

Ceviz (*Juglans regia* L.) Fidanı Üretiminde Modern Yaklaşım: Doku Kültüründe Yüze Sterilizasyonunun ve Kültür Başlatmanın Detaylı Çözümlemesi


Duygu ÖZELÇİ*

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Kayısı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İslah ve Genetik Bölümü, Malatya, TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received: 23.12.2023

Kabul Tarihi/Accepted: 25.03.2024

ORCID ID

 orcid.org/0000-0003-1621-1980

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: duyguozelci@gmail.com

Öz: Bu çalışmada; Kozdere, Zengibar ve Chandler ceviz çeşitleri için etkili bir yüze sterilizasyonunun geliştirilmesi, kültür başlatmada farklı besi ortamları ve 6-benzilaminopürin (BAP) konsantrasyonlarının etkileşimi araştırılmıştır. Eksplant olarak ceviz çeşitlerinin aksiller tomurcukları kullanılmıştır. Doku kültürü çalışmalarının ilk aşaması yüze sterilizasyonudur. Yüze sterilizasyonu başarılı olan bitkilerin mikroçoğaltımı yapılabilmektedir. Araştırmada, ceviz materyallerine % 20, 30 ve 40 dozlarında sodyum hipoklorit ile sodyum hipokloritin yanı sıra bakır sülfat kullanılarak yüze sterilizasyonu yapılmıştır. Yüze sterilizasyonunda en az kontaminasyon (% 8.16) ve kararım (% 22.45) ile en fazla tomurcuk sürmesi (% 69.39) % 30 sodyum hipoklorit ve bakır sülfat uygulamasında Kozdere çeşidinde görülmüştür. Kültür başlatma ortamı olarak Murashige ve Skoog (MS) ile Driver ve Kuniyuki Walnut (DKW) besi ortamları kullanılmıştır. Besi ortamlarına 0.5, 1 ve 2 mg L⁻¹ BAP eklenmiştir. Ceviz çeşitlerinin çoğaltılmasında DKW ortamı MS ortamına göre daha başarılı bulunmuştur. DKW ortamına 2 mg L⁻¹ BAP ilavesi tüm çeşitler için sürgün uzaması, eksplant başı sürgün sayısı ve yaprak sayısı için en iyi sonuçları vermiştir. Ceviz çeşitleri arasında sürgün uzaması ölçümlerinde Kozdere çeşidinde, Zengibar ve Chandler çeşitlerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Sonuç olarak, ceviz çeşitlerinin *in vitro* çoğaltımında Kozdere çeşidinin kullanılabilirliği ortaya konulmuştur. Zengibar ve Chandler çeşitlerinin doku kültüründe çoğaltımında yöntem belirlemek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mikroçoğaltım, *in vitro*, eksplant, Zengibar, Kozdere, Chandler

A Modern Approach to Walnut (*Juglans regia* L.) Sapling Production: Detailed Analysis of Surface Sterilization and Culture Initiation in Tissue Culture

Abstract: In this study; the development of an effective surface sterilization for Kozdere, Zengibar and Chandler walnut cultivars and the interaction of different media and 6-benzylaminopurine (BAP) concentrations in culture initiation were investigated. Axillary buds of walnut cultivars were used as explants. The first stage of tissue culture studies is surface sterilization. Plants with successful surface sterilization can be micropropagated. In this study, walnut materials were surface sterilized by using sodium hypochlorite at doses of 20, 30 and 40% and copper sulphate in addition to sodium hypochlorite. The least contamination (8.16%) and darkening (22.45%) and the highest bud set (69.39%) were observed in Kozdere cultivar treated with 30% sodium hypochlorite and copper sulphate. Murashige and Skoog (MS) and Driver and Kuniyuki Walnut (DKW) media were used as culture initiation media. 0.5, 1 and 2 mg L⁻¹ BAP were added to the media. DKW medium was found more successful than MS medium in the propagation of walnut cultivars. The addition of 2 mg L⁻¹ BAP to DKW medium gave the best results for shoot elongation, number of shoots per explant and number of leaves for all cultivars. Among the walnut cultivars, Kozdere cultivar was found statistically significantly different from Zengibar and Chandler cultivars in shoot elongation measurements. As a result, it was revealed that Kozdere cultivar can be used for *in vitro* propagation of walnut cultivars. It is seen that more comprehensive studies are needed to determine the method for propagation of Zengibar and Chandler cultivars in tissue culture.

Keywords: Micropropagation, *in vitro*, explant, Zengibar, Kozdere, Chandler

1. Giriş

Ceviz, sert kabuklu bir meyve olup; Juglandaceae familyasına ait *Juglans* cinsi içerisinde yer almaktadır (Şen, 2011). *Juglans regia* L. ceviz türleri içinde yetiştiriciliği en fazla yapılan türdür (Akça, 2012). Anadolu'nun hemen her yerinde bulunan ceviz, ağacı ve meyveleriyle Türkiye'nin her köşesini zenginleştirmiş, halkın vazgeçilmez geçim kaynağı haline gelmiştir. Ekonomik değeri yüksek bu ürünün yetiştirilmesi için kurulan mevcut bahçelerin çoğu tohumdan yetiştirilen ağaçlardır. Ceviz ağaçlarının çiçek yapısı monoiktir. Cevizde erkek ve dişi çiçeklerin olgunlaşma zamanının farklı olması ve tozlanmanın rüzgârla gerçekleşmesi nedeniyle tam manasıyla heterozigot bir karakter görülmektedir. Bunun sonucu olarak cevizin tohumla çoğaltımı yapıldığı zaman genetik açılım meydana geldiğinden çoğaltılmak istenilen bitkinin özelliklerini göstermez. Diğer yandan cevizin vejetatif çoğaltımında daldırma yöntemi pratik olmadığından tercih edilmemektedir. Ayrıca, anatomik ve fizyolojik özelliklerinden dolayı çelikle çoğaltımında köklenme başarısı çok düşüktür. Ceviz fidanı üretiminde aşı ile çoğaltım yapılmaktadır (Şen, 2011).

