

## Çakıldak fındık çeşidinin *in vitro* sürgün ucu kültürü ile çoğaltılması\*

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

<sup>1</sup>Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 52200-Ordu

\*Bu çalışma aynı adlı Yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Alınış tarihi: 23 Ekim Mayıs 2020, Kabul tarihi: 16 Aralık 2020

Sorumlu yazar: Nuray KAPLAN, e-posta: nkpln@hotmail.com

### 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 yüzey sterilizasyonu amacıyla ilk olarak %70 etil alkolde 10 sn süre ile bekletme ve ardından % 5 dozundaki sodyum hipoklorid çözeltisinde 15 dakika bekletme uygulamaları yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan eksplantlar 2-3 cm uzunluğunda kesilerek hazırlanmıştır. Eksplantlar sürgün teşviki amacıyla farklı dozlarda hazırlanan BA (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l) içeren MS ve DKW ortamlarında kültüre alınmıştır. Ayrıca DKW (5mg/l BA+100 µl IBA+ 50 µl GA<sub>3</sub>) ve MS (1 mg/l BA+100 µl IBA+ 50 µl GA<sub>3</sub>, 1 mg/l BA+100 µl IBA+ 50µl GA<sub>3</sub>+0.05 g 138 Fe-EDDHA) kombinasyonları da test edilmiştir. Kültüre alınan eksplantlar dikimden 3 hafta sonra aynı dozlarda hazırlanan taze ortamlarda alt kültüre alınmışlardır. Deneme kapsamında uygulamaların karşılaştırılması amacıyla eksplant canlılık oranı (%), kararma oranı (%), enfeksiyon oranı (%), sürgün uzunluğu (cm), sürgün yaş ağırlığı (g), sürgün kuru ağırlığı (g), yaprak uzunluğu ve nisbi klorofil içeriği (SPAD) özellikleri incelenmiştir. Araştırma sonucunda Çakıldak çeşidinin *in vitro* sürgün gelişimi bakımından MS+1 mg/l BA+100 µl IBA+50 µl GA<sub>3</sub> (1.240 cm) ile MS+3 mg/l BA (1.200 cm) ortamlarının uygun olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Corylus avellana* L., fındık, mikro çoğaltma, *in vitro*

### Micropropagation of Çakıldak hazelnut cultivar using shoot tip culture

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 Çakıldak cultivar were used as explant during active growth period. For sterilization of explants, first soaking in 70% ethyl alcohol for 10 seconds and then 15 minutes in 5 % sodium hypochlorite solution were applied. Explants sterilized were prepared by cutting 2-3 cm in length. The explants are cultured in DKW and MS nutrient medium containing different doses BA (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l) prepared for shoot formation. The combinations of DKW (5 mg/l BA+100 µl IBA+ 50 µl GA<sub>3</sub>) and MS (1 mg/l BA+100 µl IBA+ 50 µl GA<sub>3</sub>, 1 mg/l BA+100 µl IBA+ 50µl GA<sub>3</sub>+0.05 g 138 Fe-EDDHA) were also tested. Cultured explants were sub-cultured every three weeks after planting in fresh mediums. In order to compare the applications, explant survival rate (%), contamination rate (%), browning rate (%), shoot length (cm), shoot fresh weight (g), shoot dry weight (g), leaf length (cm) and chlorophyll content (SPAD) were determined. In the study, it was determined that MS+1 mg/l BA+100 µl IBA + 50 µl GA<sub>3</sub> (1.240 cm) and MS+3 mg/l BA (1.200 cm) media were suitable for *in vitro* shoot development in Çakıldak.

**Key words:** *Corylus avellana*, hazelnut, micro propagation, *in vitro*

## Giriş

Fındık botanik olarak Fagales takımı Betulaceae familyası Coryleae alt familyası ve *Corylus* cinsine dâhildir (Gökmen, 1973). Dünyada yetişen pekçok fındık türü olmasına karşın yaygın kültürü yapılan çeşitler *C. avellana* türüne aittir (İslam, 2018). Türkiye ortalama 650 000 ton fındık üretimi ile dünyanın en önemli fındık üreticisi durumundadır (Anonim, 2020).

Fındık ülkemizde yaygın olarak dip sürgünü ile çoğaltılmaktadır. Tohum, daldırma, çelikle ve aşı ile çoğaltılabilmektedir. Kopuzoğlu ve Şen (1991) bazı önemli fındık çeşitlerinin aşı ile çoğaltılması üzerine bir çalışma yürütmüş olup aşı başarısı düşük bulunmuştur. Yine Acı ve Beyhan (2018), fındığın tepe daldırması yöntemi ile çoğaltılması konusunda çalışmış ve çoğaltma başarısının daha yüksek olduğunu saptamıştır. *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 da köklenme başarısı düşük bulunmuştur (Özçağiran ve ark., 2014).

