2.0 | 2.0 |
| <i>IAA (mg/l)</i> | 2.0 | 0.4 |
| <i>Myoinositol (mg/l)</i> | 100.0 | 100.0 |
| <i>Sakkaroz (gr/l)</i> | 20.0 | 20.0 |
| <i>Agar (gr/l)</i> | 7.0 | 7.0 |

Tablo 8. MS Ortamında Kullanılan BAP, IBA, Myoinositol, Sakkaroz ve Agar Miktarları

| | 7. Ortam | 8. Ortam |
|---------------------------|----------|----------|
| <i>BAP (mg/l)</i> | 2.0 | 2.0 |
| <i>IBA (mg/l)</i> | 1.2 | 0.4 |
| <i>Myoinositol (mg/l)</i> | 100.0 | 100.0 |
| <i>Sakkaroz (gr/l)</i> | 20.0 | 20.0 |
| <i>Agar (gr/l)</i> | 7.0 | 7.0 |

18 Nisan 1998 tarihinde alınan *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis* sürgün parçaları 10, 20, 30, 40 gr/l sakkaroz içeren hormonsuz, WPM ortamlarında kültüre alınmış ve sakkaroz miktarının gelişme üzerine etkileri araştırılmıştır.

2.2.2.2. Ortam pH'sının Ayarlanması

Denemelerde kullanılan besin ortamlarının pH'sı ortama agar katılmadan önce pH metre ile ölçülmüş, NaOH ve Hcl ile 5.7 ± 2 'ye ayarlanmıştır.

2.2.3. Sterilizasyon

2.2.3.1. Besin Ortamlarının Sterilizasyonu

Ortam sterilizasyonu için önerilen minimum zaman ortamın hacmine göre değişmektedir. Bu süre 20-50 ml hacim için minimum 15 dakika, 50-75 ml hacim için minimum 20 dakika olarak belirlenmiştir (1). Kültür tüpleri veya kavanozlara konan ortamlar ağızları kapatılarak otoklavda 121 °C sıcaklık, 1.1 atm. basınçta 20 dakika bekletilerek steril edilmiştir. Ortamlarla birlikte ağzı kapalı şişelerde eksplantların yüzeysel sterilizasyonunda kullanılmak üzere destile su da steril edilmiştir.

2.2.3.2. Materyalin Yüzeysel Sterilizasyonu

Eksplantların sterilizasyonu, odunsu bitki türlerinin doku kültüründeki en önemli problemlerinden biridir. Özellikle, bitkisel materyal yaşlı bireylerden seçildiğinde enfeksiyon kapma olasılığı artmaktadır. Bu nedenle yüzeysel sterilizasyon süresi, bireyin yaşına ve türüne göre değişmektedir (1). Çalışma yapılan her iki türde de bitkiden kesilerek alınan sürgün parçaları, alüminyum folyoya sarılarak + 4 C'de buzdolabında saklanmıştır. Çalışma yapılacağı zaman sürgünler çeşme suyu ile iyice yıkanmış, 1 veya 2 tomurcuk taşıyacak şekilde parçalanmıştır. Sürgün parçaları ağzı kapaklı bir kavanoza konarak % 70'lik alkolle 15-20 saniye çalkalanmış, alkol süzülerek dökülmüş, materyal saf su ile yıkanmıştır. Kavanoza % 2.5'lik NaOCl (sodyum hipoklorit) dökülerek 1-2 damla yumuşatıcı twin damlatılmış ve kavanozun kapağı kapatılarak manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak 15 dakika steril edilmiştir. Vejetasyon dönemi başında alınan taze *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis* sürgünleri zarar görmemesi için 10 dakika steril edilmiştir. Bu süre sonunda eksplantlar steril çalışma kabini steril su ile 3-4 defa durulanmış, bir miktar steril su içinde kapalı halde çalışmaya hazır duruma getirilmiştir.

2.2.3.3. Kullanılan Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu

Steril çalışma kabini ve odası bir gün önceden yakılan ultraviyole ışınlarla steril edilmiştir. Kültür aşılama çalışmalarına başlamadan önce ultraviyole lambalar kapatılarak

kabinin havalandırması 20-30 dakika süre ile çalıştırıldıktan sonra kabin, % 70'lik alkolle silinmiştir. Steril kabinle birlikte binoküler mikroskop da alkolle silinerek steril edilmiş, kullanılacak petri kapları alüminyum folyoya sarılarak önceden otoklavda steril hale getirilmiştir. Kültür aşılama da kullanılan bisturi, makas ve pensler küçük bir beher içerisinde bulunan % 99'luk absolik alkolde bekletilerek çalışmaya başlamadan önce uçları kızarıncaya kadar iyice yakılmıştır. Çalışma esnasında alet ve ekipmanların yanında eller de alkolle sık sık silinmiştir.

2.2.4. Materyalin Kültüre Alınması

Steril hale getirilen *Betula medwediewii* sürgünlerindeki tomurcuklar bir petri kabı içerisinde kesilerek bir pens ve bisturi yardımıyla tomurcuk pulları temizlenmiş ve tomurcuğun ortasında kalan bir kaç yaprak taslağı (2-3 mm) bırakılmıştır. Yaprak taslağı alt kısmı besin ortamına girecek şekilde pens yardımıyla ortama yerleştirilmiş, tüpün ağzı alüminyum kapakla tekrar sıkıca kapatılmıştır. Gelişen sürgün ve kalluslar, aynı steril koşullarda 3-4 haftada bir yeni besin ortamlarına aktarılmıştır.

Zelkova carpinifolia subsp. *Yomraensis*'in çok küçük olan tomurcuklarının pulları binoküler mikroskop altında temizlenmiş ve 1-2 mm'lik yaprak taslakları ortama yerleştirilmiştir. Vejetasyon dönemi başında alınan örneklerde tomurcuk bulunmadığı için sürgün parçaları, internodlarından 3-4 mm uzunluğunda kesilerek kültür ortamlarına yerleştirilmiştir.

2.2.5. Kültür Koşulları

Eksplantların kültüre alınmasından sonra gelişebilmeleri için uygun çevre koşullarında bulunmaları gerekmektedir. Sıcaklık, ışık ve rutubetin belli oranlarda olması gerekir. Orman ağacı doku kültürleri için inkübasyon sıcaklıkları 20-28 °C arasında değişmekte genellikle 25 °C civarında uygulanmaktadır (1, 16). Işık şiddeti genel olarak 1000-5000 lüks arasında değişmekte (1), rutubet ise % 70 seviyesinde tutulmaktadır. İnkübasyon ortamı olarak 25±1 °C sıcaklık, 3000 lüks ışık şiddeti, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık koşulu ve % 70 rutubete ayarlı büyüme odası kullanılmıştır.

2.2.6. Gelişme Süresince Yapılan Ölçüm ve Gözlemler

2.2.6.1. Eksplantlardaki Gelişme ve Sürgün Oluşumu

Eksplantların kültür ortamlarına aktarılmasından sonra, yaşama yüzdeleri (enfeksiyon kapma durumları), gelişme durumları, sürgün oluşumları, renkleri, yaprak boyutları ve kallus oluşturma durumları gözlenmiştir. Kalluslar 3-4 haftada bir temizlenerek yeni ortamlara aktarılmıştır.

2.2.6.2. Sürgünlerin Köklendirilmesi

Betula medwediewii'de oluşan sürgünlerin köklendirilmesinde temel besin ortamında sitokin (BAP) kullanılmadan 2 mg/l NAA kullanılmıştır (Tablo 9). In vitroda köklenen fidecikler 1:1 turba + perlit karışımından oluşan ortama aktarılmış ve içinde bulunduğu saksının üzeri camla kapatılarak ortama uyum sağlaması için 2 hafta süre ile büyüme odasında bekletilmiştir. Saksının üzeri kademeli olarak açılmış, fideciğin dış ortama uyumu sağlanmıştır.

