

## Çakıldak Fındık Çeşidinin *In vitro* Sürgün Ucu Kültürü İçin Yüzey Sterilizasyon Protokolünün Oluşturulması

Nuray KAPLAN, Ali İSLAM<sup>1</sup>, Hatice BİLİR EKİBİÇ<sup>1</sup>

Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ordu

(Geliş Tarihi/Received Date: 11.11.2020; Kabul Tarihi/Accepted Date: 10.12.2020)

### Öz

Bu çalışma, 2019 yılında, Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada eksplant olarak Çakıldak çeşidinin aktif büyüme dönemindeki sürgün uçları kullanılmıştır. Eksplantların bir kısmı %70 etil alkolde 10 sn süre ile bekletilmiş, diğer yarısına ise etil alkol uygulanmamıştır. Etil alkol uygulanmış ve etil alkol uygulanmamış tüm eksplantlar, farklı dozlarda sodyum hipoklorid (% 0, % 5, % 10 ve % 15) çözeltilerinde farklı sürelerde (0, 10, 15 ve 20 dakika) bekletilerek yüzey sterilizasyonları yapılmıştır. Deneme kapsamında uygulamaların karşılaştırılması amacıyla kararma oranı (%), enfeksiyon oranı (%), sağlıklı gelişen eksplant oranı (%) özellikleri incelenmiştir.

Eksplantların yüzey sterilizasyonu amacıyla ilk olarak % 70 etil alkolde 10 sn süre ile bekletme ve ardından % 5 dozundaki sodyum hipoklorid çözeltisinde 15 dakika bekletme uygulamaları tavsiye edilebilir.

**Anahtar kelimeler:** *Corylus avellana* L., *in vitro*, yüzey sterilizasyonu

## Establishment of Surface Sterilization Protocol for *In vitro* Shoot Tip Culture in Cakildak Hazelnut Variety

### Abstract

This study was carried out in tissue culture laboratory of Ordu University Faculty of Agriculture Department of Horticulture in 2019. In this study, shoot tips of Cakildak cultivar were used as explant material during active period of growth. Some of the explants were submerged for 10 second in 70 % ethyl alcohol, the other half were not treated with ethyl alcohol. Ethyl alcohol was treated and not treated explants were kept in different solutions of NaOCl (0 %, 5 %, 10 % and 15 %) for different periods (10, 15 and 20 minutes) and surface sterilization was performed.

According to the results of the study, it may be recommended to keep the explants for surface sterilization in 70 % ethyl alcohol for 10 seconds and then for 15 minutes in 5 % sodium hypochlorite solution.

**Keywords:** *Corylus avellana*, *in vitro*, surface sterilization

\*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: [haticebilirekbic@gmail.com](mailto:haticebilirekbic@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-2758-6713>

Ali İSLAM: [islamali@hotmail.com](mailto:islamali@hotmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-2165-7111>

Nuray KAPLAN: [nuray.kpln72@gmail.com](mailto:nuray.kpln72@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-5217-6898>

## **1. Giriş**

Türkiye ortalama 650 bin ton fındık üretimi ile dünyanın en önemli fındık üreticisi durumundadır (Anonim 2020). Fındık ülkemizde yaygın olarak dip sürgünü ile çoğaltılmakta olup tohumla, daldırma, çelikle ve aşı ile de çoğaltılabilmektedir. *Corylus colurna*'nın odun çelikleri ile çoğaltılması konusunda yapılan bir çalışmada farklı IBA dozları kullanılmış olup sonuçlarda köklenme oranının yüksek olmadığı (% 40) saptanmıştır (İslam ve ark 2019). Fındığın yeşil çelikleri kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise köklenme başarısı düşük bulunmuştur (Özçağırın ve ark 2014). Bu yöntemler her zaman hızlı ve ekonomik çoğaltma için yeterli olmadığından meyve türlerinin üretiminde diğer bir kitlesel çoğaltım yöntemi olan doku kültürü üzerinde yoğun çalışmalara başlanmıştır. Doku kültürü çoğaltma yöntemi, dünyada son zamanlarda yaygın olarak kullanılan bir teknik olup, geleneksel fındık çoğaltma tekniklerine bir alternatif olarak kabul edilmiştir (Diaz-Sala ve ark 1990; Yu & Reed 1995; Nas 2004).