Ceviz ile ilgili araştırmaların büyük çoğunluğu çeşit geliştirmeye yoğunlaşmıştır. Kaliforniya'da eskiden beri paradox çöğürleri (*J. hinsii* tohumları ve *J. regia* melezi) anaç olarak kullanılmaktadır. Paradox anaçlarından olan Vlach, Rx1 ve Vx211 anaçlarının klonal olarak çoğaldığı tespit edilmiştir. Bu anaçlardan Vlach anacı doku kültürü yoluyla ilk olarak çoğaltılan ve nematodlara karşı duyarlı, kuvvetli büyüyen bir klonal ceviz anacıdır (McGranahan ve Leslie, 1990). Ancak bu anaçların üretiminin tohum anaçlarına göre daha pahalı olması ve bulunabilirlik sorunları nedeniyle fidan üreticileri hala tohum anaçlarına yönelmektedir. Türkiye'de doku kültüründe çoğaltılan ceviz fidanı sayısı ise 2014 yılında 5.760 adettir (Sesli, 2016). Doku kültüründe ceviz anacı üretimi 2019 yılında 154.500 adet olmuştur (Anonim, 2022). Cevizin doku kültürüyle çoğaltılması konusunda Türkiye'de çok az sayıda çalışmada yapılmıştır (Fidancı, 2005; Şirin, 2014; Kepenek ve Kolağası, 2016; Yıldırım, 2018; Dirlik ve ark., 2022). Ceviz yetiştiriciliğinde gelişmiş bazı ülkeler, cevizde doku kültürü çalışmalarında başlangıçta başarılı olmasa bile ısrarlı araştırmalarla belli bir başarı elde etmişlerdir. Türkiye'de de bu konuda yapılacak farklı çalışmalardan elde edilecek sonuçlarla pratikte kullanılabilir bir başarı düzeyine ulaşılabilir (Dirlik, 2021).

Bitki doku kültürü, bitki hücreleri, dokuları veya organları gibi bitki materyalinin, kontrollü bir

laboratuvar ortamında aseptik şartlarda yetiştirilmesi ve çoğaltılmasını sağlayan bir biyoteknoloji yöntemidir. Bu teknik, genetik mühendisliği, bitki hastalıkları ile mücadele, bitki genetik kaynakları koruma ve nadir bitki türlerinin çoğaltılması gibi birçok uygulama alanında kullanılır. Bitki doku kültürü, bitkilerin hücresel seviyede manipülasyonunu ve kontrolünü sağlayarak genetik özelliklerin daha hızlı geliştirilmesini sağlar. Bitki doku kültürü başarıyla uygulanabilmesi için göz önüne alınması gereken bazı faktörler vardır. Her bitki türünün doku kültürüne farklı bir tepkisi söz konusudur. Doku kültürü genellikle bitki hücreleri, dokuları veya organları gibi belirli materyaller üzerinde gerçekleştirilir. Bu materyallerin seçimi, başarıyı etkiler. Genç, odunlaşmamış dokular *in vitro* kültürde yaşlı dokulara göre daha iyi reaksiyon göstermektedir (Hatipoğlu, 2018).

Doku kültürü çalışmalarında sterilizasyon aşaması çok önemlidir. Virüs, bakteri, mantar ve maya gibi mikroorganizmalar *in vitro* çalışmalarda bulaşık olarak kabul edilir. Doku kültüründe en önemli kayıplar kontaminasyon nedeniyle meydana gelir (Oyebanji ve ark., 2009). Kültür ortamında kullanılan eksplantın iç kısımlarında bulunan mikroorganizmalar bazen uzaklaştırılmadığından yüzey sterilizasyonu yeterli olamamaktadır. Başarılı bir sterilizasyon sağlanmaması sonucu mikroorganizmalar, eksplant ile rekabet ederek ortamda çoğalmaya başlar. Bunun sonucunda eksplantların büyümesi azalmakta, ardından nekroz oluşmakta ve eksplant kaybedilmektedir (Kane, 2003). Eksplantlar inhibe edileceği için bir sonraki aşamaya geçilemez ve çalışma başarısızlıkla sonuçlanır. Bu durum, zaman kaybı ve ekonomik kayıplara neden olur. Yüzey sterilizasyonunda kullanılan kimyasal madde ve konsantrasyonu önemlidir. Kullanılan dezenfektan ekplantın canlılığına etki etmemeli, yalnızca ekplanttaki mikroorganizmaları öldürmelidir.

Her bitki türü hatta aynı türün farklı çeşit ve genotipleri doku kültüründe çoğalmamaktadır. Bir çeşidin çoğaltımı için uygun olan protokol aynı türün başka çeşidi için uygun olmayabilir. Bunun nedeni genetik, hücresel, morfolojik ve fizyolojik farklılıklardır. Bu farklılıklar, doku kültürü sırasında gerekli olan ortam koşullarının ve besin maddelerinin türüne olan duyarlılıkları etkiler. Bu nedenle, her genotip için özel olarak optimize edilmiş doku kültürü protokolleri gereklidir.

Bu çalışma Kozdere, Zengibar ve Chandler ceviz (*J. regia* L.) çeşitlerinin doku kültürü ile çoğaltımında, etkili bir yüzey sterilizasyonunun geliştirilmesi ve kültür başlatma merhalesinde

sürdürülebilir bir protokolün belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Bu araştırma, Kayısı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ait Doku Kültürü Laboratuvarı'nda 2022 yılında yürütülmüştür. Araştırmada bitkisel materyal olarak Kozdere, Zengibar ve Chandler ceviz (*J. regia*) çeşitlerinin aksiller tomurcukları kullanılmıştır. Eksplantlar, Kayısı Araştırma Enstitüsü'nün Battalgazi kampüsünde bulunan 4-5 yaşındaki ağaçlardan alınmıştır.

Kozdere: Malatya Hekimhan ilçesinde 2010 yılında selekte edilen ince kabuklu, iç randımanı yüksek, iç rengi beyaz, kaliteli bir ceviz çeşididir. Çiçeklenme durumu protandridir. İç yüzdesi % 59 ve yağ oranı % 66.8'dir. İri ve iç randımanı yüksektir. Malatya ekolojisinde Eylül sonu Ekim başında hasat edilir. Yüksek rakımlı bölgelerde yetiştirilmesi tavsiye edilmektedir (Anonim, 2019a).

Zengibar: Malatya Darende ilçesinde 2010 yılında selekte edilen iri ve iç randımanı yüksek kaliteli bir ceviz çeşididir. Çiçeklenme durumu protandridir. İç yüzdesi % 52 ve yağ oranı % 68.1'dir. İri ve iç randımanı yüksektir. Malatya ekolojisinde Eylül ayında hasat edilmektedir (Anonim, 2019b).