Tablo 9. *Betula medwediewii* Köklendirme Ortamı

| İçerik | Miktarı |
|------------------------|---------|
| WPM Makro Stok I | 100 ml |
| WPM Makro Stok II | 100 ml |
| WPM Mikro Stok III | 10 ml |
| WPM Mikro Stok IV | 10 ml |
| Na ₂ FeEDTA | 100 ml |
| MS Vitamin Stok | 10 ml |
| Myoinositol | 100 mg |
| NAA | 2 mg |
| Sakkaroz | 20 gr |
| Agar | 7 gr |
| pH | 5.7 |

2.2.7. Denemelerin Kurulması ve Değerlendirilmesi

Betula medwediewii'de Murgul'dan alınan eksplantlardan 20 kuzey ve 20 güney olmak üzere 6 farklı klondan 40'ar örnek kullanılmıştır. KTÜ Orman Fakültesi serasından alınan eksplantlar, 8 farklı ortama 10'ar adet konmuştur.

Zelkova carpinifolia subsp. *Yomraensis* eksplantları 2 farklı klondan alınarak her ortama 20'şer adet konmuştur. 18 Nisan 1998 tarihinde alınan sürgün parçacıkları ise 10'ar adet konmuştur.

2.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi

B. medwediewii'de Murgul'dan alınan materyallerin ortamlara konmasından 2, 6 ve 10 hafta sonraki yaşayan eksplant sayısı, sürgün ve kallus oluşturup oluşturmadıkları tablo halinde belirlenip, 10. haftadaki klonlara ve klonların kuzey ve güneye bakan taraflarına göre yaşama yüzdeleri hesaplanmış, klonlar ve bakılar arasında bir fark olup olmadığı Varyans Analizi ile tespit edilmiştir. Varyans Analizleri için STATGRAPHICS istatistik paket programı kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. *Betula medwediewii* ile İlgili Bulgular

3.1.1. Sürgün ve Kallus Oluşumuna Ait Bulgular

Murgul, Kabaca Bölgesinden alınan 6 farklı ortetin kuzeye ve güneye bakan taraflarından alınan tomurcuk eksplantları, steril koşullarda tomurcuk pulları temizlenerek birkaç yaprak taslağı Tablo 3'te gösterilen WPM ortamında kültüre alınmıştır.

Eksplantlar kültüre alındıktan 2 hafta sonra yapılan gözlemlerde, Tablo 10'da görüldüğü gibi, eksplantların bir kısmının enfeksiyon nedeniyle öldüğü belirlenmiştir. Klonlara göre yaşayan eksplant sayısı Şekil 2'de görülmektedir. 2 hafta sonunda sürgün ve kallus oluşumu görülmemiş, yalnızca yaprak taslakları canlanmış ve büyümeye başlamıştır.

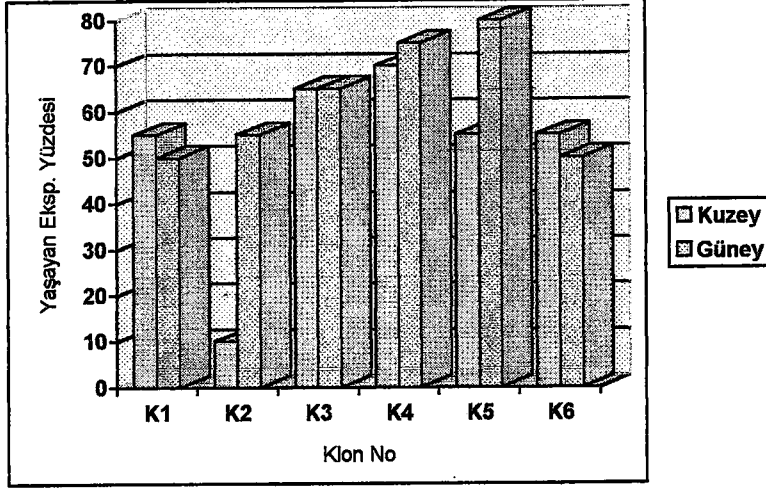
Tablo 10. 1 Nolu Ortama Konan *B. medwediewii* Eksplantlarının 2 Hafta Sonraki Durumu

| Klon No | Yaşayan Eksplant Sayısı ve Yüzdesi | | | Sürgün | Kallus |
|---------|------------------------------------|---------|--------|--------|--------|
| | Kuzey | Güney | Toplam | | |
| 1 | 11 (55) | 10 (50) | 21 | - | - |
| 2 | 2 (10) | 11 (55) | 13 | - | - |
| 3 | 13 (65) | 13 (65) | 26 | - | - |
| 4 | 14 (70) | 15 (75) | 29 | - | - |
| 5 | 11 (55) | 16 (80) | 27 | - | - |
| 6 | 11 (55) | 10 (50) | 21 | - | - |

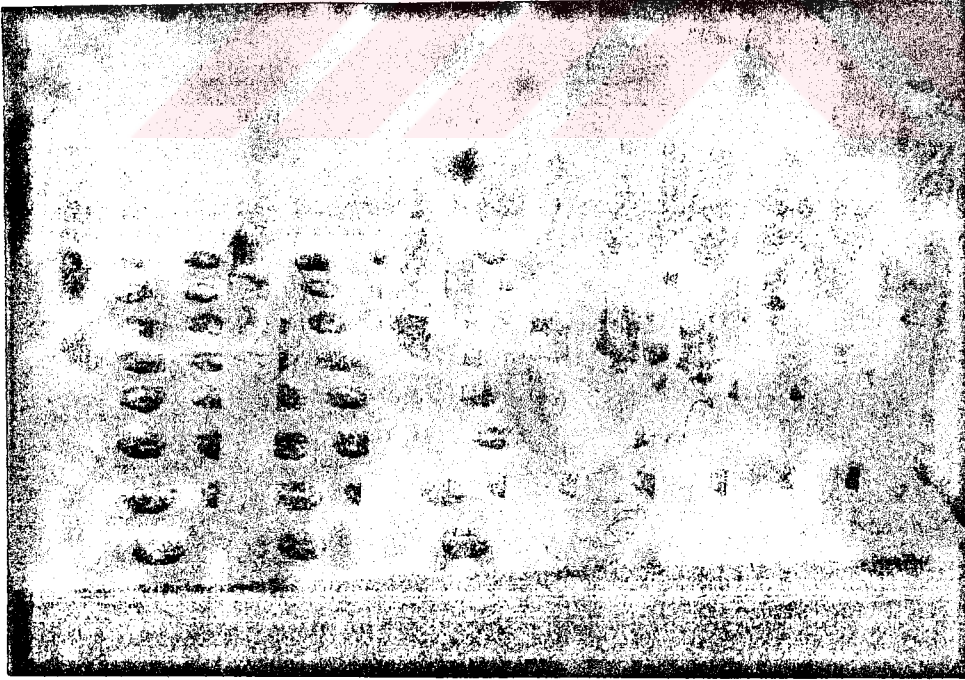
3. hafta sonunda yaşayan eksplantların kuvvetli sürgün verdiği (Şekil 3), 1-2 cm boyutlarında iki büyük yaprak oluşturduğu gözlemlendi.

4. haftadan sonra sürgünlerin büyük yaprakları kesilerek kavanozlarda yeni ortamlara aktarıldı. Eksplantlar kavanozlara aktarıldıktan sonra yeşil kallus oluşumu arttı ve 6. haftadan sonra kalluslarda sürgün farklılaşması başladı.