Fındık çok sayıda dip sürgünü üretme özelliğine sahip çalı formunda bir bitkidir. Üretimde dip sürgünleri yılda birkaç kez alınır. Meyve üretimi ile birlikte fidan üretimi yapılan işletmelerde ise dip sürgünleri 1 veya 2 yıl büyütülmektedir (Beyhan 1997). Bunun beslenme, ışık ve su kullanımı yönlerinden sürgünlerin ana bitkiler ile rekabet oluşturmakta olup hastalık problemini de artırmaktadır. Ayrıca elle veya makineli hasadı güçleştirmektedir. Yine satışa sunulacak sürgünlerin sökümleri sırasında hem yavru bitkilerde hem de ana bitki köklerinde mekanik zararların meydana gelmesi (Kopuzoğlu ve Şen, 1991) ve kapama bahçelerden alınan sürgünlerin kullanılmasında ciddi fitopatolojik problemler ortaya çıkmaktadır (Scortichini, 2002).

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 ve Read, 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. Ayrıca bu yöntemle bitki çoğaltımı daha kısa süreli ve kolay olmaktadır. *In vitro* tekniği ile üstün özelliklere sahip bitki çeşitlerinin seleksiyonu daha kısa sürmektedir. Ayrıca, kaybolma tehlikesi olan değerli türlerin korunması ve çoğaltılmasında da doku kültürü teknikleri kullanılmaktadır. Bu yöntemle yıl boyunca üretim yapılabilir (Radojevic ve ark., 1975). Doku kültürü ile hastaliksız sağlam bitkilerin elde edilebilmesi ve 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; Bassil ve ark., 1990; Diaz-Sala ve ark., 1990; Yu ve 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.

Fındıkta yüksek verim elde etmek için kurulacak modern bahçe tesisinde, adına doğru, bir örnek fidan kullanmanın yolu sertifikalı fidandan geçmektedir. Bu çalışmada, Çakıldak fındık çeşidi için doku kültürü protokolünün oluşturulması ve kitlesel üretimin yolunun açılmasına katkı sağlamak hedeflenmiştir. Çalışmada Çakıldak fındık çeşidinin sürgün ucu eksplant olarak kullanılarak farklı büyüme düzenleyicileri, demir ve bunların farklı kombinasyonlarını içeren MS ve DKW ortamlarının *in vitro* mikro çoğaltma açısından en uygun kombinasyonu veya kombinasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 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 Fatsa ilçesi üretici bahçesinden alınan çelikler kullanılmıştır. Eksplantlar çeliklerin 30 gün süreyle +4 °C'lik soğuk hava deposunda bekletilmesi sonrasında oda koşullarında su içinde ve oda koşullarında sürdürülmesiyle temin edilmiştir.

### Eksplant hazırlığı ve sürgün elde edilmesi

Çeliklerden süren sürgünlerin 2-3 cm uzunluğunda hazırlanan sürgün ucu eksplantları % 70'lik etil alkolde 10 saniye bekletilmiş ve ardından 1-2 damla Tween 20 ilave edilmiş % 10'luk sodyum hipoklorit çözeltisi kullanılarak 15 dakika süreyle dezenfekte edilmiştir. Eksplantlar daha sonra steril kabin içerisinde 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Eksplantlar ardından 30 g L<sup>-1</sup> sakaroz ve 8 g L<sup>-1</sup> agar ve farklı dozlarda hazırlanan BA (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l), 5mg/l BA+100 µl IBA+ 50 µl GA<sub>3</sub> içeren DKW (Driver ve Kuruyuki, 1984) ve BA (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l), 1 mg/l BA+100 µl IBA+ 50 µl GA<sub>3</sub>, 1 mg/l BA+100 µl IBA+ 50µl GA<sub>3</sub>+0.05 g 138 Fe-EDDHA ilave edilmiş pH'sı 5.8' e ayarlanmış MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamlarından 10 mL içeren 15x2.5 cm boyutundaki deney tüplerine dikilmiştir. Çalışmanın sürgün gelişimi aşamasında enfeksiyon ve kararma nedeniyle sürgün ucunun büyümediği gözlenmiş ve bu nedenle çalışmaya MS+2 mg/l BA, MS+3 mg/l BA, MS+4mg/l BA, MS+5 mg/l BA, MS+1 mg/l BA +100 µl IBA+50 µl GA<sub>3</sub>, MS+1 mg/l BA+100 µl IBA+50 µl GA<sub>3</sub>+0.05 g Fe ve DKW+ 5 mg/l BA +100 µl IBA+50 µl GA<sub>3</sub> ortamlarıyla devam edilmiştir. Kültüre alınan eksplantlar dikimden 3 hafta sonra yukarıda belirtilen aynı taze ortamlarına transfer edilerek alt kültüre alınmıştır.