Doku kültürü, steril şartlarda yapay besin ortamında bitkinin hücre, doku ve organlarından, çeşitli yöntemler kullanarak yeni hücre, doku, organ veya bitki üretilmesidir. Bitki doku kültürlerinin temel amacı yeni çeşit geliştirmeye yardımcı olmak veya var olan çeşitlerde genetik varyabilite sağlamaktır ve bu yöntemle bitki çoğaltımı daha kısa süreli ve kolaydır. In vitro tekniği ile üstün özelliklere sahip bitki çeşitlerinin seleksiyonu daha kısa sürmektedir. Ayrıca, kaybolma tehlikesi olan değerli türlerin korunması ve çoğaltılmasında doku kültürü teknikleri kullanılmaktadır (Radojevic ve ark 1975). Doku kültürü ile hastalısız sağlam bitkiler elde edilebilir, küçük bir alanda kitlesel olarak bitki üretiminin yapılabilmesi gibi birçok kolaylığı bulunmaktadır (Babaoğlu ve ark 2001).

Fındığın in vitro çoğaltılması konusunda Radojevic ve ark (1975) embriyo kültürünü kullanmıştır. Devam eden araştırmalarda çeşitli bitki materyalleri ve ortamları kullanılarak fındık doku kültürü için protokoller geliştirilmiştir (Hand 2013). Daha sonra apikal meristem, kök, sürgün ucu, tomurcuk gibi bitki kısımları kullanılmıştır (Perez ve ark 1987; Diaz-Sala ve ark 1990; Bassil ve ark 1990; Yu & Reed 1995; Bacchetta ve ark 2008; Caboni ve ark 2009).

Ülkemizin fındık üretimi ve ihracatında dünya ülkeleri arasında çok önemli bir konumda yer aldığı düşünülürse bu kadar yüksek ticari öneme sahip Türk fındık çeşitlerinin in vitro çoğaltımına yönelik çalışmaların yeterli olmaması dikkat çekicidir.

Doku kültürü çalışmalarında daha çok bakteri ve mantar kontaminasyonları görülmektedir. Maya, virüsler-mikoplazma ve insektisitlerden kaynaklanan kontaminasyonlara da nadir olarak ratlanmaktadır. Belirtilen kontaminasyon kaynakları akut veya latent özellikte olabilirler. Mantar nedeniyle oluşan kontaminasyonlar akut özellikte olup etkisi kısa sürede ortaya çıkarken latent kontaminasyonlar uzun süreli ve kalıcı etkiye sahiptirler. Latent kontaminasyonlar başlangıçta ekplant üzerinde kendilerini göstermezlerken ikinci ya da daha alt kültürlerde birden ortaya çıkabilirler. Bakteri kaynaklı kontaminasyonlar bu gruba örnek olarak verilebilir. Bu tür kontaminasyonlar endojen (bitki kaynaklı) veya ekzojen kaynaklı (hava koşulları, insan kaynaklı, toprak vb.) ortaya çıkabilmektedir. Kontaminasyonların azaltılmasında in vitro koşullarda çoğaltılacak bitkinin kontrollü şartlarda yetiştirilmesi önerilmektedir. Ayrıca her bir bitki türü hatta çeşidi için farklı yüzey sterilizasyon protokollerinin uygulanması da gerekli olabilmektedir. Yüzey sterilizasyon amacıyla ekplantlara farklı doz ve sürelerde sterilizantlar (etil alkol, sodyum hipoklorit, kalsiyum hipoklorit, merkürü klorit, hidrojen peroksit,..vb) uygulanabilmektedir.