6. haftada yine kallusların bir kısmının enfeksiyon nedeniyle öldüğü gözlemlendi. Şekil 4 ve Tablo 11'de klonlara ve bakılara göre yaşayan eksplant sayıları, sürgün ve kallus oluşturma durumları görülmektedir.



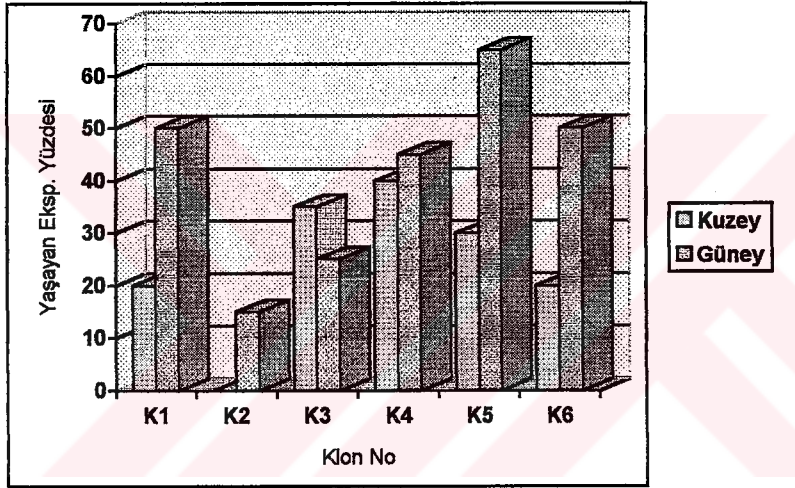
Şekil 2. 2 Hafta Sonunda Eksplantların Alındığı Bakıya Göre Yaşayan Eksplant Yüzdesi



Şekil 3. 3 Nolu Klona Ait Tüplerde Bulunan Sürgünlerin 3 Hafta Sonraki Durumları

Tablo 11. 1 Nolu Ortama Konan *B. medwediewii* Eksplantlarının 6 Hafta Sonraki Durumu

| Klon No | Yaşayan Eksplant Sayısı ve Yüzdesi | | | Sürgün | Kallus |
|---------|------------------------------------|---------|--------|--------|--------|
| | Kuzey | Güney | Toplam | | |
| 1 | 4 (20) | 10 (50) | 14 | + | + |
| 2 | - | 3 (15) | 3 | + | + |
| 3 | 7 (35) | 5 (25) | 12 | + | + |
| 4 | 8 (40) | 9 (45) | 17 | + | + |
| 5 | 6 (30) | 13 (65) | 19 | + | + |
| 6 | 4 (20) | 10 (50) | 14 | + | + |



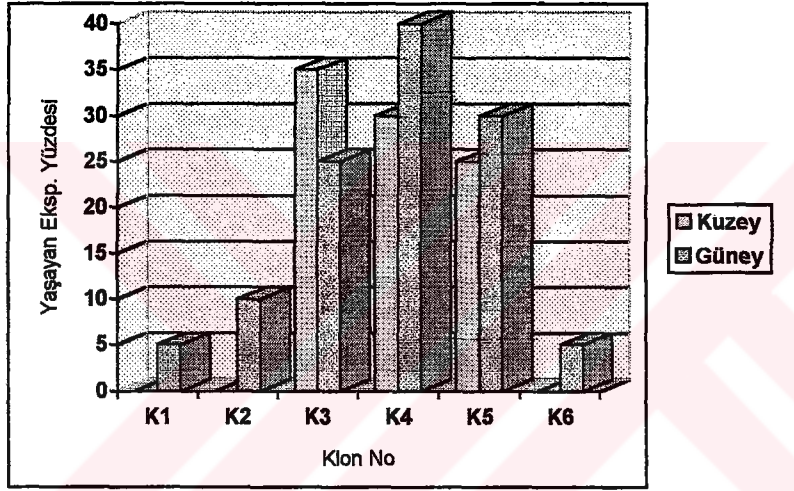
Şekil 4. 6 Hafta Sonunda Eksplantların Alındığı Bakıya Göre Yaşayan Eksplant Yüzdesi

6. haftada yapılan gözlemlerde sürgün sayılarının arttığı görüldü fakat, sürgün boyları çok kısa olduğu için sürgünler sayılamadı.

10. hafta sonunda da sürgün boyları çok kısa olduğu için sürgünler üzerinde gerekli ölçümler yapılamadı. Ortam değiştirme çalışmaları sırasında laboratuvarında çıkan bir aksaklıktan dolayı 1 hafta sonra 5 nolu klon dışındaki tüm kültürler dışarıdan enfeksiyon kaparak öldüler (Tablo 12) (Şekil 5).

Tablo 12. 1 Nolu Ortama Konan *B. medwediewii* Eksplantlarının 10 Hafta Sonraki Durumu

| Klon No | Yaşayan Eksplant Sayısı | | | Sürgün | Kallus |
|---------|-------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | Kuzey | Güney | Toplam | | |
| 1 | - | 1 (5) | 1 | + | + |
| 2 | - | 2 (10) | 2 | + | + |
| 3 | 7 (35) | 5 (25) | 12 | + | + |
| 4 | 6 (30) | 8 (40) | 14 | + | + |
| 5 | 5 (25) | 6 (30) | 11 | + | + |
| 6 | - | 1 (5) | 1 | + | + |



Şekil 5. 10 Hafta Sonunda Eksplantların Alındığı Bakıya Göre Yaşayan Eksplant Yüzdesi

1 nolu ortama konan eksplantların 10. hafta sonundaki yaşama yüzdeleri hesaplanmış (Tablo 13), Varyans Analizi ile klonlar ve klonların kuzey ve güneyinden alınan tomurcuklar arasında yaşama yüzdesi bakımından bir fark olup olmadığı araştırılmıştır.

Tablo 13. Murgul'dan Alınan *B. medwediewii* Eksplantlarının 10 Hafta Sonraki Yaşama Yüzdeleri

| Klon No | Eksplantın Alındığı Bakı | Kültüre Alınan Eksplant Sayısı | 10. Haftada Yaşayan Eksplant Sayısı | Bakıların Yaşama Yüzdesi | Klonların Yaşama Yüzdesi |
|---------|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | Kuzey | 20 | - | - | 2.5 |
| | Güney | 20 | 1 | 5 | |
| 2 | Kuzey | 20 | - | - | 5.0 |
| | Güney | 20 | 2 | 10 | |
| 3 | Kuzey | 20 | 7 | 35 | 30.0 |
| | Güney | 20 | 5 | 25 | |
| 4 | Kuzey | 20 | 6 | 30 | 35.0 |
| | Güney | 20 | 8 | 40 | |
| 5 | Kuzey | 20 | 5 | 25 | 27.5 |
| | Güney | 20 | 6 | 30 | |
| 6 | Kuzey | 20 | - | - | 2.5 |
| | Güney | 20 | 1 | 5 | |

Yapılan Varyans Analizi sonucunda, klonlar arasında eksplantların yaşama yüzdesi bakımından % 95 güven düzeyinde fark olduğu belirlenmiş, farklılıkların hangi klonlar arasında olduğu ise Duncan Testi sonucunda saptanmıştır (Tablo 14, Tablo 15).

Duncan Testine göre en fazla yaşama yüzdesi sıralamasının 4, 3, 5, 2 ve 1-6 nolu klonlar şeklinde olduğu, 1 ve 6 nolu klonlar arasında yaşama yüzdesi bakımından bir fark bulunmadığı belirlenmiştir.