Şekil 1. Eksplant hazırlığı ve kültüre alınması görüntüleri

### Kullanılan alet, ekipman ve besi ortamlarının sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan tüpler, bistüri, pens, kurutma kağıtları ile DKW ve MS besi ortamlarının sterilizasyonları 121 °C'de ve 1.05 atm basıncındaki otoklavda 15 dakika süreyle tutularak yapılmıştır.

### Kültür koşulları

Kültürler, sıcaklığı 25±2 °C, fotoperiyodu 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık olacak şekilde ve ışıklandırması 3000-4000 lüks (11000-15000 watt/m<sup>2</sup>) şiddetinde olan Cool daylight tipi beyaz floresan lambaların yer aldığı büyütme odasında tutulmuştur.

### Çalışma Kapsamında İncelenen Özellikler

Çalışma kapsamında farklı ortamlarda dikimi yapılan sürgün uçlarından canlı kalanlarının sayısının toplam eksplant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla eksplantlarda canlılık oranı (%); farklı ortamlarda dikimi yapılan sürgün uçlarından enfekteli olanların sayısının toplam eksplant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla enfeksiyon oranı (%); farklı ortamlarda dikimi yapılan sürgün uçlarından kararanların sayısının toplam eksplant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla kararma oranı (%) belirlenmiştir.

Sürgün ucu eksplantlarından oluşan sürgünlerin ortamlardan çıkarılması aşamasında cetvel yardımıyla ölçülmesiyle sürgün uzunluğu ve yaprakların ölçülmesiyle yaprak uzunluğu; oluşan sürgünlerin 0.001 g duyarlılıktaki hassas terazi ile tartılmasıyla sürgün yaş ağırlığı; sürgün yaş ağırlığı belirlenen sürgünlerin 65 °C'lik etüvde 72 saat tutulup kuruması sonrası 0.001 g duyarlılıktaki hassas terazi ile tartılmasıyla sürgün kuru ağırlığı ve oluşan sürgünlerin orta kısmında yer alan yapraklarda SPAD yardımıyla nisbi klorofil içeriği belirlenmiştir.

### Deneme deseni ve istatistiksel analiz

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

### Bulgular ve Tartışma

#### Eksplant canlılık, enfeksiyon ve kararma bulguları

MS ve DKW ortamlarında uygulanan farklı BA ile ayrıca uygulanan IBA (100 µl), 138-Fe EDDHA (0.05 g) ve GA<sub>3</sub> (50 µl) dozlarının denemede kullanılan Çakıldak sürgün ucunun canlılık, enfeksiyon ve kararma üzerine etkisi P≤0.001 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 1). Çalışmada en yüksek eksplant canlılık oranı % 66.1'lik oranla MS+1mg/l BA+100µl IBA+50µl GA<sub>3</sub> uygulamasında belirlenmiştir. Bu uygulamayı aynı istatistiksel grupta

yer alan DKW+5 mg/l BA (% 57.8), DKW+5mg/l BA+100µl IBA+50µl GA<sub>3</sub> (% 55), MS+ 3mg/l BA (% 53.9), DKW+ 4 mg/l BA (% 50.9), DKW+3mg/l BA (%48.9), MS+4mg/l BA (% 48.9) ortamlarından elde edilmiştir. En düşük eksplant canlılık oranı ise % 0 oranla MS+1mg/l BA uygulamasında tespit edilmiştir.

En yüksek enfeksiyon oranı % 35.2 oranla MS+4 mg/l BA ve MS+1mg/l BA+100µl IBA+50µl GA<sub>3</sub> uygulamalarında belirlenirken en düşük enfeksiyon oranı ise % 0 oranla MS (1 ve 2 mg/l BA) uygulamalarında tespit edilmiştir.