Kontaminasyondan kaynaklı eksplant ölümlerinin önüne geçilmesi amacıyla yeni çeşit ya da türde *in vitro* çalışma gerçekleştirilecekse mutlaka yüzey sterilizasyon yönteminin oluşturulması amacıyla ön denemelerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, Çakıldak fındık çeşidinin sürgün ucu kullanılarak *in vitro* mikro çoğaltılması amacıyla farklı sterilizantlar farklı sürelerde denemeye alınmış ve en uygun yüzey sterilizantının, dozunun ve süresinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

Bu çalışma, Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür. Materyal olarak adaptasyon yeteneği yüksek, az verimli toprak ve yüksek alanlara uyumlu, buruşuk iç oranı yüksek, geç olgunlaşan, ilkbahar geç donlarına daha dayanıklı, randımanı % 50.8, yağ oranı % 60.6 ve protein oranı % 19.4 olan (Köksal 2002) Çakıldak fındık çeşidinin aktif büyüme dönemindeki sürgün ucu eksplantları kullanılmıştır. Bu eksplantların elde edilmesinde Ordu ili Fatsa ilçesinde yer alan üretici bahçesinden alınan çelikler kullanılmıştır. Eksplantlar çeliklerin 30 gün süreyle +4 °C'lik soğuk hava deposunda bekletilmesi sonrasında oda koşullarında su içinde sürdürülmesiyle temin edilmiştir.

### 2.1. Kullanılan Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan tüpler, bistüri, pens, kurutma kağıtlarının sterilizasyonları 121 °C'de ve 1.05 atm basıncındaki otoklavda 15 dakika süreyle tutularak yapılmıştır.

### 2.2. Besin Ortamları ve Sterilizasyonu

DKW ve MS ortamları kullanılmıştır. Ortamlara gerekli olan tüm kimyasallar ilave edilip saf su ile hacim tamamlandıktan sonra pH düzeyi 1 N HCl asit ve 1 N KOH ile 5.8'e ayarlanmıştır. Son olarak da katılaştırıcı olarak ortama agar ilave edilip kaynatılmıştır. Kaynamış olan ortam, her bir tüpe 10 ml olacak şekilde dağıtılıp tüplerin kapakları kapatılmış ve sonrasında 121°C ve 1.05 atm basıncındaki otoklavda 15 dakika süreyle tutularak sterilizasyonları gerçekleştirilmiştir.

### 2.3. Eksplantların Hazırlığı ve Kültüre Alınması

Çalışmada eksplant olarak Çakıldak çeşidine ait sürgün uçları çeliklerin sürdürülmesinden elde edilmiştir. Eksplantların yüzey sterilizasyonu için farklı uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Bunun için eksplantların bir kısmı kontrol grubu olarak saf suda (10, 15, 20 dakika) ve bir kısmı da % 70 etil alkolde 10 sn süre ile bekletilmiştir. Etil alkol uygulanmış ve uygulanmamış tüm eksplantlar, farklı dozlarda sodyum hipoklorid (% 0, % 5, % 10 ve % 15) çözeltilerinde farklı sürelerde (10, 15 ve 20 dakika) bekletilmiştir. Eksplantlar sonrasında steril kabin içinde steril saf su ile 3'er defa çalkalanmıştır (Şekil 1).

Çalışmada yüzey sterilizasyonu tamamlanan eksplantlar 2-3 cm uzunluğunda kesilerek hazırlanmıştır. Kesilen eksplantlar sürgün uçlarının sürmesinin teşviki amacıyla steril kabin içerisinde 1 mg/l BA içeren MS ortamının (Murashige Skoog 1962) yer aldığı tüplerde (15 cm x 2.5 cm) kültüre alınmıştır. Ardından tüplerin kapakları hava almayacak şekilde streç film ile sıkıca kapatılmıştır.



Şekil 1. Sürgünlerin yüzey sterilizasyonu ve kültüre alınmasından görüntüler

#### 2.4. Kültür koşulları

Kültürler, sıcaklığı  $25\pm 2$  °C, fotoperiyodu 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olacak şekilde ve ışıklanması 3000-4000 lüks (11 000-15 000 watt m<sup>-2</sup>) şiddetinde olan Cool daylight tipi beyaz floresan lambaların yer aldığı büyütme odasında tutulmuştur.

