

## ŞEBİN VE KR-2 CEVİZ ÇEŞİTLERİNİN *in vitro*'DA HIZLI ÇOĞALTILMA TEKNİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Ayşe FİDANCI<sup>1</sup>

### ÖZET

Şebin ve KR-2 ceviz çeşitleri *in vitro*'da üretilmeye çalışılmış ve kültür oluşturma, çoğaltma (kardeşlenme), köklendirme ve alıştırma safhalarını kapsayan çalışmalar yapılmıştır. Üç farklı eksplant kaynağından alınan materyal ile üç farklı eksplant tipi kullanılarak (meristem, sürgün ucu ve üzerinde bir göz bulunan nodal segment) üç farklı ortamda (MS, WPM, DKW) kültür oluşturulmuştur.

Cevizin mikro üretiminde kültür oluşturma safhasında karşılaşılan en önemli problem bulaşma ve kararma olarak görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Juglans regia* L., Mikro Üretim, Eksplant, Ortam

### SUMMARY

#### DETERMINATION OF IN VITRO RAPID PROPAGATION TECHNIQUES OF ŞEBİN AND KR-2 WALNUT CULTIVARS

Şebin and KR-2 walnut cultivars were tried to propagate *in vitro* and the studies were realized including culture establishment, multiplication, rooting, and acclimatization stages.

In order to establishment of culture explants were taken from three different source, chosen three different explant type (meristem, shoot tip, nodal segment) and three different media (MS, WPM, DKW) were used.

At the culture establishment stage contamination and browning created the most important problems.

**Keywords:** *Juglans regia* L., Micropropagation, Explant, Media

### GİRİŞ

Ceviz hem meyveleri hem de kerestesi değerli olan sert kabuklu meyve türlerinden birisi-

dir. Meyveleri zengin bir yağ, protein ve vitamin kaynağıdır. Meyvelerine ilaveten ceviz kerestesi, yaygın olarak yüksek kalitede mobilya imalatında ve kaplamada kullanılır. Dört lider

<sup>1</sup>Zir. Müh., Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü YALOVA

üretici ülke; USA, Çin, İran ve Türkiye dünya ceviz üretiminin yarısından fazlasını üretmektedir.

İngiliz, İran ve Anadolu cevizi olarak bilinen *J. regia L.* bazı bölgelerde meyveleri bazı bölgelerde ise kerestesi ile değer kazanmıştır. Şimdilerde yoğun olarak Kuzey ve Güney Amerika'da Avrupa'da, Asya'da, sınırlı olarak Kuzey Afrika, Avusturalya ve Yeni Zelanda'da üretimi yapılmaktadır.

Ülkemizde mevcut ceviz ağaçlarının büyük çoğunluğu tohumdan elde edilmiş çöğür tipleridir (4).

Cevizin bilinen tekniklerle örneğin çelik veya daldırma yöntemi ile üretilmesi çok güç veya imkânsızdır (6,3).

Cevizin mikro üretimindeki gelişmelerin arkasındaki ana sebep, hem araştırmalarda hem de ticari yetiştiricilik için anaçların, seleksiyonların ve elit ağaçların kendi kökleri üzerinde yetiştirilmesine ihtiyaç duyulmasıdır. Cevizde mikro üretim başlangıçta bu türlerde geleneksel üretimde köklendirme metotlarında karşı karşıya gelinen güçlükleri yenmek için yapılmıştır. Bununla birlikte genetik olarak üstün kaliteli kalemler rutin olarak çöğür anaçları üzerine aşılanarak üretilmektedir. Kalemlerden köklenme yoluyla üretim yapmak yetersizdir (5).

Çalışmanın amacı, son yıllarda ceviz üretimine olan talep nedeni ile ismine doğru, uniform ceviz fidanlarına ihtiyaç artmıştır. Gelecekte ceviz doku kültürü ile geniş şekilde üretilcektir. Bu üretim şekli ile bir tomurcuktan çok sayıda birbirinin aynı, ismine doğru fidan elde etmek mümkün olacaktır. Aşı işçiliği ortadan kalkacak zamandan ve işçilikten tasarruf sağlanacaktır.

## MATERYAL VE METOT

### *Materyal*

Araştırma 2002–2004 yılları arasında Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü doku kültürü laboratuvarında yapılmıştır. Araştırmanın bitkisel materyalini yine enstitüde mevcut Şebin ve KR–2 ceviz çeşitleri oluşturmuştur. Bunun için üç farklı eksplant kaynağından materyal alınmıştır:

a) Kalem anaç parseli,

b) Gübreleme deneme parseli,

c) Serada saksılara dikilen 1 ve 2 yaşlı fidanlar. Bu kaynaklardan üç farklı eksplant tipi kullanılarak (meristem, sürgün ucu, göz çeliği (nodal segment)) üç farklı ortamda kültür oluşturulmuştur.