Çizelge 1. MS ve DKW ortamlarında farklı ortam içeriklerinin sürgün uçlarında canlılık, enfeksiyon ve kararma oranı üzerine etkileri

Ortamlar	Canlı Kalma Oranı (%)	Enfeksiyon Oranı (%)	Kararma Oranı (%)
MS+0 mg/l BA	12.3 c	0.0 c	71.6 b
MS+1 mg/l BA	0.0 c	0.0 c	90.0 a
MS+2 mg/l BA	17.2 c	0.0 c	72.8 ab
MS+3 mg/l BA	53.9 ab	12.3 cd	28.1 defg
MS+4 mg/l BA	48.9 ab	35.2 a	11.1 g
MS + 5 mg/l BA	45.0 b	23.9 abc	35.2 def
DKW+ 0 mg/l BA	17.2 c	17.7 bc	59.0 bc
MS + 1 mg/l BA +100 µl IBA+50 µl GA <sub>3</sub>	66.1 a	12.3 cd	18.4 fg
MS + 1 mg/l BA +100 µl IBA+50 µl GA <sub>3</sub> +0.05 g Fe	45.0 b	35.2 a	23.9 efg
DKW+ 1 mg/l BA	40.9 b	28.3 ab	37.1 de
DKW+ 2 mg/l BA	40.8 b	12.3 cd	43.1 cd
DKW + 3 mg/l BA	48.9 ab	12.3 cd	37.1 de
DKW+ 4 mg/l BA	50.9 ab	12.3 cd	34.9 def
DKW+ 5 mg/l BA	57.8 ab	15.0 bc	28.1 defg
DKW+ 5 mg/l BA +100 µl IBA+50 µl GA <sub>3</sub>	55 ab	21.1 abc	26.1 defg
LSD	18.47***	14.45***	18.20***

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

Nas ve Read (2001), E-295-S, G-029-N ve S-182-C fındık genotiplerini sürgünlerini kullanarak farklı demir kaynakları ve ortamların eksplant gelişimi ve kalitesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada demir ilavesiyle sürgün uzunluğunda artışa karşın yapraklarda büyük oranda kloroz gözlenmiştir. 138 Fe içeren ortamlarda gelişen sürgünlerin koyu yeşil renkte ve sağlıklı gözlendiği ancak 330 Fe kullanılan ortamlarda gelişen sürgünlerde ise hiperhidrasyonun meydana geldiğini belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar en klorotik yaprakları MS ortamında belirlerlerken sonraki alt kültürlerde klorotik eksplantlar MS ortamında büyütüldüğünde hayatta kalan eksplant sayısının önemli ölçüde azaldığını saptamışlardır. Gao ve ark. (2006), Kuixiang, Dawei, Hybrid 88, Hibrid 73 ve 84-402 hibrit fındık eksplantlarını MS ortamında kültüre alınan bitkilerinde bir miktar kloroz gözlemişlerdir. Bu çalışmada ise kararma oranı

Sürgün oluşturma aşamasında sürgün uçlarında görülen en önemli sorun kararma problemi olmuştur. Sürgün uçlarının alt kültüre alındıktan yaklaşık 3. haftanın sonlarına doğru bitkilerde kararma sorunundan dolayı sürgünlerin çoğu gelişmeden ya da geliştikten sonra kararmıştır. Çizelge 1 incelendiğinde en yüksek kararma oranının % 90 değeriyle MS+1 mg/l BA uygulamasında olduğu bu uygulamayı % 72.8 değeriyle MS+ 2 mg/l BA ile % 71.6 değeriyle MS 0 mg/l uygulamalarının takip ettiği belirlenmiştir.

açısından en yüksek değer 1 ve 2 mg/l BA ilave edilen MS ortamlarında olduğu tespit edilmiştir.

DKW ortamlarında kültüre alınan sürgünler belli bir sürgün boyuna ulaştıktan sonra kararma nedeniyle ölmüşlerdir. Aynı şekilde kullanılan diğer canlılık oranının düşük olmasının nedeni eksplantların sürgün oluşturmaması yada belli bir seviyede sürgün oluşturduktan sonra kararıp ölmesidir. Fındık bitkisinin dokularındaki kararmanın fenolik bileşiklerin üretiminden kaynaklandığı bildirilmiştir (Yu ve Reed, 1995). Yine bazı araştırmacılar *Corylus* türlerinin doku kültüründe çoğaltımının zor olduğunu ve yüksek oranda mikrobiyal kontaminasyon, eksplantların kararması, düşük çoğalma hızı, yetersiz sürgün uzaması ve hiperhidrasyonun mikro çoğalma başarısını sınırlayan faktörler olduğunu bildirmişlerdir (Diaz-Sala ve ark., 1990; Yu ve Read, 1995; Nas ve Read, 2001).

### Sürgün uzunluğu, yaprak uzunluğu, sürgün yaş ve kuru ağırlığı ile nisbi klorofil içeriği (SPAD) bulguları

MS ve DKW ortamlarında uygulanan farklı BA ile ayrıca uygulanan IBA, 138 Fe-EDDHA ve GA<sub>3</sub> dozlarının sürgün uzunluğu üzerine etkisi istatistiksel açıdan önemli ( $P \leq 0.001$ ) bulunmuştur (Çizelge 2). Çizelge 2'de gözlemlendiği gibi en yüksek sürgün uzunluğu MS+1 mg/l BA+100 µl IBA+50 µl GA<sub>3</sub> (1.240 cm) ile MS+3 mg/l BA (1.200 cm) uygulamalarında belirlenirken en düşük sürgün uzunluğu MS+4 mg/l BA (0.650 cm) ile MS+5 mg/l BA (0.600 cm) uygulamalarında saptanmıştır.