Chandler: Dünyada ve Türkiye'de en popüler ticari ceviz çeşididir. Meyvesi oval şekillidir. Yüksek iç verimi ve meyve ağırlığı ile kendine has kokusu olan hibrit bir ceviz çeşididir (Çoban, 2023). Geç yapraklanması önemli özelliklerindedir. Yan dallarda % 80-90 oranında meyve verir (Ramos, 1998). İçi açık renklidir. İç ceviz oranı % 90-100, iç ceviz ağırlığı 6.5 g, iç oranı ise % 49'dur (Hendricks ve ark., 1998). Türkiye'de genel olarak ekim ayının ilk haftasında hasat edilmektedir.

2.2. Kullanılan alet ve ekipmanların sterilizasyonu

Kullanılan kültür kapları ve sterilizasyonu: Yüzey sterilizasyonu için 25x150 mm kapaklı kültür tüpleri kullanılmıştır. Kültür başlatma ortamında Magenta® Vessel GA-7 kültür kabı (77x77x97 mm) kullanılmıştır. Kültür kapları, otoklavda 121 °C'de, 1 atmosfer basınç altında, 20 dakika sterilize edilmiştir.

Pens, bistüri, mezür ve kâğıt malzemelerin sterilizasyonu: Pens ve bisturiler, % 96'lık etil alkol ile temizlenerek kurumaya bırakılmış, daha sonra alüminyum folyo ile sarılmıştır. Mezürün ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Steril

kabinde çalışırken kullanılan kurutma kağıtları parşömen kağıdına sarılmıştır. Hazırlanan tüm malzemeler 121 °C'de 20 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Yüzey sterilizasyonunda kullanılan kimyasalların özellikleri: Sodyum hipoklorit (NaClO), yüzey sterilizasyonunda en sık kullanılan kimyasaldır. Ayrıca, sodyum hipokloritin etkinliğini artırmak için yayıcı-yapıştırıcı olarak Tween 20 kullanılmıştır. Bakır sülfat (CuSO₄) hem fungal hem de bakteriyel hastalıklara karşı koruyucudur. Kültür ortamında enfeksiyon oluşmasını önlemek amacıyla kullanılmıştır.

Besi ortamının hazırlanması ve sterilizasyonu: Araştırmada, Murashige ve Skoog (MS, M0222 Duchefa) (Murashige ve Skoog, 1962) ile Driver ve Kuniyuki Walnut (DKW, D0247 Duchefa) (Driver ve Kuniyuki, 1984) besi ortamları kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonu besi ortamı hazırlamak için; 4.4 g MS, 30 g sukroz, 7 g agar, 1 mg L⁻¹ 6-benzilaminopürinin (BAP), 0.03 mg L⁻¹ indol-3-bütirik asit (İBA) ve 0.5 mg L⁻¹ gibberellik asit (GA₃) kullanılmıştır. Kültür başlatma besi ortamı hazırlamak için; 4.4 g besi ortamı, 30 g sukroz, 7 g agar, BAP farklı dozlarda, 0.03 mg L⁻¹ İBA ve 0.5 mg L⁻¹ GA₃ kullanılmıştır. Besi ortamlarının pH'sı 0.1 N NaOH ve 0.1 N HCl kullanılarak 5.75'e ayarlanmıştır. Besi ortamları balon joje içerisinde ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan ortam kaynatıldıktan sonra kültür tüplerine yaklaşık 12 ml, magentalara ise 40-70 ml dağıtılıp, kültür kaplarının kapakları kapatılmış ve otoklavda 1 atmosfer basınçta, 121 °C'de, 20 dakika sterilize edilmiştir.

2.3. Eksplantların alınması

Eksplantların alınacağı ağaçların genç, sağlıklı ve hastalıklı olmamalarına dikkat edilmiştir. Kullanılan budama makası çamaşır suyu ile temizlenmiştir. Doku ve organlar yaşlandıkça hücre bölünmesi ve rejenerasyon kapasitesi azaldığından çalışmada tek yıllık sürgünlerin aksiller tomurcukları kullanılmıştır. Eksplantlar bölünmenin hızlı olduğu Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında alınmıştır. Bitkilerden alınan tek yıllık sürgünlerin yaprakları kesilerek nemli beze sarılmış, en kısa sürede laboratuvara getirilerek yüzey sterilizasyonuna başlanmıştır.

2.4. Yüzey sterilizasyonu

Kontaminasyon gerçekleşmemesi için eksplantın üzerindeki mikroorganizmalardan veya endojen olan kontaminasyonlardan tamamen arındırılarak steril edilmiş olması gerekmektedir (Babaoğlu ve ark., 2002). Sterilizasyon aşamasında

NaClO ve CuSO₄ sterilizasyona etkisi araştırılmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirecek olan maddenin konsantrasyonu, kültüre alınacak olan bitkisel materyalde toksik etki yapmamalıdır. Bu nedenle araştırmada NaClO'nun % 20, 30 ve 40 dozlarının eksplant üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Laboratuvara getirilen sürgünler akan musluk suyu altında 4-5 kez yıkanmıştır. Sürgünlerden 1-2 cm boyunda aksiller tomurcuk içerecek şekilde mikroçelikler kesilmiş ve deterjanlı su ile yıkanmıştır. Bundan sonra tüm aşamalar steril kabinde yapılmıştır. Çalışmada NaClO % 20, 30 ve 40 konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Steril magentalara aktarılan çözeltilere 3-4 damla Tween 20 ilave edilmiş ve mikroçelikler eklenmiştir. Mikroçelikler 20 dakika NaClO'da ve devamında % 70'lik etil alkolde 1 dakika bekletilmiştir. Daha sonra mikroçelikler üç kez beş dakika steril saf su ile yıkanmış ve eksplantların üzerinde kalan fazla su steril edilmiş kurutma kağıdı ile uzaklaştırılarak yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. Bakır sülfat uygulanacak mikroçelikler % 20, 30 ve 40 konsantrasyonlarında hazırlanan NaClO çözeltisinde 20 dakika tutulmuştur. Süre bitiminde NaClO uygulanan mikroçelikler % 3'lük CuSO₄ çözeltisinde 20 dakika bekletilmiştir. Aynı sürelerde etil alkolde bekletme ve yıkama işlemleri yapılmıştır. Steril edilen mikroçelikler kültür tüplerine inoküle edildikten sonra 28 gün beklenmiş; kontaminasyon oranı, karar ve süren sürgün sayısı yüzde olarak belirlenmiştir.