Çalışma kapsamında 2 haftalık kültüre alma sonrası dikimi yapılan sürgün uçlarından enfekteli olanların sayısının toplam eksplant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla enfeksiyon oranı (%); sürgün uçlarından kararanların sayısının toplam eksplant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla kararma oranı (%) ve dikimi yapılan sürgün uçlarından canlı kalanlarının sayısının toplam eksplant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla ise eksplantlarda canlılık oranı (%) belirlenmiştir.

#### 2.5. Deneme deseni ve istatistiksel analiz

Çalışma 3 tekerrürlü her tekerrürde 10 eksplant olacak şekilde faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine göre düzenlenmiştir. Yüzde değerlere istatistiksel analiz öncesinde açısız transformasyon uygulanmıştır. Farklı grupların tespiti % 5 önem seviyesinde LSD testinden yararlanılarak JMP 10.0 (v8.00, SAS Institute Inc., USA) istatistiksel paket programında gerçekleştirilmiştir.

### 3. Bulgular ve Tartışma

Yapılan yüzey sterilizasyon sonuçlarına göre Çizelge 1’de sodyum hipoklorid uygulamalarının enfeksiyon oranı üzerine etkisi istatistiksel açıdan  $P\leq 0.001$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Sodyum hipoklorid uygulamasının enfeksiyon oranlarının genel ortalamalarına bakıldığında tüm uygulamalar ayrı bir istatistik grupta yer almış ve en düşük enfeksiyon oranı % 7.0 ile % 15 NaOCl kullanımında belirlenmiştir. Enfeksiyon oranı üzerine uygulama süresinin etkileri de istatistiksel anlamda ( $P\leq 0.01$ ) önemli bulunmuştur ve en düşük enfeksiyon oranının 15 ve 20 dakika uygulamalarında olduğu tespit edilmiştir.

Sterilizasyonda alkol kullanımı enfeksiyon oranını istatistiksel olarak etkilemiş ( $P\leq 0.001$ ) ve alkol kullanımı enfeksiyon oranını yaklaşık % 53 oranında azaltmıştır. NaOCl x süre ikili etkileşimi önemsiz bulunmuştur. NaOCl oranı ve süredeki artışlara bağlı olarak enfeksiyon oranında bir düşme görülmekle birlikte kontrol uygulamasında süreye bağlı enfeksiyon oranında bir değişim görülmemiştir. NaOCl x alkol etkileşimi değerleri incelendiğinde NaOCl oranındaki artışa bağlı olarak enfeksiyon oranı azalmış olmakla birlikte bu etki alkol varlığında daha belirgin bulunmuştur. Alkol x süre etkileşimi istatistiksel anlamda  $P\leq 0.05$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Alkol enfeksiyon oranını azaltmış, süreye bağlı değişimde farklılıklar belirlenmiştir. Aynı durum 3’lü etkileşim değerlerini de etkilemiş ve NaOCl x süre x alkol etkileşimi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P\leq 0.05$ ).

**Çizelge 1. Uygulanan Sterilizantların Enfeksiyon Oranı (%) Üzerine Etkileri**

Sodyum hipoklorid oranı (%)	Süre (dakika)	Alkolsüz	Alkollü	Ortalama
<b>Kontrol</b>	10	90.00 a	90.00 a	90.00 a
	15	90.00 a	90.00 a	90.00 a
	20	90.00 a	90.00 a	90.00 a
	<b>Ortalama</b>	90.00 a	90.00 a	90.00 A
<b>% 5</b>	10	90.00 a	45.00 bc	67.50 b
	15	90.00 a	0.00 e	45.00 c
	20	60.00 b	15.00 de	37.50 cd
	<b>Ortalama</b>	80.00 a	20.00 c	50.00 B
<b>% 10</b>	10	90.00 a	0.00 e	45.00 c
	15	60.00 b	0.00 e	30.00 cde
	20	30.00 cd	15.00 de	22.0 def
	<b>Ortalama</b>	60.00 b	5.00 cd	32.50 C
<b>% 15</b>	10	30.00 cd	0.00 e	15.00 efg
	15	15.00 de	0.00 e	7.50 fg
	20	0.00 e	0.00 e	0.00 g
	<b>Ortalama</b>	15.00 cd	0.00 d	7.50 D
<b>Ortalama</b>	10	75.00 a	33.75 bc	54.38 A
	15	63.75 a	22.50 c	43.13 B
	20	45.00 b	30.00 c	37.50 B
	<b>Ortalama</b>	61.25 A	28.5 B	