Bugüne kadar birçok fındık çeşidi üzerine yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında farklı ortamlar ile farklı oksin ve sitokinin hormonları kullanıldığı görülmektedir. Hand ve ark. (2014), Jefferson, Dorris ve Sacajawe fındık çeşitlerinde DKW ortamını kullanarak yapmış oldukları çalışmada farklı minör elementlerin sürgün ucuna etkilerini araştırmışlar ve en yüksek sürgün uzunluğunu 5 mg/l BA+4 µM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> uygulamasından elde etmişlerdir. En yüksek sürgün uzunluğu sırasıyla Dorris ve Jefferson çeşitlerinden elde edilmiştir. Gentile ve ark., (2017)'nin *C. colurna*'da yaptıkları çalışmada 4.1 ve 8.2 µM BA kullandıkları DKW ortamında sürgün uzunluğu açısından istatistiksel anlamda farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Buna karşın Thomson ve ark. (2011), Daviana fındık çeşidinin sürgünlerini eksplant olarak kullandıkları çalışmada Knoxfield2 ortamını kullanarak sürgün uzunluğunu (28.6 mm- 23.7 mm ile) sırasıyla 5 mg/l BAP ve 10 mg/l BAP eklenen ortamdan ve yeni oluşan sürgünlerin uzunluğu açısından en iyi sonucu 1 mg/l zeatin (14.7 mm) eklenen ortamdan elde etmişlerdir. Yine Bacchetta ve ark. (2005)'nin yaptıkları çalışmada sürgün uzaması için 1 mg/l zeatinin 0.5 mg /l BAP 'dan daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Nas (2004), *Corylus avellana*'nın farklı genotiplerinde yaptıkları çalışma sonucunda BA (6.7. 11.1 veya 15.5 µM) dozlarının bitkilerin sürgün uzunluğu üzerine etkisinin istatistiksel olarak farklılık oluşturmadığını tespit etmişlerdir. Perez ve ark. (1985), Cheng's ortamında (Cheng, 1975) fındık sürgünleri için en iyi sürgün gelişimini 25 µM BAP içeren ortamdan elde etmişlerdir. Gao ve ark. (2006), Kuixiang, Dawei, Hybrid 88. Hibrid 73 ve 84-402 hibrit fındıklarında yaptıkları çalışmada en yüksek sürgün uzunluğunu 1/2 MS (4.60 cm) ortamından elde etmişlerdir. Ortalama sürgün uzunlukları arasında önemli bir

fark görülmemekle birlikte en yüksek sürgün uzunluğu 1.0 mg/l BA ilave edilen 1.5 mg/l TDZ bulunan ortamdan elde edilmiştir.

MS ve DKW ortamlarında uygulanan farklı BA ile ayrıca uygulanan IBA, 138-Fe EDDHA ve GA<sub>3</sub> dozlarının yaprak uzunluğu üzerine etkisi istatistiksel açıdan  $P \leq 0.05$  düzeyinde önemli etki göstermiştir (Çizelge 2). Çizelge 2'de görüldüğü gibi MS+1 mg/l BA +100 µl IBA+50 µl GA<sub>3</sub> (1.033 cm) ile MS+3 mg/l BA (0.933 cm) ortamlarından en yüksek yaprak uzunluğu elde edilirken en düşük yaprak uzunluğu MS+4 mg/l BA (0.400 cm) ile MS+5 mg/l BA (0.450 cm) ortamlarında tespit edilmiştir. Gentile ve ark. (2017)'de *C. Colurna*'da yaptıkları çalışmada 4.1 ve 8.2 µM meta-topolin kullandıkları DKW ortamında yaprak uzunluğu açısından istatistiksel anlamda fark görülmediğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise bu fark önemli bulunmuştur.

MS ve DKW ortamlarında uygulanan farklı BA ile ayrıca uygulanan IBA 138-Fe-EDDHA ve GA<sub>3</sub> dozlarının sürgün yaş ağırlığı üzerine etkisi istatistiksel açıdan önemli ( $P \leq 0.05$ ) bulunmuştur (Çizelge 2). Çalışmada en yüksek sürgün yaş ağırlığı MS+3 mg/l BA (0.050 cm) ile bu uygulamayı takiben MS+1mg/l BA+100 µl IBA+50 µl GA<sub>3</sub> (0.040 cm) uygulamalarında belirlenirken en düşük sürgün yaş ağırlığı MS+4 mg/l BA (0.017 cm) ile MS+ 5 mg/l BA (0.017 cm) uygulamalarından elde edilmiştir.