Kontaminasyon oranı: Kontaminasyon görülen eksplantlar sayılmış ve toplam eksplant sayısına oranlanarak hesaplanmıştır.

Karar sürgün sayısı: Kararma görülen eksplantlar sayılmış ve toplam eksplant sayısına oranlanarak hesaplanmıştır.

Süren sürgün sayısı: Süren sürgünler sayılmış ve toplam eksplant sayısına oranlanarak hesaplanmıştır.

2.5. Kültür başlatma

Kültür başlatma aşamasında Kozdere, Zengibar ve Chandler çeşitlerinde, DKW ve MS besi ortamlarının ve farklı BAP konsantrasyonlarının (0.5, 1 ve 2 mg L⁻¹) etkisi araştırılmıştır. Sürdürülebilir protokol geliştirmek amaçlandığından sitokinin türevleri içinde ulaşması daha kolay ve ucuz olduğu için BAP tercih edilmiştir. Sitokinin, sürgün gelişimini teşvik ettiğinden doku kültürü çalışmalarında sürgün sayısını artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu aşamada eksplantların yüzey sterilizasyonu, araştırmada en iyi sonuç alınan % 30 NaClO ve CuSO₄ uygulaması ile yapılmıştır. Steril eksplantlar besi yerlerine transfer edilerek 28

günün sonunda sürgün uzunluğu ölçülmüş, eksplant başı yeni sürgün ve yaprak sayıları sayılmıştır.

Sürgün uzaması: Belirlenen süre sonunda süren sürgünler LTF marka 0-150 mm arası ölçüm yapabilen dijital kumpas kullanılarak ölçülmüştür.

Sürgün sayısı: Eksplanttaki süren sürgünler sayılarak hesaplanmıştır.

Yaprak sayısı: Süren sürgünlerdeki yapraklar sayılmıştır.

2.6. Kültür koşulları

Fenollerin oksitlenmesinde rol alan polifenol oksidaz enzim aktivitesi ışık tarafından arttığından ekimden sonra, kültürlerin 1 veya 2 gün tam karanlıkta bekletilmesinin kararmayı önlemede etkili olabileceği bildirilmiştir (Pittet ve Moncousin, 1981). Bu nedenle yüzey sterilizasyonu ve kültür başlatma aşamalarında besi ortamlarına inoküle edilen eksplantlar kararmayı engellemek için iki gün karanlıkta bekletilmiş; daha sonra 16 saat aydınlık, 8 saat karanlıkta, 4000 lüks floresan lamba altında, 25±1 °C'de, yaklaşık 4 hafta boyunca kültüre alınmıştır.

2.7. Analiz ve değerlendirme yöntemleri

Verilerin analizlerinde SPSS 27 programı, normal dağılıma uygunluk testi için Shapiro Wilks Testi kullanılmıştır. Testlerde anlamlılık düzeyi olan P değeri 0.05 olarak kabul edilmiştir. Uygunluk testi sonucunda normal dağılım göstermediği için parametrik olmayan testler ile analizler yapılmıştır (Mishra ve ark., 2019). İki grup çok bağımsız gruplu değişkenlerin karşılaştırmaları Kruskal Wallis testi ile yapılırken, Kruskal Wallis sonrası post-hoc karşılaştırmalar Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. İki gruplu bağımsız değişkenlerde karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi uygulanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Yüzey sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu çalışmasında; Kozdere, Zengibar ve Chandler çeşitlerinde yüzey sterilizasyonunda, uygun NaClO konsantrasyonunu belirlemek ve bakır sülfatın yüzey sterilizasyonuna etkisinin olup olmadığı amaçlanmıştır. Ceviz çeşitlerinde doku kültüründe etkili yüzey sterilizasyon protokolü belirlenmek için yapılan bu deneylerin sonucu Tablo 1'de verilmiştir. En düşük kontaminasyon oranı % 8.16 ile Kozdere çeşidinde % 30 NaClO + CuSO₄ uygulanan grupta, en yüksek ise Zengibar çeşidinde % 30 NaClO uygulamasında % 39.47

olarak saptanmıştır. En fazla kararan sürgün sayısı Chandler çeşidinde % 40 NaClO uygulamasında % 46.67 iken; en az kararma, Kozdere çeşidinde % 30 NaClO + CuSO₄ uygulamasında % 22.45 olarak saptanmıştır. Çalışmada, süren sürgün sayısı

en az Zengibar çeşidinde % 20 NaClO ile sterilize edilen uygulamada (% 22.22) belirlenirken, en fazla Kozdere çeşidinde % 30 NaClO + CuSO₄ uygulamasında % 69.39 olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Yüze sterilizasyonuna NaClO ve CuSO₄ çözeltilerinin etkisi

Table 1. Effect of NaClO and CuSO₄ solutions on surface sterilization

Çeşit	Ortam	Kontaminasyon oranı (%)	Kararan sürgün sayısı (%)	Süren sürgün sayısı (%)
Kozdere	%20 NaClO	26.19	45.24	28.57
	%30 NaClO	34.29	42.86	22.86
	%40 NaClO	38.24	35.29	26.47
	%20 NaClO + CuSO ₄	20.00	26.67	53.33
	%30 NaClO + CuSO ₄	8.16	22.45	69.39
	%40 NaClO + CuSO ₄	11.36	25.00	63.64
Zengibar	%20 NaClO	37.04	40.74	22.22
	%30 NaClO	39.47	34.21	26.32
	%40 NaClO	33.33	40.00	26.67
	%20 NaClO + CuSO ₄	26.92	28.85	44.23
	%30 NaClO + CuSO ₄	15.15	33.33	51.52
	%40 NaClO + CuSO ₄	17.39	34.78	47.83
Chandler	%20 NaClO	34.48	37.93	27.59
	%30 NaClO	30.77	42.31	26.92
	%40 NaClO	26.67	46.67	26.67
	%20 NaClO + CuSO ₄	27.45	35.29	37.25
	%30 NaClO + CuSO ₄	25.00	32.14	42.86
	%40 NaClO + CuSO ₄	21.57	37.25	41.18