### *Metot*

Ele alınan KR–2 ve ŞEBİN ceviz çeşitleri ile kültür oluşturma, kardeşlenme, köklenme ve alıştırma safhalarını kapsayan çalışmalar tamamlanmıştır. MS (Murashige and Skoog, 1962), WPM (McCOWN's Woody Plant Medium), DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) ortamlarında meristem, sürgün ucu ve üzerinde bir göz bulunan 1,5–2 cm uzunluğundaki eksplantlar ile oluşturulan kültürlerde MS ve WPM ortamlarında DKW ortamına nazaran çok daha fazla kararma meydana gelmiştir. Bu durum göz önüne alınarak DKW ortamı ile çalışmaya devam edilmiştir. Alıştırma serasında tutulan, eksplantın alındığı ana bitkilere her hafta 50 mg/L GA<sub>3</sub> ve 100 mg/L BAP karışımından oluşan solüsyon el spreyi ile püskürtülmüştür. Ayrıca her hafta fungusit ile koruyucu ilaçlama yapılmıştır. Bu uygulamalar ile sürgün gelişimini hızlandırmak ve fungal hastalıklar kontrol altına alınmak istenmiştir (5).

Yerli ceviz çeşitlerimizden KR–2 ve Şebin ceviz çeşitlerinin doku kültürü ile üretim safhaları olan kültür oluşturma, kardeşlenme, çoğaltma ve alıştırma safhalarını kapsayan çalışmalar planlandığı gibi tamamlanmıştır. Bu aşamalarla ilgili yapılan çalışmalar aşağıda açıklanmaktadır.

Üç farklı eksplant kaynağından alınan sürgünler laboratuvara getirilmiş ve laboratuvarın ön hazırlık odasında yüzey sterilizasyonuna hazırlanmıştır.

*Yüzey Sterilizasyonu;* Sera koşullarında geniş saksılarda yetiştirilen 1–2 yaşlı, sağlıklı ana bitkilerden aktif büyüme döneminde (Mayıs ortalarından başlayarak Temmuz ortasına kadar) alınan sürgünlerin fazlalıkları uzaklaştırılarak geniş bir beher içine konan materyal önce musluk suyu ile yıkanmıştır. Daha sonra içerisine konan sıvı bulaşık deterjanı (10–20 ml/L) ile 3–5 dakika yıkanmış ve köpükten arıncaya kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Sonra antibakteriyel sabunla sürgünler özellikle gözle-

rin bulunduğu kısım hafifçe ovularak temizlenmiş ve yıkanmıştır. Ardından %96'lık alkol ile 2–3 dakika (alınan sürgünlerin hassasiyeti ve kirlilik durumlarına göre süre tayin edilir) kadar muamele edilmiş ve bidestile su ile 3–4 defa yıkanmıştır. Son olarak sodyum hipoklorit (%10'luk) ve içerisine birkaç damla tween–20 damlatılan solüsyonda 20 dakika zaman zaman karıştırılarak bekletilmiş ve 3–4 defa bidestile su ile yıkanarak yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır (2). Sterilizasyonun son aşaması steril kabinde gerçekleştirilmiştir.

*Kültür Oluşturma Aşaması;* Önceden 2.5 x 15 cm ebatlarındaki tüplere 15 ml dağıtılmış ve otoklavda sterilizasyonu tamamlanmış ortama (Çizelge 1), tercih edilen eksplant tipi (meristem; 0,1-0,5 mm, sürgün ucu; üzerinde 2-3 yaprak taslağı olan, yan gözler; üzerinde bir göz bulunan nodal segment 1,5-2 cm olarak alınmıştır) steril kabinde tüp içerisine yerleştirilerek uygun sıcaklık ve ışık şiddetine sahip (24-26°C, 5000 lux ) 8 saat karanlık ve 16 saat aydınlık periyoda ayarlı iklim odalarında 4–6 hafta süreli gelişmeye bırakılmıştır.

Çizelge 1. Cevizin *in vitro* Üretiminde Kullanılan DKW Ortamı\*.  
Table 1. Basal Medium (DKW) Used for Walnut Tissue Culture.