Çalışmada istatistiki bulgulara dayalı olarak en yüksek sürgün kuru ağırlığı MS+1 mg/l BA+100 µl IBA+50 µl GA<sub>3</sub> (1.20 g) ile MS+2 mg/l BA (0.013 g) ortamlarından elde edilirken en düşük sürgün kuru ağırlığı değerleri MS+4 mg/l BA (0.004 g) ile MS+5 mg/l BA (0.003 g) ortamlarında belirlenmiştir. Silvestri ve ark. (2019), Tonda Gentille Romana çeşidinin boğumlarını kullanarak yaptıkları çalışmada 1/2 MS (20 mg/l BAP+0.1 mg/l TDZ) ortamına ilave edilen 100 ve 200 mg/l Sequestrene 138 Fe-EDTA veya Fe-EDDHA formunda ki demirin sürgün kuru ağırlığı üzerine etkisinin istatistiki açıdan önemli olmadığını belirlemişlerdir. Ancak Garrison ve ark. (2013)'nin Geneva çeşidinin boğum eksplantların kullanarak farklı demir kaynaklarının in vitro sürgün çoğaltılması üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada en yüksek sürgün kuru ağırlığı değeri 230, 460 ve 690 µM Fe-EDDHA içeren NCGR-COR ortamında tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar belirtilen ortam sonuçları ile karşılaştırıldığında sürgün kuru

ağırlığının önemli derecede düşük olduğu saptanmıştır.

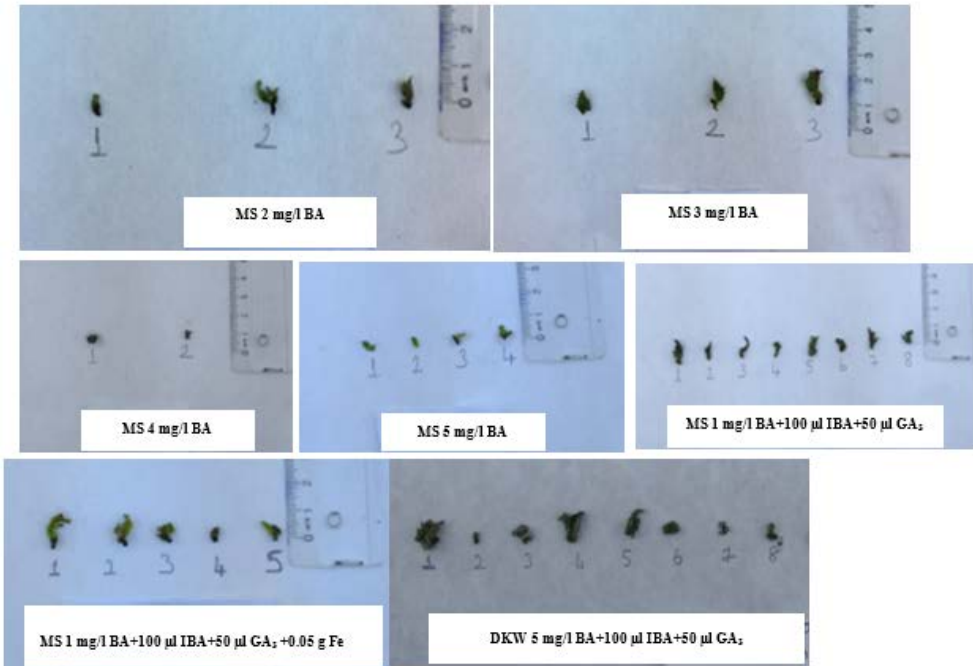
MS ve DKW ortamlarında uygulanan farklı BA ile ayrıca uygulanan IBA, 138 Fe-EDDHA ve GA<sub>3</sub>, nisbi klorofil içeriği üzerine istatistiksel açıdan P≤0.05 düzeyinde önemli etki göstermiştir (Çizelge 2). En yüksek nispi klorofil içeriği 23.033 değeriyle MS+3 mg/l BA ve 17.433 değeriyle MS+1 mg/l BA +100 µl IBA+50 µl GA<sub>3</sub> ortamlarında tespit edilmiştir. En düşük nispi klorofil içeriği ise 4.600 değeriyle MS+2 mg/l BA ortamında saptanmıştır. Gentile ve ark., (2017)' de *C. colurna* yaptıkları çalışmada 8.2 µM meta-topolin ve 8.2 µM BA kullandıkları DKW ortamında en yüksek klorofil içeriğini 8.2 µM meta-topolin uygulandığında verdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen klorofil içeriği değerlerinin ise daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Nas ve Read (2001), E-295-S, G-029-N ve S-182-C genotiplerinin sürgünlerini kullanarak farklı