Çeşitlerde değişkenlerin karşılaştırılması Tablo 2'de verilmiştir. Kontaminasyon, kararan ve süren sürgün sayısı ölçümlerinde çeşitler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 2). Sterilizasyonun bitiminde eksplantlar üç kez beş dakika steril saf su ile yıkanarak durulama yapılmıştır. Bu, NaClO ve CuSO₄ zararını azaltmak için oldukça önemlidir. Ayrıca eksplantların üzerinde kalan fazla su steril edilmiş, kurutma kağıdı ile uzaklaştırılarak dış kaynaklı kontaminasyon ihtimali engellenmeye çalışılmıştır. Eksplantlarda yaklaşık olarak 6. günde kontaminasyonlar gözlenmeye başlamış olup, gözlemler 28. günde sonlanmıştır. Cevizin yüze sterilizasyonunda dezenfektan olarak genellikle NaClO (Revilla ve ark., 1989; Fidancı,

2005; Kepenek ve Kolağası, 2016; Yıldırım, 2018; Dirlik ve ark., 2022) kullanılırken, mevcut çalışmada ilk kez CuSO₄ kullanılmıştır. Birçok odunsu bitkide olduğu gibi cevizin doku kültüründe çoğaltımında karşılaşılan en büyük sorun kararmalardır. Kararma, eksplantın kesildiği yüzeyle açığa çıkan fenollerin oksidasyonu ile meydana gelmektedir. Kararmayı engellemek için ortama polivinil piroolidon, sitrik asit, askorbik asit, aktif kömür, tiyoüre, L-sistein, glutamin, aspargin, argenin gibi antioksidant maddeler eklenebilir veya sık sık alt kültüre alınabilir (Rout ve ark., 1999). Uğur (2020), DO1 anacının (*Prunus domestica*) *in vitro* sterilizasyon protokolünü belirlemeye çalışmıştır. Araştırmada, anacın aksiller tomurcuklarına dört farklı sterilizasyon

Tablo 2. Çeşitlerde değişkenlerin karşılaştırılması

Table 2. Comparison of variables in cultivars

Değişkenler	Gruplar	Ortalama±ss	Medyan (Min-Max)	Kruskal Wallis	P değeri
Kontaminasyon oranı (%)	Kozdere	23.04±12.12	23.10(8.16-38.24)	0.924	0.630
	Zengibar	28.22±10.20	30.13(15.15-39.47)		
	Chandler	27.66±4.50	27.06(21.57-34.48)		
Kararan sürgün sayısı (%)	Kozdere	32.92±9.67	30.98(22.45-45.24)	1.636	0.441
	Zengibar	35.32±4.44	34.50(28.85-40.74)		
	Chandler	38.60±5.17	37.59(32.14-46.67)		
Süren sürgün sayısı (%)	Kozdere	44.04±20.54	40.95(22.86-69.39)	0.723	0.697
	Zengibar	36.46±12.79	35.45(22.22-51.52)		
	Chandler	33.74±7.55	32.42(26.67-42.86)		

ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum

ajanının (civa klorür, sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit, ve gümüş nitrat) çeşitli konsantrasyonları ve farklı uygulama süreleri denenmiştir. Bu çalışma sonucunda, NaClO uygulamalarında diğer dezenfektanlara göre en yüksek aseptik eksplant ve en düşük eksplant gözlemlendiği; ayrıca, toksik bir etkiye sahip olan civa klorürün yüzey sterilizasyonunda olumsuz sonuçlar verdiğini bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, MS ortamında kültüre alınan 152 ceviz genotipinin başlangıç kültüründe minimum eksplant kararmasının % 78.22, sağ kalımın ise en fazla % 23.45 olduğu rapor edilmiştir (Lone, 2017). Kaman 1 ceviz çeşidinin, MS ortamının içerdiği bitki düzenleyici oranına bağlı olarak kararma oranının % 93.33 (0.5 mg L⁻¹ BAP + 1 mg L⁻¹ İBA) ile % 33.3 (0.5 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ İBA) arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (Şirin, 2014). Meier-Dinkel ve Wenzlitschke (2015) başlangıç aşamasında kontaminasyon ve eksplantların kahverengileşmesini ciddi sorunlar olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, eksplantların sağ kalım oranı çok düşük bulunmuştur. Yapılan araştırmada kararan sürgün sayısı kontamine eksplanttan daha fazla olmuştur. Literatürdeki araştırmalardan farklı olarak yüzey sterilizasyonunda CuSO₄ ve % 30 NaClO uygulamasında enfeksiyon ve kararma oranları en az olup yüksek oranda eksplant sürmüştür.

3.2. Kültür başlatma

Bitki doku kültürü başarı oranları bitki türlerine, kültür koşullarına ve kullanılan protokollere bağlı olarak değişebilir. Kozdere, Zengibar ve Chandler çeşitlerinin mikroçoğaltımında kültür başlatma aşamasında, MS ve DKW besi ortamlarının; ayrıca 0.5, 1 ve 2 mg L⁻¹ BAP konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Çeşitlerin, MS ve DKW ortamı ile farklı BAP konsantrasyonunun sürgün uzaması, eksplant başı yeni sürgün sayısı ve yaprak sayısı sonuçları Tablo 3'te verilmiştir. Sürgün uzaması en yüksek 4.85 cm olarak DKW ortamında 2 mg L⁻¹ BAP uygulamasında Kozdere çeşidinde; en düşük ise 1.68 cm ile MS ortamında 0.5 mg L⁻¹ BAP uygulamasında Chandler çeşidinde ölçülmüştür. Eksplant başı yeni sürgün sayısı en az 1.33 adet olarak MS ortamı 0.5 mg L⁻¹ BAP uygulamasında Chandler çeşidinde, en fazla 3.27 adet ile DKW ortamı 2 mg L⁻¹ BAP uygulamasında Kozdere çeşidinde bulunmuştur. En fazla eksplant başı yaprak sayısı 4.2 adet ile DKW ortamında 2 mg L⁻¹ BAP konsantrasyonu ile Kozdere çeşidinde, en az ise 1.73 adet ile MS ortamı 0.5 mg L⁻¹ BAP uygulamasında aynı çeşitte saptanmıştır (Tablo 3). Bitki doku kültürlerinde en yaygın olarak kullanılan besi ortamı Murashige ve