LSD alkol:7.84\*\*\*; LSD NaOCl:11.23\*\*\*; LSD süre:9.73\*\*; LSD alkol x NaOCl:15.89\*\*\*;  
LSD alkol x süre:13.76\*; LSD NaOCl x süre:19.46;LSD alkol x NaOCl x süre:27.53\*

\* 0.01<P≤0.05; \*\* 0.001<P≤0.01; \*\*\* P≤0.001; ö.d. P>0.05 (önemli değil)

Farklı sürelerde sodyum hipoklorid ve alkol uygulamalarının kararma oranları üzerine etkisine bakıldığında tüm uygulamalar ayrı bir istatistik grupta yer almış ( $P \leq 0.001$ ) ve en düşük kararma oranı % 17.50 ile % 5 NaOCl kullanımında belirlenmiştir. Kararma oranı üzerine uygulama süresinin etkileri de istatistiksel anlamda önemli bulunmuş ( $P \leq 0.001$ ) ve en düşük kararma oranının 10 ve 15 dakika uygulamalarında olduğu tespit edilmiştir. Sterilizasyonda alkol kullanımının kararma oranını istatistiksel olarak etkilemiş ve alkol kullanımı ile kararma oranı artmış ve alkolsüz uygulamada % 27.50 olan kararma oranı alkollü uygulamada % 46.25'e çıkmıştır. NaOCl x süre ikili interaksyonu istatistiki açıdan  $P \leq 0.001$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Sodyum hipoklorid oranı ve süredeki artışlara bağlı olarak kararma oranında bir artma görülmekle birlikte kontrol uygulamasında süreye bağlı kararma oranında bir değişim görülmemiştir. NaOCl x alkol interaksyonu istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ( $P \leq 0.01$ ). Değerler incelendiğinde NaOCl oranındaki artışa bağlı olarak kararma oranında artma görülmüş olmakla birlikte bu etki alkol varlığında daha belirgin bulunmuştur. Alkol x süre interaksyonu istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuştur. Hypo x alkol x süre üçlü interaksyon istatistiksel açıdan  $P \leq 0.001$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Genel bir ifade ile NaOCl dozu ve süre artışına bağlı bir kararmada artış olduğu görülmüştür. Alkol kullanımı ile kararmaların bir miktar artış gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2).

Sodyum hipoklorid ve alkol uygulamalarının sağlıklı gelişen eksplant oranlarına etkileri istatistiksel olarak  $P \leq 0.001$  düzeyinde önemli bulunmuştur. En yüksek sağlıklı gelişen eksplant oranı % 22.50 ile % 5 NaOCl kullanımında belirlenmiş, diğer uygulamalar aynı grupta yer almıştır. Sağlıklı gelişen eksplant oranı üzerine uygulama süresinin etkileri istatistiksel anlamda önemsiz olduğu belirlenmiştir. Sterilizasyonda alkol kullanımının sağlıklı gelişen eksplant oranını etkilemiş ( $P \leq 0.001$ ) ve alkol kullanımı sağlıklı gelişen eksplant oranını

arttırmıştır. Alkolsüz uygulamada % 1.25 olan sağlıklı gelişen eksplant oranı alkol uygulamasında % 15.00'e kadar çıkmıştır (Çizelge 3).