Tablo 14. 1 Nolu Ortam İçin Yaşama Yüzdesi ile Klonlara Ait Varyans Analizi

| Varyasyon Kaynağı | Kareler Toplamı | Serbestlik Derecesi | Kareler Ortalaması | F-Oranı | Güven Düzeyi |
|-------------------|-----------------|---------------------|--------------------|---------|--------------|
| Gruplar Arası | 2335.4167 | 5 | 467.08333 | 999.999 | 0.0000 |
| Gruplar İçi | 0.0000 | 6 | 0.00000 | | |
| Toplam | 2335.4167 | 11 | | | |

Tablo 15. Yaşama Yüzdesi ile Klonlara Ait Duncan Testi

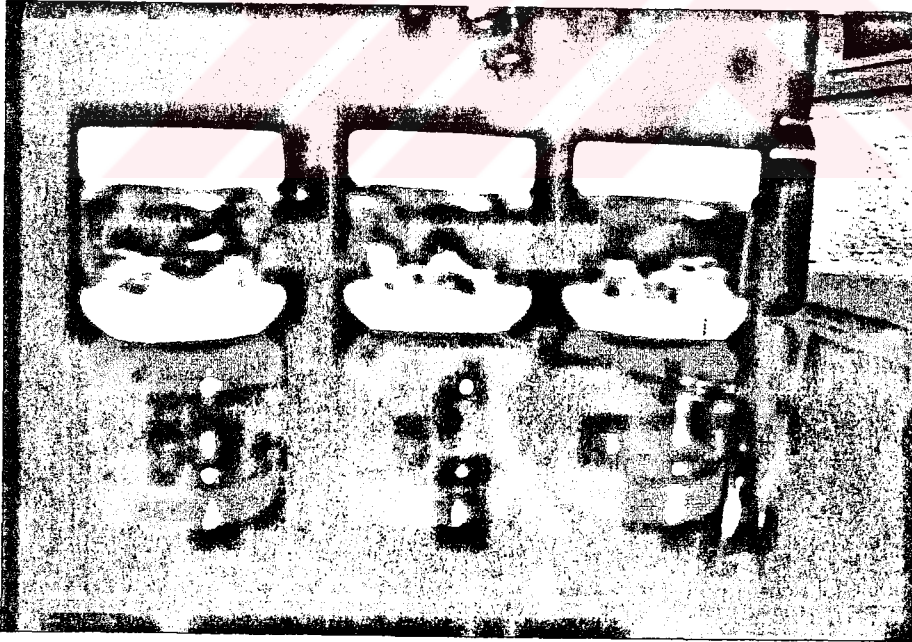
| Klon | Veri Sayısı | Yaşama Yüzdesi | Homojen Gruplar | | | |
|------|-------------|----------------|-----------------|---|---|---|
| 1 | 2 | 2.5 | * | | | |
| 6 | 2 | 2.5 | * | | | |
| 2 | 2 | 5.0 | | * | | |
| 5 | 2 | 27.5 | | | * | |
| 3 | 2 | 30.0 | | | | * |
| 4 | 2 | 35.0 | | | | * |

Yapılan Varyans Analizi sonucunda % 95 güven düzeyinde ortetin kuzey ve güneyinden alınan eksplantların yaşama yüzdeleri arasında bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır (Tablo 16).

Tablo 16. 1 Nolu Ortam İçin Yaşama Yüzdesi ile Ortetlerin Bakılarına Ait Varyans Analizi

| Varyasyon Kaynağı | Kareler Toplamı | Serbestlik Derecesi | Kareler Ortalaması | F-Oranı | Güven Düzeyi |
|-------------------|-----------------|---------------------|--------------------|---------|--------------|
| Gruplar Arası | 234.7222 | 1 | 234.72222 | 1.466 | 0.2653 |
| Gruplar İçi | 1120.8333 | 7 | 160.11905 | | |
| Toplam | 1355.5556 | 8 | | | |

Şekil 6'da 10. hafta sonunda enfeksiyon kapmadan yaşayan *B. medwediewii* kallus ve sürgünleri, Şekil 7 ve 8'de kalan 5 nolu klona ait sürgünlerin 14. hafta sonundaki durumları görülmektedir.



Şekil 6. 10 Hafta Sonunda 1 Nolu Ortamda Bulunan *B. medwediewii* Eksplantları



Şekil 7. 14 Hafta Sonunda 1 Nolu Ortamda Bulunan *B. medwediewii* Eksplantları

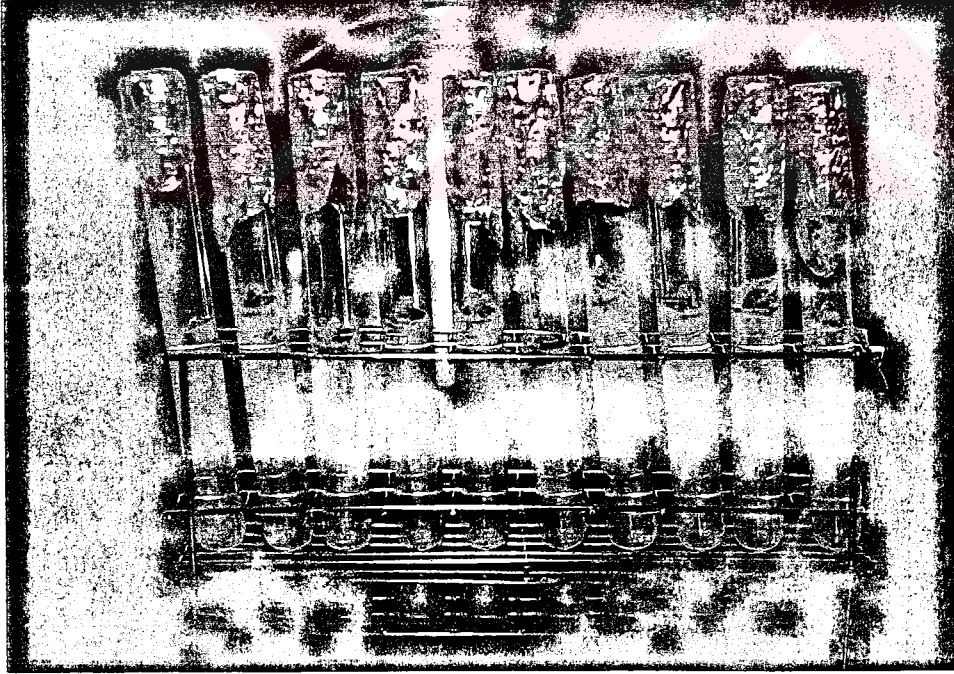


Şekil 8. 14 Hafta Sonunda 1 Nolu Ortamda Bulunan *B. medwediewii* Eksplantları

22 Şubat 1998'de KTÜ serasından alınan *B. medwediewii* eksplantları Tablo 4 ve 5'te görülen ortamlara konduktan 4, 8 ve 10 hafta sonunda yapılan gözlemlerde ortamlara göre yaprak ve kallus oluşturma durumları belirlenmiştir (Tablo 17, 18 ve 19). 8 ortamdan sadece 1 Nolu ortamda gelişme gözlenmiş, 1.5 cm uzunluğunda yaprak oluştuğu saptanmıştır (Şekil 9).