ortamlara (NN, DKW, MS, WPM) ilave edilen demir kaynağının (Sequestrene 138 Fe EDDHA (200 mg/l), Sequestrene 330 Fe (120 mg/l), FeSO<sub>4</sub> (33.8 mg/l)) eksplant gelişimi ve kalitesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada 200 mg/l Sequestrene 138 Fe-EDDHA içeren ortam üzerinde oluşan sürgünlerin sağlıklı görümlü ve koyu yeşil olduğunu belirlemiş ve en yeşil yaprakların NN ortamında olduğunu saptamışlardır. Garrison ve ark. (2013), Geneva çeşidinin boğum eksplantlarını kullanarak farklı demir kaynaklarının (0, 230, 460, 690 µM Fe-EDDHA ve Fe-EDTA) *in vitro* sürgün çoğalmasında üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında en yüksek klorofil içeriğini 230 µM ile Fe-EDDHA bulunan ortamdan elde etmişlerdir. Bu çalışma sonuçları mevcut çalışmamızın klorofil içeriği sonuçlarını desteklememektedir. Farklı ortam ve büyüme düzenleyici içeriklerindeki sürgün gelişimi görüntüsü Şekil 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Farklı ortam ve büyüme düzenleyici içeriklerinin sürgün gelişimi üzerine etkileri

Ortamlar	Sürgün uzunluğu (cm)	Yaprak uzunluğu (cm)	Sürgün yaş ağırlığı (g)	Sürgün kuru ağırlığı (g)	SPAD
DKW 5 mg/l BA +100 µl IBA+50 µl GA <sub>3</sub>	0.743 bc	0.557 bc	0.037 abc	0.004 ab	17.433 ab
MS 1 mg/l BA +100 µl IBA+50 µl GA <sub>3</sub>	1.240 a	1.033 a	0.040 ab	0.020 a	19.433 ab
MS 1 mg/l BA +100 µl IBA+50 µl GA <sub>3</sub> +0.05 g Fe	0.813 abc	0.643 abc	0.037 abc	0.004 ab	12.767 bc
MS 2 mg/l BA	0.800 abc	0.467 c	0.020 bc	0.013 b	4.600 c
MS 3 mg/l BA	1.200 ab	0.933 ab	0.050 a	0.004 ab	23.033 a
MS 4 mg/l BA	0.600 c	0.400 c	0.017 c	0.004 b	13.267 bc
MS 5 mg/l BA	0.650 c	0.450 c	0.017 c	0.003 b	12.433 bc
LSD	0.468*	0.41*	0.02*	0.016*	9.60*



Şekil 2. Çakıldak çeşidi sürgün uçlarının farklı ortam ve büyüme düzenleyici içeriklerindeki sürgün gelişimi görüntüsü

## Sonuç ve Öneriler

Sürgün gelişimi aşamasında elde edilen sonuçlara göre sürgün uzunluğu, yaprak uzunluğu ve sürgün kuru ağırlığı açısından en iyi sonuç MS+1 mg/l+100 µl IBA+50 µl GA<sub>3</sub> ortamından alınırken sürgün yaş ağırlığı bakımından en üstün sonuç MS+3 mg/l BA ortamından elde edilmiştir. En yüksek klorofil içeriği ise MS+3 mg/l BA ortamından elde edilmiştir.

Araştırmada kullanılan eksplantlarda farklı ortamlarda kültüre alınan sürgünlerin 1. alt kültür aşamasında belli bir uzunluğa ulaştıktan sonra kararına gözlenmiştir. Ayrıca düşük çoğalma hızı ve yetersiz sürgün uzaması da saptanmıştır.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışma Çakıldak fındık çeşidinin sürgün ucu kullanılarak mikro çoğaltımı konusu ile ilgili ilk çalışma niteliğindedir. Bu nedenle bulguları itibariyle önem arz etmektedir. Doku kültürü ile çoğaltma çalışmaları bitkinin genetik yapısı ve çeşit ile de ilgili olduğundan elde edilen bulgular literatür ile az çok benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmanın farklı eksplant, ortam, büyüme düzenleyicileri, doz ve kombinasyonlar ile zenginleştirilerek devam ettirilmesi önerilmektedir. Yine diğer kültür çeşitleri kullanılarak doku kültürü ile çoğaltma denemelerinin devam ettirilmesi de önem arz etmektedir.