**Çizelge 2.** Sterilizasyon Uygulamaları ve Sürelerinin Kararma Oranı Üzerine Etkileri (%)

Sodyum hipoklorid oranı (%)	Süre (dakika)	Alkolsüz	Alkollü	Ortalama
<b>Kontrol</b>	10	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	15	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	20	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	<b>Ortalama</b>	0.00 d	0.00 d	0.00 D
<b>%5</b>	10	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	15	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	20	30.00 cd	75.00 ab	52.50 b
	<b>Ortalama</b>	10.00 cd	25.00 c	17.50 C
<b>%10</b>	10	0.00 d	90.00 a	45.00 b
	15	30.00 cd	90.00 a	60.00 b
	20	60.00 bc	45.00 bc	52.50 b
	<b>Ortalama</b>	30.00 b	75.00 a	52.50 B
<b>%15</b>	10	45.00 bc	75.00 ab	60.00 b
	15	75.00 ab	90.00 a	82.50 a
	20	90.00 a	90.00 a	90.00 a
	<b>Ortalama</b>	70.00 a	85.00 a	77.50 A
<b>ORTALAMA</b>	10	11.25 c	41.25 ab	26.25 B
	15	26.25 bc	45.00 a	35.63 B
	20	45.00 a	52.50 a	48.75 A
	<b>Ortalama</b>	27.50 B	46.25 A	

LSD alkol:8.70\*\*\*; LSD NaOCl:12.31\*\*\*; LSDsüre:10.66\*\*\*; LSD alkolx NaOCl:17.41\*\*; LSDalkolxsüre:15.0; LSD NaOCl x süre:21.32\*\*; LSDalkolx NaOCl x süre:30.15\*\*\*

\* 0.01<P≤0.05; \*\* 0.001<P≤0.01; \*\*\* P≤0.001; öd. P>0.05 (önemli değil)

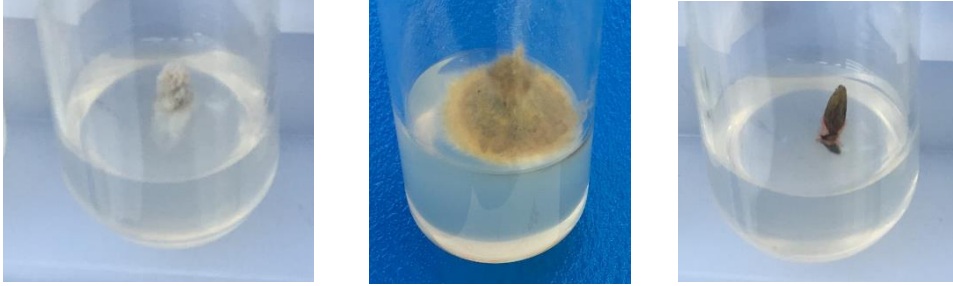
**Çizelge 3.** Sterilizasyon Uygulama ve Sürelerinin Sağlıklı Gelişen Eksplant Oranı Üzerine Etkisi (%)

Sodyum hipoklorid oranı (%)	Süre (dakika)	Alkolsüz	Alkollü	Ortalama
<b>Kontrol</b>	10	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	15	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	20	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	<b>Ortalama</b>	0.00 b	0.00 b	0.00 b
<b>%5</b>	10	0.00 d	45.00 b	22.50 b
	15	0.00 d	90.00 a	45.00 a
	20	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	<b>Ortalama</b>	0.00 b	45.00 a	22.50 a
<b>%10</b>	10	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	15	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	20	0.00 d	30.00 bc	15.00 bc
	<b>Ortalama</b>	0.00 b	10.00 b	5.00 b
<b>%15</b>	10	15.00 cd	15.00 cd	15.00 bc
	15	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	20	0.00 d	0.00 d	0.00 c
	<b>Ortalama</b>	5.00 b	5.00 b	5.00 b
<b>ORTALAMA</b>	10	3.75 bc	15.00 ab	9.38 A
	15	0.00 c	22.50 a	11.25 A
	20	0.00 c	7.50 bc	3.75 A
	<b>Ortalama</b>	1.25 B	15.00 A	

LSDalkol:7.53\*\*\*; LSDhypo:10.66\*\*\*; LSDsüre: öd.; LSDalkolxhypo:15.07\*\*\*; LSDalkolxsüre: öd.; LSDhypoxsüre:18.46\*\*\*; LSDalkolxhypoxsüre:25.93\*\*

\* 0.01<P≤0.05; \*\* 0.001<P≤0.01; \*\*\* P≤0.001; öd. P>0.05 (önemli değil)