Tablo 17. KTÜ Serasından Alınan *B. medwediewii* Eksplantlarının 4 Hafta Sonundaki Durumları

| <i>Ortam</i> | <i>Yaprak</i> | <i>Tomurcuk</i> | <i>Kallus</i> |
|--------------|---------------|-----------------|---------------|
| 1. Ortam | Gelişti | Açıldı | Oluştı |
| 2. Ortam | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 3. Ortam | Gelişmedi | Açılmadı | Oluşturmadı |
| 4. Ortam | Gelişmedi | Açılmadı | Oluşturmadı |
| 5. Ortam | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 6. Ortam | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 7. Ortam | Gelişmedi | Açılmadı | Oluşturmadı |
| 8. Ortam | Gelişmedi | Açılmadı | Oluşturmadı |



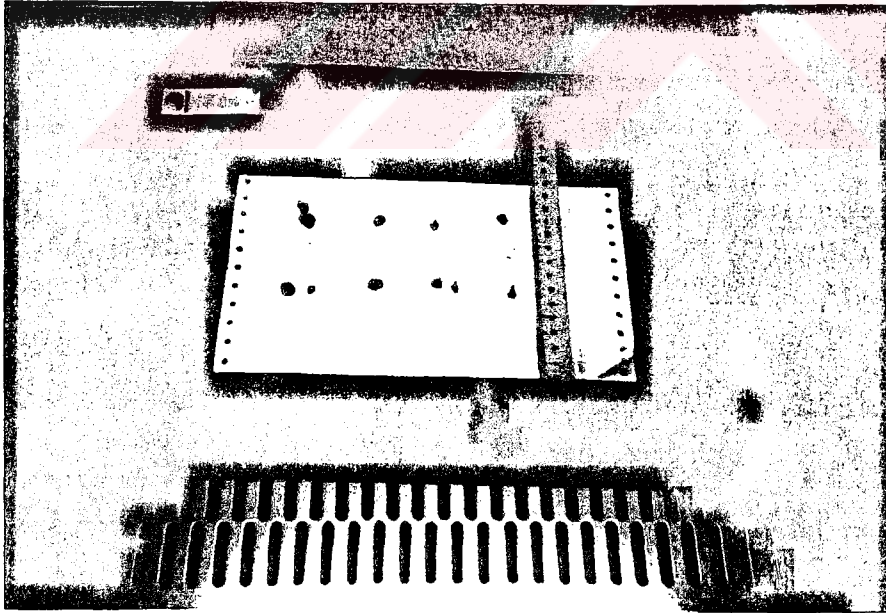
Şekil 9. KTÜ Serasından Alınan *B. medwediewii* Eksplantlarının 1 Nolu Ortamda, 4 Hafta Sonundaki Durumları

8. hafta sonunda 2, 3 ve 8 nolu ortamların dışındaki tüm ortamlarda kallus oluşmuş, fakat 1 nolu ortam dışında yaprak gelişimi görülmemiştir (Tablo 18).

Tablo 18. KTÜ Serasından Alınan *B. medwediewii* Eksplantlarının 8 Hafta Sonundaki Durumları

| <i>Ortam</i> | <i>Yaprak</i> | <i>Tomurcuk</i> | <i>Kallus</i> |
|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| 1. <i>Ortam</i> | Gelişti | Açıldı | Oluştı |
| 2. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 3. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluşturmadı |
| 4. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluşturmadı |
| 5. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 6. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 7. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 8. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluşturmadı |

KTÜ serasından alınan eksplantlarda 10. hafta sonunda hiçbir ortamda sürgün farklılaşması görülmemiştir. Ancak 1 nolu ortamda diğer ortamlara göre daha iyi kallus ve yaprak oluşumu gözlenmiştir. 5 nolu ortamdaki eksplantlar tamamen yeşil kallusa dönüşmüştür. Diğer ortamlardaki kalluslarda hiçbir gelişme olmamıştır (Şekil 10).



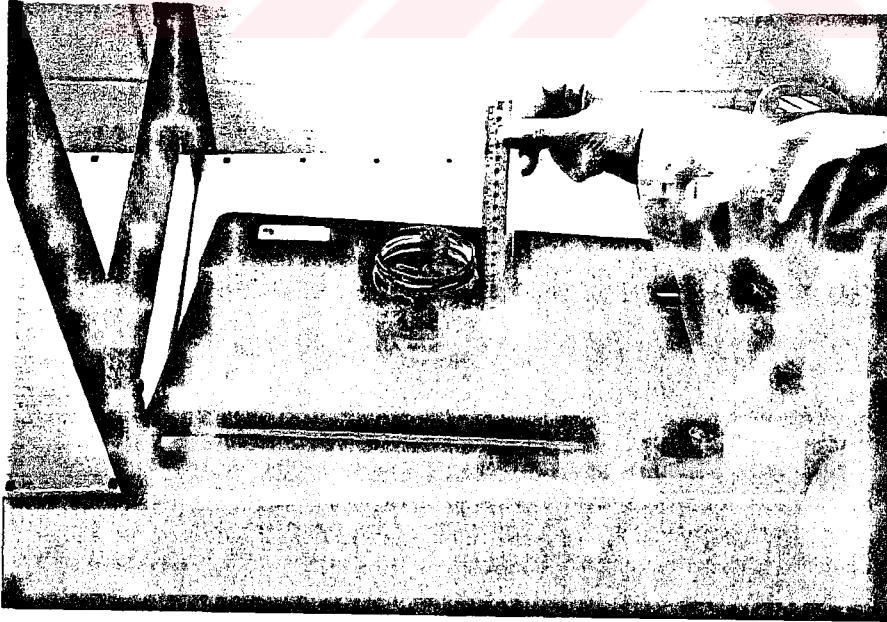
Şekil 10. KTÜ Serasından Alınan *B. medwediewii* Eksplantlarının 10 Hafta Sonundaki Durumları

Tablo 19. KTÜ Serasından Alınan *B. medwediewii* Eksplantlarının 10 Hafta Sonundaki Durumları

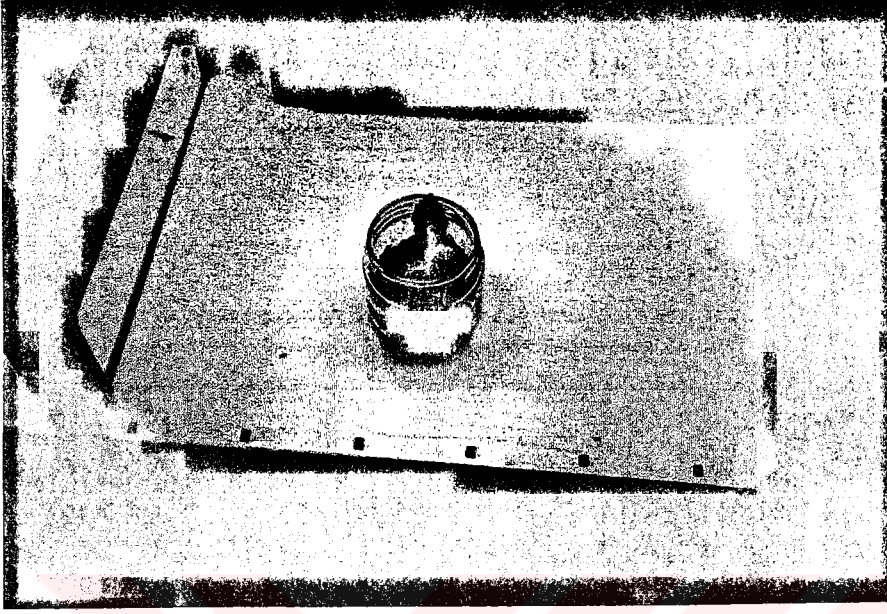
| <i>Ortam</i> | <i>Yaprak</i> | <i>Tomurcuk</i> | <i>Kallus</i> |
|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| 1. <i>Ortam</i> | Gelişti | Açıldı | Oluştı |
| 2. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 3. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluşturmadi |
| 4. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluşturmadi |
| 5. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 6. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 7. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |
| 8. <i>Ortam</i> | Gelişmedi | Açılmadı | Oluştı |

3.1.2. Köklenmeye Ait Bulgular

Eksplantlar ortama konduktan 10 hafta sonra 3 nolu klondan 2-3 cm boylarında iki sürgün kesilerek Tablo 9'da görülen köklendirme ortamına aktarılmıştır. Aktarıldıktan 4 hafta sonra yapılan gözlemlerde sürgünlerden birinin 3-4 cm uzunluğunda kalın kökler oluşturduğu görülmüştür. Köklenen regenere fidecik 1:1 turba + perlit karışımından oluşan ortama aktarılmış, fakat fidecik ölmüştür. Daha sonra kalan 5 nolu klondan alınan sürgün yine Tablo 9'da görülen köklendirme ortamına aktarılmıştır. 4 hafta sonunda köklenen fidecik 1:1turba + perlit karışımından oluşan ortama aktarılmış ve gelişmesine devam etmiştir (Şekil 11 ve 12).