## Kaynaklar

- Acı, F., & Beyhan, N. (2018). Fındığın Tepe Daldırması Yöntemi ile Çoğaltılması. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 4(1), 1-12.
- Anonim, (2020). Türkiye İstatistik Kurumu. [www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr) Erişim tarihi (06.01.2020).
- 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, 1-35s.
- Bacchetta, L., Bernardini, C., Di Stefano, G., Pelliccia, O., Cavicchioni, G., & Di Bonito, R. (2005). Molecular characterization by RAPDS and Micropropagation of Italian hazelnut cultivars. *Acta Horticulturae*. 686, 99-104.
- 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.

- Bassil, N. V., Rebhuhn, B. J., Mok, D. W., & Mok, M. C. (1990). Micropropagation of the hazelnut, *Corylus avellana*. *HortScience*, 25(9), 1100.
- Beyhan N. (1997). Bazı herbisitlerin fındık dip sürgünü kontrolündeki etkileri. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12(3), 45-55.
- Caboni, E., Frattarelli, A., Meneghini, M., Giorgioni, M., & Damiano, C. (2009). Micropropagation of hazelnut Italian cultivars. *Italus Hortus*, 16(2), 102-105.
- Cheng, T.Y. (1975). Adventitious bud formation in culture of Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Plant Science Letters*, 5(2), 97-102.
- Driver, J. A., & Kuniyuki, A.H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19(4), 507-509.
- 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.
- Gao, X. H., Liu, J. N., & 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 771* (pp. 207-211).
- Garrison, W., Dale, A., & Saxena, P.K. (2013). Improved shoot multiplication and development in hybrid hazelnut nodal cultures by ethylenediamine di-2-hydroxy-phenylacetic acid (Fe-EDDHA). *Canadian journal of plant science*, 93(3), 511-521.
- Gentile, A., Frattarelli, A., Not, P., Condello, E., & Caboni, E. (2017). The aromatic cytokinin meta-topolin promotes in vitro propagation. shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 128(3), 693-703.
- Gökmen, H. (1973). Kapalı tohumlular (Angiospermae). *Orman Bakanlığı Yayınları*, 564, 208-210.
- Hand, C.R. (2013) Improving initiation and mineral nutrition for hazelnut (*Corylus avellana*) micropropagation. Master of Science, Horticulture, Oregon State University, Corvallis, Oregon, May, 2013, 108
- Hand, C., Maki, S., & Reed, B.M. (2014). Modeling optimal mineral nutrition for hazelnut micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 119(2), 411-425.
- İslam, A. (2018). Hazelnut culture in Turkey. *Akademik Ziraat Dergisi*, 8(2), 176-184.
- 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, 45-48.
- Kopuzoğlu N & Şen SM. (1991). Bazı önemli fındık çeşitlerinin aşı ile çoğaltılması üzerine bir araştırma. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(1-2), 59-69.
- Köksal, İ. (2002). Türk Fındık Çeşitleri. Fındık Tanıtım Grubu Yayınları, Ankara. 136s.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nas, M.N., & Read, P.E. (2001). Micropropagation of hybrid hazelnut: medium composition, physical state and iron source affect shoot morphogenesis, multiplication and explant vitality. *Acta Horticulturae*, 556, 251-258.
- Nas, M.N. (2004). Inclusion of polyamines in the medium improves shoot elongation in hazelnut (*Corylus avellana* L.) micropropagation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28(3), 189-194.
- Özçağırın, R., Ünal, A., Özeker, E., & İsfendiyaroğlu. M. (2014). Ilıman İklim Meyve Türleri Cilt III. Ege Üniversitesi Yayınları Ziraat Fakültesi Yayın. No 566.
- Pérez, C., Rodríguez, R., & Tamés, R.S. (1985). "In vitro" filbert (*Corylus avellana* L.) micropropagation from shoot and cotyledonary node segments. *Plant cell reports*, 4(3), 137-139.
- 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 212. *Acta Horticulturae*, 212, 505-510.
- Radojević, L., Vujičić, R., & Nešković, M. (1975). Embryogenesis in tissue culture of *Corylus avellana* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 77(1), 33-41.
- Scortichini M., (2002). Bacterial canker and decline of european hazelnut. *Plant Disease*, 86(7), 704-709.
- Silvestri, C., Rugini, E., & Cristofori, V. (2019). The effect of CuSO4 for establishing in vitro culture, and the role nitrogen and iron sources in in vitro multiplication of *Corylus avellana* L. cv. Tonda Gentile Romana. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-7.
- Thomson, G.E., & Deering, T.D. (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.
- Yu, X., & Reed, B.M. (1995). A micropropagation system for hazelnuts (*Corylus spp*). *HortScience*, 30(1), 120-123.