NaOCl x süre ikili etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P \leq 0.001$ ). Sodyum hipoklorid oranı ve süredeki artışlara bağlı olarak % 5 NaOCl'nin 15 dakika uygulaması ile sağlıklı gelişen eksplant oranında en yüksek değer elde edilmiştir (% 45). Kontrol uygulamasında ve % 5 sodyum hipokloridin 20 dakikası, % 10 sodyum hipokloridin 10-15 dakikası ile % 15 sodyum hipokloridin 15-20 dakikasında süreye bağlı sağlıklı gelişen eksplant oranında bir değişim görülmemiştir. NaOCl x alkol etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P \leq 0.001$ ). Değerler incelendiğinde NaOCl oranındaki artışa bağlı olarak sağlıklı gelişen eksplant oranında artış görülmüş ve bu etki alkol varlığında daha belirgin bulunmuştur. Alkol x süre etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. NaOCl x süre x alkol etkisi önemli bulunmuş olup ( $P \leq 0.01$ ) sağlıklı gelişen eksplant oranını % 1.25'ten % 15'e kadar çıkarmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Çalışmada Belirlenen Farklı Kontaminasyon Görüntüleri

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bazı araştırmacıların yüzey sterilizasyonu aşamasında fındık sürgünlerini musluk suyu ile yıkadıktan sonra ve % 75 etil alkolde 30 saniye beklettikten sonra 7 dakika boyunca birkaç damla Tween-20 ile % 1 HgCl<sub>2</sub> çözeltisi ile dezenfekte etmiş ve sonra steril saf su ile 3-5 defa durulamışlardır (Gao ve ark. 2006). Thomson ve ark (2011) araştırmasında, bir yaşındaki sürgün ve dalları % 70'lik etanolde 1 dakika boyunca bekletmiş ve sonrasında biraz Tween-20 damlatmış % 2.5' lik NaOCl çözeltisinde 15 dakika bekletmiş ve ardından steril saf su ile durulamışlardır. Hand ve ark. (2016), fındık eksplantlarını 10 dakika musluk suyunda yıkadıktan sonra 4 damla Tween-20 bulunan % 20' lik sodyum hipoklorid çözeltisinde 10 dakika bekletildikten sonra iki kez steril su ile durulamışlardır. Perez ve ark (1985), fındık sürgün ve kotiledonlarını önce musluk suyunda yıkamış ve ardından % 95 etanolde 5 dakika bekletip su ile duruladıktan sonra % 1,05 sodyum hipoklorid çözeltisinde 30 dakika bekletmiş ve birkaç kez steril saf su ile durulamışlardır. Ellena ve ark (2014), fındık sürgün ucu eksplantlarını 20 dakika musluk suyunda yıkadıktan sonra % 95 etil alkolde 20 saniye bekletmiş ve saf su ile duruladıktan sonra % 9 NaOCl ve 20 damla Tween-20 bulunan çözeltide 20 dakika tuttukten sonra 4 kez steril saf su ile durulamışlardır. Yu & Reed (1993), fındık sürgün ucu eksplantlarını 10 dakika boyunca sabunlu suda yıkadıktan sonra musluk suyu ile durulamıştır. Ardından % 5 NaOCl + Tween-20 bulunan çözelti içinde 10 dakika bekletmiş ardından 2-3 defa steril saf su ile çalkalamışlardır.

#### 4. Sonuç ve Öneriler

Yapılan çalışmada Çakıldak fındık çeşidinin sürgün ucu kültürü ile in vitro çoğaltımında yüzey sterilizasyon amacıyla % 0 enfeksiyon ve kararma oranı ve % 90 eksplant canlılık oranı ile 10 saniye süreyle alkolde bekletme ve sonrasında % 5 sodyum hipoklorid ve 1-2 damla TWEEN-20 bulunan çözelti içinde 15 dakika tutulmasının en uygun olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma Çakıldak fındık çeşidinin sürgün ucu kullanılarak mikro çoğaltımında yüzey sterilizasyonu ile ilgili ilk çalışma niteliğindedir. Bu nedenle bulguları itibariyle önem arz etmektedir. Yüzey sterilizasyonu aşamasında kullanılan sterilizantların etkinliği bitkinin genetik yapısı ve çeşit ile ilgili olduğu kadar eksplantın alındığı zaman ve iklim koşulları ile de yakından ilgilidir. Yine farklı kültür koşulları, besi ortamları, eksplant kaynakları, sterilizantlar ve uygulama sürelerinin denenmesi önerilmektedir.