Şekil 11. 1:1Turba + Perlit Karışımındaki *B. medwediewii* Fideciği



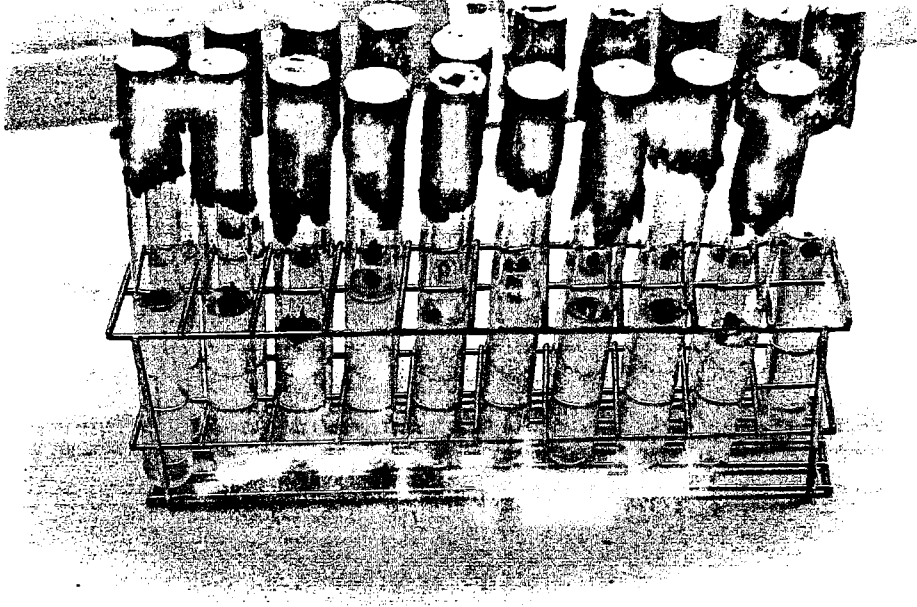
Şekil 12. 1:1 Turba + Perlit Karışımındaki *B. medwediewii* Fideciği

3.2. *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis*'e Ait Bulgular

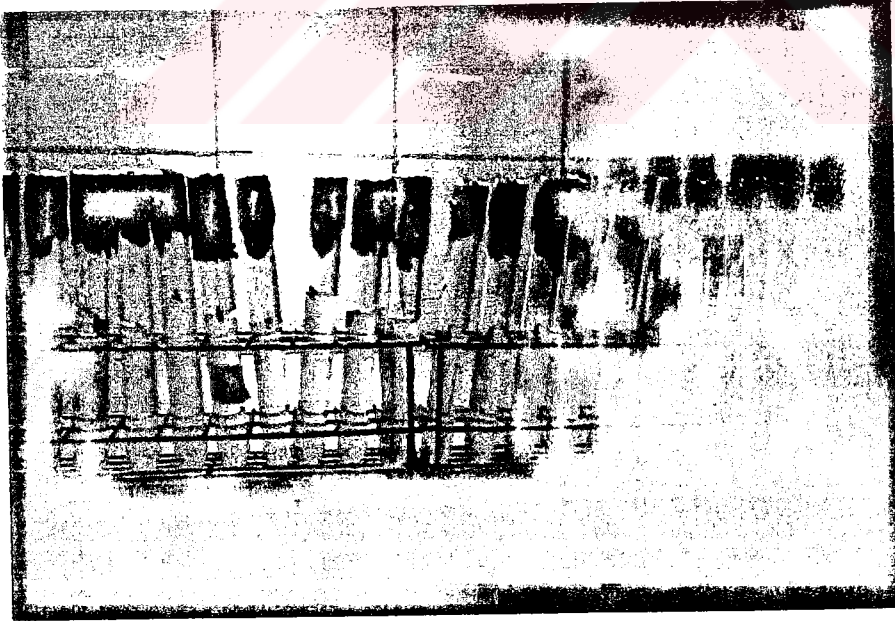
03 Ekim 1997 ve 19 Ekim 1997 tarihlerinde Yomra'dan, 2 farklı klondan alınan eksplantlar Tablo 5, 6 ve 7'de gösterilen farklı Zeatin, BAP, IAA ve IBA dozlarından oluşan ortamlara 20'şer adet konmuştur.

2 ve 4 hafta sonra yapılan gözlemlerde eksplantaların % 90'ının yaşadığı, enfeksiyon kapma oranının çok düşük olduğu gözlenmiştir. Yaşayan eksplantların tamamının yeşil kallus oluşturduğu, yalnız hiç sürgün vermediği saptanmıştır (Şekil 13).

18 Nisan 1998'de alınan eksplantlar 10, 20, 30 ve 40 gr/l sakkaroz içeren, hormonsuz WPM ortamlarına konmuştur. 2 hafta sonunda, internodlarından kesilerek ortamlara konan sürgün parçalarında kallus gelişmesi görülmemiş fakat eksplantlar canlılıklarını devam ettirmiştir (Şekil 14).



Şekil 13. Kallus Oluşturan *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis* Eksplantları



Şekil 14. Kallus Oluşturmayan *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis* Sürgün Parçaları

4. DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada, populasyonlarının kaybolma tehlikesiyle karşı karşıya kalmış endemik türler olmaları ve birey sayısı az, üretim materyali temini güç olan *Betula medwediewii* ve *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis* taksonlarının doku kültürü tekniği ile üretimi amaçlanmıştır.

4.1. *Betula medwediewii* ile İlgili Bulguların Değerlendirilmesi

B. medwediewii'de vejetasyon dönemi içinde 6 farklı ortetin kuzey ve güneye bakan taraflarından alınan koltuk tomurcukları ile çalışılmıştır. Her ortetten alınan 40 adet örnek 4 mg/l BAP dozunun kullanıldığı WPM ortamında kültüre alınmıştır. Kültür aşılama işleminden 2, 6 ve 10 hafta sonra yapılan gözlemlerle, klonlar ve eksplantın alındığı yönlerin eksplantların yaşama yüzdeleri, kallus ve sürgün oluşturma durumları üzerine etkileri araştırılmıştır.

2 hafta sonunda, 1 nolu klonun % 52.5 (21 adet)'i, 2 nolu klonun % 32.5 (13 adet)'i, 3 nolu klonun % 65 (26 adet)'i, 4 nolu klonun % 72.5'i, 5 nolu klonun % 67.5 (27 adet)'i ve 6 nolu klonun % 52.5 (21 adet)'i (Tablo 9) canlılığını sürdürebilmiş, diğerleri enfeksiyon nedeniyle ölmüşlerdir. 2 hafta içerisinde yaşayan eksplantların hiç birisi sürgün veya kallus oluşturmamıştır.