Skoog (1962) tarafından geliştirilen MS besin ortamıdır. Bu besin ortamı bitki rejenerasyonunu başlatmak için yeterli besinleri içermektedir. Driver ve Kuniyuki (1984) tarafından oluşturulan DKW besi ortamı, başlangıçta ceviz bitkisinde sürgün çoğaltımı ve kallus gelişimi için kullanılmıştır. DKW ortamı, MS besi ortamına kıyasla daha yüksek konsantrasyonda kalsiyum elementine sahiptir (Rudiyanto ve ark., 2021). Kozdere ve Chandler çeşitlerinde DKW ortamında sürgün uzaması, sürgün sayısı ve yaprak sayısı ölçümlerinde MS ortamına göre en iyi sonuçları vermiş ve istatistiksel olarak fark bulunmuştur (p<0.05). Zengibar çeşidinde ise DKW ortamında sürgün uzaması ve yaprak sayısı ölçümleri MS ortamına göre, sürgün sayısında ölçümlerinde ise MS ortamı 0.5 mg L⁻¹ BAP uygulaması ile DKW ortamı 2 mg L⁻¹ BAP uygulaması arasında istatistiksel olarak fark vardır (p<0.05) (Tablo 3).

Çeşitler arasında değişkenlerin karşılaştırılmasına ait sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir. Kozdere çeşidinde 2.77 cm ile en yüksek sürgün uzaması tespit edilmiş; Zengibar ile Chandler çeşitlerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0.05). Eksplant başı yeni sürgün sayısı ve yaprak sayısı ölçümlerinde çeşitler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır (p>0.05). Dünyada 1980'li yıllardan itibaren cevizin doku kültüründe çoğaltımı ile ilgili birçok bilimsel çalışma yayınlanmıştır. Ancak çeşit veya genotipe özgü doğru bir çoğaltım protokolünün oluşturulmasıyla ilgili yeterli bilgi hala yoktur (Julian ve ark., 2020). Dirlik ve ark. (2022), paradox ceviz anacına ait nodları kullanarak birim eksplant başına düşen en yüksek sürgün sayısını 1.05 sürgün/eksplant olarak 4 mg L⁻¹ BAP içeren DKW ortamında belirlemiştir. Şirin (2014) Kaman 1 çeşidinin MS ortamına eklenen 0.5 mg L⁻¹ BAP ve 0.5 mg L⁻¹ İBA konsantrasyonları ile en çok sürgün oluşumu sağlayan ortam olduğu; eksplant başı yaprak sayısının 3.00 ile 5.33 adet arasında değiştiğini saptamıştır. Revilla ve ark. (1989) cevizin mikroçoğaltımında en iyi büyümenin, 1 mg L⁻¹ BAP ve 0.1 mg L⁻¹ İBA içeren ortamında saptandığını bildirmiştir. Navatel ve Bourrain (2001), cevizde genotipler arasında sürgün uzunluğu ve sürgün oluşum oranı açısından önemli farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir. Ceviz yetiştiriciliğinin geliştiği ülkelerde cevizin mikroçoğaltımı konusunda birçok çalışma yapılarak önemli bilgi birikimi ve deneyim edinilmiştir. Yapılan çalışmaların çoğunda kültür ortamına eklenecek uygun bitki gelişme düzenleyici ve konsantrasyonu üzerine yoğunlaşmıştır (Penuela ve ark., 1988; Revilla ve ark., 1989; Rodriguez ve ark., 1991).

Tablo 3. Çeşitlerin MS ve DKW ortamında farklı BAP konsantrasyonuyla kültür başlatma sonuçları*
Table 3. Culture initiation results of cultivars with different BAP concentration in MS and DKW media*

Çeşit	Ortam	Sürgün uzaması (cm)		Sürgün sayısı (adet eksplant ⁻¹)		Yaprak sayısı (adet eksplant ⁻¹)	
		Ortalama±ss	Medyan (Min-Max)	Ortalama±ss	Medyan (Min-Max)	Ortalama±ss	Medyan (Min-Max)
Kozdere	MS+0.5 mg L ⁻¹ BAP	1.83±0.32 ^a	1.80(1.3-2.3)	1.87±0.83 ^a	2(1-3)	1.73±0.80 ^a	2(1-3)
	MS+1 mg L ⁻¹ BAP	2.51±0.74 ^b	2.30(1.5-3.8)	2.27±0.70 ^a	2(1-3)	2.27±0.70 ^a	2(1-3)
	MS+2 mg L ⁻¹ BAP	3.48±0.54 ^a	3.50(2.6-4.5)	2.40±0.63 ^a	2(1-3)	3.07±1.03 ^b	3(1-5)
	DKW+0.5 mg L ⁻¹ BAP	1.96±0.24 ^c	2.00(1.5-2.3)	1.50±0.65 ^c	1(1-3)	1.79±0.70 ^a	2(1-3)
	DKW+1 mg L ⁻¹ BAP	3.99±0.48 ^d	3.90(3.0-4.6)	2.73±1.03 ^a	3(1-4)	2.27±0.80 ^a	2(1-4)
	DKW+2 mg L ⁻¹ BAP	4.85±0.51 ^{ae}	4.80(4.0-5.9)	3.27±1.03 ^b	4(2-5)	4.20±1.26 ^c	4(2-6)
Kruskal Wallis		71.278	26.903	38.808			
P değeri		0.001	0.001	0.001			
Zengibar	MS+0.5 mg L ⁻¹ BAP	1.75±0.38 ^a	1.90(1.2-2.3)	1.87±0.64 ^a	2(1-3)	2.07±0.96 ^a	2(1-4)
	MS+1 mg L ⁻¹ BAP	1.91±0.30 ^a	1.90(1.5-2.4)	2.07±0.70 ^a	2(1-3)	2.60±0.63 ^a	3(2-4)
	MS+2 mg L ⁻¹ BAP	2.54±0.41 ^b	2.50(1.9-3.2)	2.13±0.64 ^a	2(1-3)	2.73±0.80 ^a	3(2-5)
	DKW+mg L ⁻¹ 0.5 BAP	1.82±0.38 ^a	1.75(1.3-2.4)	1.86±0.77 ^{ab}	2(1-3)	2.00±0.55 ^a	2(1-3)
	DKW+1 mg L ⁻¹ BAP	2.77±0.52 ^c	2.80(1.9-4.0)	2.20±0.77 ^a	2(1-3)	3.13±0.64 ^b	3(2-4)
	DKW+2 mg L ⁻¹ BAP	3.14±0.61 ^d	3.25(2.0-3.9)	3.14±0.86 ^{ac}	3(2-5)	3.71±0.91 ^c	4(2-5)
Kruskal Wallis		53.392	18.306	33.603			
P değeri		0.001	0.003	0.001			
Chandler	MS+0.5 mg L ⁻¹ BAP	1.68±0.36 ^a	1.60(1.2-2.4)	1.33±0.49 ^a	1(1-2)	2.07±0.70 ^a	2(1-3)
	MS+1 mg L ⁻¹ BAP	2.99±0.77 ^b	3.40(1.7-3.8)	1.67±0.49 ^a	2(1-2)	2.73±0.96 ^a	3(1-4)
	MS+2 mg L ⁻¹ BAP	2.97±0.70 ^a	3.20(1.9-3.8)	2.27±0.80 ^b	2(1-3)	3.13±0.74 ^b	3(2-4)
	DKW+0.5 mg L ⁻¹ BAP	1.71±0.24 ^c	1.65(1.4-2.3)	1.71±0.47 ^a	2(1-2)	2.43±1.09 ^a	2(1-4)
	DKW+1 mg L ⁻¹ BAP	2.80±0.76 ^d	2.80(1.4-3.8)	2.27±0.70 ^c	2(1-3)	2.40±0.63 ^c	2(1-3)
	DKW+2 mg L ⁻¹ BAP	3.98±0.81 ^e	4.10(2.1-5.0)	2.87±0.92 ^d	3(1-4)	3.20±0.78 ^d	3(2-2)
Kruskal Wallis		55.143	31.757	17.984			
P değeri		0.001	0.001	0.003			