## Kaynaklar

1. Anonim (2020). Türkiye İstatistik Kurumu. www.tuik.gov.tr (Erişim tarihi: 06.01.2020)
2. Babaoğlu M, Yorgancılar M, & Akbudak M A (2001). Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri. (Editörler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya
3. Bacchetta L, Aramini M, Bernardini C & Rugini E (2008). In vitro propagation of traditional Italian hazelnut cultivars as a tool for the valorization and conservation of local genetic resources. *HortScience***43**(2): 562-566
4. Bassil NV, Rebhuhn BJ, Mok DW & Mok M C (1990). Micropropagation of the hazelnut, *Corylus avellana*. *HortScience***25**(9): 1100
5. Caboni E, Frattarell A, Meneghini M, Giorgioni M & Damiano C (2009). Micropropagation of hazelnut Italian cultivars. *Italus Hortus***16**(2): 102-105
6. Diaz-Sala C, Rey M, & Rodríguez R (1990). In vitro establishment of a cycloclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L.). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture***23**(3): 151-157
7. Ellena M, Masia A, & Marino G (2014). Physiological and biochemical aspect associated with the rizogenetics of hazelnut (*C. avellana* L.). *Acta Horticulturae*1052: 157-165
8. Gao X H, Liu JN & Ling Q (2006). Tissue Culture and Rapid Propagation of Hybrid Hazelnut (*Corylus heterophylla* × *C. avellana*). In XXVII International Horticultural Congress-IHC2006: International Symposium on Seed Enhancement and Seedling Production, 13-19 August, Seoul, South Korea.
9. Hand CR (2013). Improving initiation and mineral nutrition for hazelnut (*Corylus avellana*) micropropagation. Master Thesis, Oregon State University, USA
10. Hand CR, Wada N, Stockwell V & Reed BM (2016). Node position influences viability and contamination in hazelnut shoot explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***52**(6): 580-589
11. İslam A, Öger İ, Karagöl S & Turan A (2019). Farklı IBA uygulamalarının *Corylus colurna* L.'nin odun çelikleriyle köklenmesi üzerine etkisi. *Akademik Ziraat Dergisi* **8**(Özel Sayı): 45-48. ISSN: 2147-6403 DOI: <http://dx.doi.org/10.29278/azd.655495>
12. Köksal İ (2002). Türk Fındık Çeşitleri. Fındık Tanıtım Grubu Yayınları, Ankara
13. Murashige T & Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum***15**(3): 473-497
14. Nas MN (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
15. Özçağırın R, Ünal A, Özeker E & İsfendiyaroğlu M (2014). Ilıman İklim Meyve Türleri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları:3, İzmir



16. Pérez C, Rodríguez R, & Tamés RS (1985). "In vitro" filbert (*Corylus avellana* L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segments. *Plant Cell Reports*4(3): 137-139
17. Perez C, Rodriguez A, Revilla A, Rodriguez R & Sanchez-Tames R (1987). Filbert plantlet formation through " in vitro" culture. Symposium on In vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants. *Acta Horticulturae*212: 505-510
18. Radojević L, Vujičić R & Nešković M (1975). Embryogenesis in tissue culture of *Corylus avellana* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*77(1): 33-41
19. Thomson GE, & Deering TD (2011). Effect of cytokinin type and concentration on in vitro shoot proliferation of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*39(3): 209-213
20. Yu X & Reed BM (1993). Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) in vitro using glucose as a carbon source. *Plant Cell Reports*12(5): 256-259
21. Yu X & Reed BM (1995). A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus* species). *HortScience*30(1): 120-123