4 hafta sonunda bütün klonlarda sürgün ve yeşil kallus oluşumu gözlenmiştir. İlk oluşan sürgünler 1-2 cm kadar büyük yapraklar oluşturmuşlardır. Bu yapraklar kallus gelişimini hızlandırmak amacıyla kesilerek, eksplantlar kavanozlara aktarılmış ve daha geniş bir alan sağlanmıştır. Kavanozlara aktarıldıktan sonra kallus oluşumu hızlanmış, 6. haftada sürgün farklılaşmaları başlamıştır.

6 hafta sonunda, 1 nolu klonun % 35 (14 adet)'i, 2 nolu klonun % 7.5 (3 adet)'i, 3 nolu klonun % 30 (12 adet)'u, 4 nolu klonun % 42.5 (17 adet)'i, 5 nolu klonun % 47.5 (19 adet)'i ve 6 nolu klonun % 35 (14 adet)'i yeşil kallus oluşturmuş, diğerleri enfeksiyon nedeniyle ölmüştür.

10 hafta sonra yapılan gözlemlerde yaşama yüzdeleri Tablo 12'de görüldüğü gibi, 1 nolu klonda % 2.5, 2 nolu klonda % 5, 3 nolu klonda % 30, 4 nolu klonda % 35, 5 nolu klonda % 27.5 ve 6 nolu klonda % 2.5 olarak tespit edilmiştir.

Eksplantların alındığı ortetlerin yaşlı bireyler olması ve eksplantların vejetasyon dönemi içinde alınmış olması enfeksiyon oranının artmasına neden olmuştur. Yaşlı bireylerin genç bireylere göre daha fazla enfeksiyon taşımaları nedeniyle, KTÜ Orman Fakültesi serasındaki genç ortetten alınan eksplantlar üzerinde de çalışmaya gidilmiştir.

Yapılan Varyans Analizi sonuçlarına göre, % 95 güven düzeyinde, klonlar arasında yaşama yüzdesi bakımından fark vardır. En iyi yaşama yüzdesinin 4, 3 ve 5 nolu klonlarda, en kötü yaşama yüzdesinin ise 1 ve 6 nolu klonlarda olduğu Duncan Testi ile belirlenmiştir. Ortetler aynı yükselti, bakı ve yetiştirme ortamında bulunmalarına rağmen böyle bir farkın çıkması bireyler arasında genotipik bir farklılık olduğunu düşündürmektedir. Bakılar arasında yapılan Varyans Analizi sonucunda bir fark çıkmadığı saptanmıştır.

10. hafta sonunda sürgün boyları ve sürgün sayıları belirlenmek istenmiş, fakat sürgünler çok kısa olduğu için ölçüm yapılamamıştır.

10 hafta sonunda oluşan uzun sürgünler, 2 mg/l NAA dozu içeren WPM ortamında köklendirmeye alınmışlar ve 4 hafta sonunda köklenmişlerdir. Köklenen fidecikler 1:1 turba + perlit ortamına alınmış, fakat fidecikler sağlıklı olduğu için ölmüştür. 5 nolu klondan alınan rejenere sürgün yine 2 mg/l NAA içeren WPM ortamında 4 haftada köklenmiştir. Daha sonra 1:1 turba + perlit ortamında gelişerek sürgün vermiştir (Şekil 11 ve 12).

KTÜ Orman Fakültesi serasından alınan örneklerde, BAP + NAA kombinasyonları denenmesi yoluna gidilmiştir (Tablo 4, 5). 4 hafta sonunda yalnız 1 nolu ortamda 1.5 cm uzunluğunda yaprak gelişmiş, diğer ortamlardaki tomurcuklar açılmamışlardır (Şekil 9). 8 ve 10. hafta sonunda da 1 nolu ortam dışında yaprak veya sürgün gelişimi görülmemiş, az miktarda kallus oluşumu görülmüştür.

Murgul'dan alınan örneklerin vejetasyon dönemi içinde, KTÜ Orman Fakültesi serasından alınan örneklerin vejetasyon dönemi dışında alınması büyüme farklılıkları göstermiştir. Vejetasyon dönemi dışında alınan örnekler aynı ortamda (1 nolu ortam), Murgul'dan alınan örneklere göre daha yavaş gelişme ve farklılaşma göstermişlerdir.

Murgul'dan alınan örneklerde, 6 hafta sonunda sürgün farklılaşması başlamasına rağmen KTÜ serasından alınan örneklerde, 10 hafta sonunda sürgün farklılaşması görülmemiştir.

4.2. *Z. carpinifolia* Subsp. *Yomraensis* ile İlgili Bulguların Değerlendirilmesi

8 hafta sonunda, 8 farklı ortamda sürgün farklılaşması sağlanamamıştır. Ortama konan eksplantlarda enfeksiyon sorunu olmamış, % 90'ı yeşil kallus oluşturmuştur. Ortamlarda yüksek dozlarda hormon ve sitokin kullanılması, kallus gelişimini teşvik etmiş fakat sürgün gelişimine bir etkisi olmamıştır.

18 Nisan 1998'de alınan eksplantlar 10, 20, 30 ve 40 gr/l sakkaroz içeren, hormonsuz WPM ortamlarına konmuştur. 2 hafta sonunda, internodlarından kesilerek ortamlara konan sürgün parçalarında kallus gelişmesi görülmemiş fakat eksplantlar canlılıklarını devam ettirmiştir (Şekil 14). *Z. carpinifolia* subsp. *Yomraensis*'te bitkinin yapısından kaynaklanan enfeksiyon sorunu yoktur.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışmada, doğal yayılış alanında günümüzde çok az sayıda bireyin yaşadığı endemik türlerimizden *Betula medwediewii* ve çok dar bir yayılış alanına sahip *Zelkova carpinifolia* subsp. *Yomraensis* türlerinin, doku kültürü tekniklerinden meristem (organ) kültürüyle üretilmesi amaçlanmıştır.

Tomurcuk eksplantlarının kültüre alınmasında enerji kaynağı olarak kullanılan sakkarozun 20 gr/l dozunun, WPM ortamında daha iyi gelişme sağladığı belirlenen *Betula pendula* ortamı *Betula medwediewii*'de de kullanılmış ve oldukça iyi sonuç elde edilmiştir. Yine *Betula pendula*'da sürgün farklılaşması sağlamak amacıyla ortama eklenen 4 mg/l BAP dozu da *Betula medwediewii*'de iyi sonuç vermiş, kuvvetli sürgün oluşturmuştur. Sürgün boylarının yeterli boya ulaşmaması, boy büyümesini destekleyici hormonların eksikliğinden kaynaklanmıştır. Bu nedenle öksin ve sitokin kombinasyonlarından oluşan yeni ortamlar denenmiştir.

Farklı ortetlere ait tomurcuk eksplantlarının yaşama yüzdeleri farklılık göstermiş, ortetlerin kuzey ve güneye bakan taraflarından alınan tomurcuk eksplantlarının yaşama yüzdeleri istatistiksel anlamda bir farklılık göstermemiştir. 10 hafta sonunda en iyi yaşama yüzdesine 4 nolu klon, en kötü yaşama yüzdesine ise 6 ve 1 nolu klonlar sahiptir.

Uzun sürgün veren 3 nolu klondan kesilen sürgünler in vitroda 2 mg/l NAA dozunun kullanıldığı WPM ortamında köklendirmeye alınmış ve 4 hafta sonunda uzun ve kalın kökler oluşturmuşlardır. *Betula medwediewii* fidanı üretme çalışmalarında bu doz kullanılmalıdır. 5 nolu klondan alınan rejenere sürgünler yine aynı ortamda 4 haftada köklenmiş, 1:1 perlit + turba ortamına aktarıldıktan sonra gelişmeleri devam etmiştir.