*: Aynı grupta aynı harfle gösterilen grup içi farklılık istatistikî açıdan önemli değildir, ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum

Tablo 4. Çeşitlerde değişkenlerin karşılaştırılması
Table 4. Comparison of variables in cultivars

Değişkenler	Gruplar	Ortalama±ss*	Medyan (Min-Max)	Kruskal Wallis	P değeri
Sürgün uzaması (cm)	Kozdere	2.77±1.23 ^a	2.45(1.80-5.10)	18.524	0.001
	Zengibar	2.12±0.56 ^b	2.05(1.50-3.00)		
	Chandler	2.30±1.18 ^b	1.85(1.40-4.60)		
Sürgün sayısı (adet eksplant ⁻¹)	Kozdere	1.67±1.21	1.00(1.00-4.00)	5.217	0.074
	Zengibar	1.67±1.21	1.00(1.00-4.00)		
	Chandler	1.83±1.33	1.00(1.00-4.00)		
Yaprak sayısı (adet eksplant ⁻¹)	Kozdere	2.00±1.67	1.00(1.00-5.00)	2.987	0.225
	Zengibar	2.33±0.52	2.00(2.00-3.00)		
	Chandler	2.66±0.94	3.00(1.00-4.00)		

*: Aynı grupta aynı harfle gösterilen grup içi farklılık istatistiki açıdan önemli değildir, ss: Standart sapma, Min: Minimum, Max: Maksimum

4. Sonuçlar

Sterilizasyon aşamasına CuSO₄ dahil edilmesi sonucunda enfeksiyon oranında sayısal olarak azalma gözlemlenmiştir. Yüzey sterilizasyonu için % 30 NaClO uygulaması ile CuSO₄'ün birlikte kullanılması sayısal olarak en başarılı sonucu vermiştir. Ancak ceviz çeşitleri arasında kontaminasyon oranı, kararın ve süren sürgün sayılarında farklılıklar gözlemlenmemiştir. Ceviz çeşitleri için besi ortamı ve BAP'ın doğru kombinasyonunun optimize edilmesi, verimli bir rejenerasyon protokolü oluşturmak için kritik öneme sahiptir. Kozdere çeşidi en fazla sürgün uzaması ve sayısı, en az kontaminasyon oranı ve kararın sürgün sayısı ile ön plana çıkmıştır. Ceviz çeşitlerinin çoğaltılmasında DKW ortamının MS ortamına göre daha başarılı sonuçları olduğu görülmüştür. DKW ortamının kullanılması ceviz çeşitlerinin mikroçoğaltımında daha başarılı sonuçların alınmasına yardımcı olabilir. Doku kültürü ile çoğaltımda bitki büyüme düzenleyicilerin etkisinin önemli olduğu anlaşılmıştır. DKW besi ortamı 2 mg L⁻¹ BAP konsantrasyonunda Kozdere çeşidinin sürgün uzunluğu, eksplant başı sürgün ve yaprak sayısı değerlerinin en iyi olduğu bulunmuştur. Araştırma bulgularına göre, Kozdere çeşidi, Zengibar ve Chandler çeşidine göre doku kültüründe çoğaltım için daha uygun bulunmuştur. Bu çalışma, Kozdere çeşidinin sürgün proliferasyonu, köklendirme ve aklimatizasyon protokollerinin geliştirilmesine bağlı olarak ilerleyen çalışmalara referans olacaktır. Kozdere, Zengibar ve Chandler çeşitlerinin mikroçoğaltımında bundan sonra yapılacak çalışmalara yön verebilecek sonuçlar alınmıştır.

Etik Beyanı

Yazar, bu araştırma için etik onay gerekmediğini beyan eder.

Finansman

Bu araştırma, hiçbir dış finansman almamıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazar tarafından herhangi bir çıkar çatışması beyan edilmemiştir.

Kaynaklar

- Akça, Y., 2012. Ceviz Yetiştiriciliği. Anıt Matbaası, Ankara.
- Anonim, 2019a. Kozdere Ceviz Çeşidi. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Kayısı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Çiftçi Eğitim Serisi, Yayın No: 2019/1, (<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/kayisi/Belgeler/TescilliCesitler/Ceviz/Kozdere.pdf>), (Erişim Tarihi: 06.02.2024).
- Anonim, 2019b. Zengibar Ceviz Çeşidi. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Kayısı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Çiftçi Eğitim Serisi. Yayın No: 2019/2, (<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/kayisi/Belgeler/TescilliCesitler/Ceviz/Zengibar.pdf>), (Erişim Tarihi: 06.02.2024).
- Anonim, 2022. Fidancılık Sektör Analizi ve Geliştirme Raporu. Fidan Üreticileri Alt Birliği, (<https://fuab.org.tr/yukleme/fidancilik-sektor-analiz-ve-gelistirme-raporu-2022.pdf>), (Erişim Tarihi: 18.12.2023).
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2002. Bitki Biyoteknolojisi-I, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Çoban, F., 2023. Gibberellik asit, asetil salisilik asit ve katlama uygulamalarının ceviz (*Juglans regia* L.) tohumlarının çimlenmesi ile çöğür gelişimi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- Dirlik, C., 2021. Ceviz (*Juglans regia* L.) bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltımı üzerine kültür tiplerinin etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Dirlik, C., Kandemir, H., Çetin, N., Şen, S., Güler, B., Gürel, A., 2022. Effects of different culture media

- compositions on in vitro micropropagation from paradox walnut rootstock nodes. *Gazi University Journal of Science, Part A*, 9(4): 500-515.
- Driver, J.A., Kuniyuki, A.H., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19(4): 507-509.
- Fidancı, A., 2005. Şebın ve Kr-2 ceviz çeşitlerinin *in vitro*'da hızlı çoğaltılma tekniklerinin belirlenmesi. *Bahçe*, 34(1): 239-246.
- Hatipoğlu, R., 2018. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Genel Yayın No: 190, Ders Kitapları Yayın No: A-58, Adana.
- Hendricks, L., Coates, W., Elkins, R., McGranahan, G., Phillips, H., Ramos, D., Reil, W.O., Snyder, R., 1998. Selection of varieties. In: D.E. Ramos (Ed.), *Walnut Production Manual University of California*, Oakland, pp. 84-89.
- Julian, L.M.R., Alexandru, F., Georgi, C., 2020. Micropropagation of valuable walnut genotypes for timber production: new advances and insights. *Annals of Silvicultural Research*, 44(1): 5-13.
- Kane, M., 2003. Bacterial and fungal indexing of tissue cultures. *Journal of Allergy and Immunology*, 94: 393-400.
- Kepenek, K., Kolağası, Z., 2016. Micropropagation of walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Physica Polonica A*, 130(1): 150-156.
- Lone, I.A., 2017. Effect of different growth regulator combinations on *in vitro* callusing of walnut (*J. regia* L.). *An Asian Journal of Soil Science*, 12(1): 202-209.
- McGranahan G.H., Leslie, C.A., 1990. Walnuts (*Juglans*). In: J.N. Moore and J.R. Ballington (Eds.), *Genetic Resources of Fruit and Nut Crops*, Vol. 2, Acta Horticulturae, Wageningen, The Netherlands, pp. 907-951.
- Meier-Dinkel, A., Wenzlitschke, I., 2015. Micropropagation of mature *Juglans* hybrids. *VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants*, 19-24 April, Sanremo, pp. 85-92.
- Mishra, P., Pandey, C.M., Singh, U., Gupta, A., Sahu, C., Keshri, A., 2019. Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 22(1): 67-72.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.
- Navatel, J., Bourrain, L., 2001. Production of walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* multiplication. *Acta Horticulturae*, 544: 465-471.
- Oyebanji, O.B., Nweke, O., Odeunmi, O., Galadima, N.B., Idris, M.S., Nnodi, U.N., Afolabi, A.S., Ogbadu, G.H., 2009. Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology*, 8(20): 5395-5399.
- Penuela, R., Gravito, C., Sanchez-Tames, R., Rodriguez, R., 1988. Multiple shoot-bud stimulation and rhizogenesis induction of embryonic and juvenile explants of walnut. *International Symposium on Vegetative Propagation of Woody Species*, 3-5 September, Pisa, pp. 457-459.
- Pittet, H., Moncousin, C., 1981. Multiplication nouvelle du rosier. *Revue Horticulture Suisse*, 54: 169-173.
- Ramos, E.D., 1998. Walnut Production Manual. University of California Division of Agriculture and Natural Resources Communication Services Publications, No: 3373, California.
- Revilla, M.A., Majada, I., Rodriguez, R., 1989. Walnut (*Juglans regia* L.) micropropagation. *Annales des Sciences Forestières*, 46(Suppl.): 149-151.
- Rodriguez, R., Lopez, C., Diaz-Sala, C., Berros, B., 1991. Simultaneous shoot-bud development on walnut tissues of different ages; macromorphological and histological analyses. *International Walnut Meeting*, 21-25 October, Tarragona, pp. 141-152.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Mottley, J., Das, P., 1999. Biotechnology of the rose: A review of recent progress. *Scientia Horticulturae*, 81(3): 201-228.
- Rudiyanto, Purwito, A., Efendi, D., Ermayanti, T.M., 2021. Growth response of four accessions of *Moringa oleifera* Linn shoots cultured on various basic media. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 16 December, Padang West Sumatra, pp. 012054.
- Sesli, Y., 2016. Bazı ceviz (*Juglans regia* L.) çeşitlerinin tohum anacı olarak kullanılabilme potansiyellerinin belirlenmesi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Şen, S.M., 2011. Ceviz. ÜÇM Yayıncılık, Baskı No: 4, Ankara.
- Şirin, E., 2014. Kaman 1 ve Kaman 5 ceviz çeşitlerinin (*Juglans regia* L.) mikroçoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Uğur, R., 2020. Development of *in vitro* sterilization protocol for DO-1 (*Prunus domestica*) rootstock. *Applied Ecology And Environmental Research*, 18(2): 2339-2349.
- Yıldırım, H.T., 2018. Bazı ceviz çeşitlerinde *in vitro* mikroçoğaltım. Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

ALINTI: Özelçi, D., 2024. Ceviz (*Juglans regia* L.) Fidanı Üretiminde Modern Yaklaşım: Doku Kültüründe Yüzey Sterilizasyonunun ve Kültür Başlatmanın Detaylı Çözümlemesi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 11(1): 82-90.

CITATION: Özelçi, D., 2024. A Modern Approach to Walnut (*Juglans regia* L.) Sapling Production: Detailed Analysis of Surface Sterilization and Culture Initiation in Tissue Culture. *Turkish Journal of Agricultural Research*, 11(1): 82-90. (In Turkish).