KTÜ Orman Fakültesi serasından alınan eksplantlar, 8 farklı BAP + NAA kombinasyonundan oluşan ortamlarda kültüre alınmış, en iyi gelişmeyi 4 mg/l BAP kullanılan ve NAA içermeyen 1 nolu ortamda göstermiştir. Ancak Murgul'dan vejetasyon dönemi içinde alınan eksplantlara göre daha yavaş gelişmiştir. *Betula medwediewii*'nin doku kültürü ile üretiminde 1 nolu ortam kullanılmalı ve eksplantlar vejetasyon dönemi içinde alınmalıdır.

Ortetlerin yaşlı fertlerden seçilmesi, enfeksiyon oranını arttırmıştır. Bu nedenle ortetler seçilirken genç ve sağlıklı bireyler araştırılarak, eksplantlar bu bireylerden alınmalıdır.

Fenotipik seleksiyonla seçilen ve in vitroda en iyi gelişmeyi sağlayan klonlar belirlenmeli ve üretilmelidir. Vatanı dışında ünlü botanik bahçelerinde, parklarda süs bitkisi olarak yetiştirilen *Betula medwediewii* ülkemizde henüz herhangi bir parkta bulunmamaktadır. Oldukça güzel görünüşüyle, peyzaj açısından ve neslinin tükeniyor olması nedeniyle, botaniksel açıdan önemli olan bu ağaç türümüzün üretimi yapılmalı ve park, bahçelere dikilerek yaygınlaştırılmalıdır.

Z. carpinifolia subsp. *Yomraensis* eksplantları 8 farklı WPM ve MS ortamlarında kültüre alınmış, kallus oluşumu sağlanmış, sürgün farklılaşması sağlanamamıştır. Ortamlarda daha düşük dozlarda sitokin ve öksin konsantrasyonları denenmeli, araştırmalara devam edilmelidir.



6. KAYNAKLAR

1. Üçler, A.Ö., Titrek Kavak ve Kafkas İhlamurunun Doku Kültürü Teknikleri ile Üretilmesi, Doktora Tezi, KTÜ Orman Fakültesi, Trabzon, 1994.
2. Dinkel, A.M., In Vitro Propagation of Deciduous Trees, For. Res. Inst. Malaysia and Int. Dev. Res. Centre, (1989) 164-167.
3. Ahuja, M.R., Aspen, Techniques and Applications, Vol 4, Macmillan Publishing Co., New York, (1986) 626-651.
4. Şimşek, Y., Orman Ağaçları Islahına Giriş, Ormanlık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Muhtelif Yayınlar Serisi, No:65, Ankara, 1993.
5. Gönülşen, N., Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ve Uygulama Alanları, T.C. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Ege Tar. Arş. Ens. Müd., Yayın No:78, İzmir, 1987.
6. Kaya, Z., Işık, K., Biyoteknolojinin Ormanlıktaki Yeri ve Önemi, Orman Mühendisliği Dergisi, 9 (1988) 2-7.
7. Kaya, Z., Doku Kültürünün Orman Ağaçları Islah Çalışmalarındaki Yeri, Orman Mühendisliği Dergisi, 5 (1988) 12-19.
8. Akçidem, E., Doku Kültürü, Kavak ve Hızlı Gelişen Yabancı Tür Orman Ağaçları Araştırma Enstitüsü, 2 (1989) 63-66.
9. Anşin, R., Özkan, C.Z., Tohumlu Bitkiler (Spermatophyta), KTÜ orman Fakültesi Yayın No:19, Trabzon, 1993.
10. Yaltrık, F., Dendroloji Ders Kitabı II Angiospermae, İ.Ü. Orman Fakültesi Yayın No:420, İstanbul, 1993.
11. Anşin, R., Gerçek, Z., Türkiye Florası İçin Yeni Bir Zelkova Taksonu *Zelkova carpiniifolia* subsp. *Yomraensis*, Doğa-Tr. J. of Agriculture and Forestry, 15 (1991) 564-575.
12. Murashige, T., Skoog, F.A., A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay With Tobacco Tissue Cultures, Physiol. Plant., 15 (1962) 473-497.
13. Lloyd, G., McCrown, B., Commercially - Feasible Micropropagation of Mountain Laurel *Kalmia latifolia*, By Use of Shoot- Tip Culture, Comb. Proc. Intern. Plant. Prop. Soc., 30 (1981) 421-427.

14. Gökçe, F., In Vitro Regeneration of Anatolian Pine (*Pinus nigra* susp. *Pallasiana*) From Embryo Tissues, Master Thesis, Middle East Technical University, Ankara, 1993.
15. Kutlu, E., Siğilli Huş (*Betula pendula* Roth.)'un Doku Kültürü Teknikleri ile Üretilmesi, I Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, 23-25 Ekim 1995, Trabzon, Cilt IV, 119-125.
16. Kyte, L., Plants From Test Tubes. An Introduction to Micropropagation, Timber Press, ISBN 0-88192-040-1, Oregon, 1990.
17. Huhtinen, O., Yahyaoğlu, Z., Das fürühe Blühen von aus Kalluskulturen herangezogenen Pflanzchen bei der Birke (*Betula pendula* Roth.), Silvae Genetica, 23, 1-3 (1974) 32-34.
18. Yahyaoğlu, Z., Versuche zur Vegetativen Vermehrung von Fichte (*Pice abies*) und Birke (*Betula pendula*) Mit Hilfe der Gewebekulturtechnik, Doktora Tezi, Der Georg August Universitat, Göttingen, 1975.
19. Vihera-Aarnio, A., Ryyanen, L., Growth, Crown Structure and Seed Production of Birch Seedlings, Grafts and Micropropagated Plants, Silva Fennica, 29 1, (1995) 3-12.
20. Vijayakumar, N.K., Feret, P.P., Sharik, T.L., In Vitro Propagation of the Endangered Virginia Roundleaf Birch (*Betula uber*) Using Dormant Bud, Forest Science, 36 3 (1990) 842-846.
21. Perez, C., Postigo, P., Micropropagation of *Betula celtiberica*, Annals of Botany, 64 1 (1989) 67-69.
22. Ballester, A., Vieitez, A.M., Factors Affecting the Micropropagation of Birch, Arales de Edofologia y Agrobiologia, 46 5-6 (1987) 741-747.
23. Chalupa, V., Micropropagation of Conifer and Broadleaved Forest Trees, Communicationes Instituti Forestalis Cech., 13 (1987) 7-39.
24. Ide, Y., Yamamoto, S., In Vitro Plantlet Regeneration of Mature Monarch Birch (*Betula maximowicziana*) by Winter Bud Cultures, Journal of Japanese Forestry Society, 72 2 (1990) 147-150.
25. Saito, I., Ide, Y., Saito, A., Tissue Culture Technology in the Rapid Clonal Propagation of Japanese White Birch, Journal of Japanese Forestry Society, 68 8 (1986) 343-346.

7. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Sivas İlinin Yıldızeli İlçesinde doğan Gökçen HANGİŞİ, ilk öğrenimini Şeyhhalil Köyü İlkokulunda, orta öğrenimini Yavru İlköğretim Okulu ve Gölcük Barbaros Hayrettin Lisesinde 1989 yılında tamamladıktan sonra, 1990 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümünü kazandı. 1994 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisansa başladı. 1995-1996 yılları arasında Of Orman Fidanlığı Doku Kültürü Laboratuvarında yevmiyeli mühendis olarak çalıştı, Mayıs 1997'den beri Artvin AGM Başmühendisliğinde yevmiyeli mühendis olarak çalışmaya devam etmektedir. Evli olan Gökçen HANGİŞİ İngilizce bilmektedir.