Bileşikler <i>Compound</i>	Kültür Oluşturma (mg/L) <i>Culture initiation</i>	Kardeşlenme (mg/L) <i>Multiplication</i>	Köklendirme (mg/L) <i>Rooting</i>
Ammonyum nitrate	1.416	1.416	708
Boric asit	4.8	4.8	4.8
Calcium chloride	149	149	74.5
Calcium nitrate	1.968	1.968	984
Cupric sulfate	0.25	0.25	0.25
Magnesium sulfate	740	740	335
Manganese sülfate	33.5	33.5	33.5
Nickel sülfate	0.005	0.005	0.005
Potassium phosphate	265	265	132.5
Potassium sulfate	1.559	1.559	779.5
Sodium molibdate	0.39	0.39	0.39
Zinc nitrate	17	17	17
Ferrous sülfate	33.8	33.8	16.9
Na <sub>2</sub> EDTA	45.4	45.4	22.7
İnositol	100	100	100
Thiamine HCL	2.0	2.0	2.0
Nicotinic asid	1.0	1.0	1.0
Glicine	2.0	2.0	2.0
IBA	---	0.01	1–2–3–4–5 mg/L
BA	---	1.0	---
Sucrose	30.000	30.000	30.000
Gelrite	2.400	2.400	2.400

\*Köklendirmede DKW makro elementleri yarıya indirgenerek kullanılmıştır. Otoklav öncesi pH=5,7–5,8'e ayarlanmıştır.

\*DKW, the macro elements half-strength. Media are adjusted to pH 5,7–5,8 before autoclaving.

*Çoğaltma (kardeşlenme) Aşaması;* Kültür oluşturmaya takip eden 4–6 hafta sonra gelişmiş olanlar çoğaltma ortamı (Çizelge 1) içeren daha geniş kavanozlara aktarılmıştır. İki tip kavanoz kullanılmıştır; küçük kavanozlar 180 ml, büyük kavanozlar 350 ml 'lik olup küçüklere 40 ml, büyük kavanozlara 80 ml ortam konmuş ve çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kavanozlara genellikle 1, ara sıra 2 mikrosürgün yerleştirilmiştir. Çoğaltma ortamında kardeşlenmeyi ve büyümeyi teşvik etmek için BAP'ın (6-Benzylaminopurine) farklı konsantrasyonları kullanılmış ve bu dozların sürgün uzunluğu ve kardeşlenmeye etkileri belirlenmiştir. Bu ortamda yaklaşık 4–6 hafta sonra uygun büyüklüğe gelenler (3–5 cm uzunluğa ulaşanlar) bölme yapılarak yine çoğaltma ortamına veya köklenme ortamına aktarılmıştır. Daha küçük sürgünler ise ayrılarak yeniden kardeşlenme ortamına konarak çoğaltma işlemine devam edilmiştir.

*Köklenme Aşaması;* Köklenme boyuna gelenler (3–5 cm) farklı dozda IBA (1,2,3,4,5 mg/L IBA) içeren köklendirme ortamında; kök sayısı, kök uzunluğu ve kök kalınlığına etkileri yönünden araştırılmıştır. Köklendirme ortamı olarak DKW makro elementleri yarıya indirgenerek kullanılmıştır (8). Bu köklenme ortamında (Çizelge 1) 30 günün sonunda köklenme durumu gözlenmiş ve değerlendirilmiştir. Köklenme ortamında kökler 1–2 cm uzunluğa eriştikten sonra dikim yapılması uygundur. Köklerin çok fazla uzaması köklenme kabından çıkarırken zararlanmalara sebep olmakta ve uzun kökler viyollere dikilirken dikim işlemini zorlaştırmaktadır (2). Köklenmiş bitkicikler ılık musluk suyunda ağardan arınıncaya kadar yıkılarak, düşük dozda fungusit içeren solüsyona daldırılmış ve uygun karışım ile doldurulmuş viyollere dikilmiştir. Viyoller kokos, kokos+perlit (3:1 v), torf ve torf+perlit (3:1 v) ile doldurulmuştur. Doku kültürü yöntemi ile üretilen fidanların kök sistemleri geleneksel metotla üretilenlere nazaran daha kuvvetli olmaktadır.

*Alıştırma Safhası;* Köklenmiş bitkicikler dikimi takiben uygun şartlara sahip olmayan seralarda; sera içerisinde oluşturulmuş alçak plastik tünel altında dış şartlara yavaş yavaş alıştırmıştır. Bu safhada bitkiciklerin çıkarıldığı ortamın nemi yüksek olmalıdır. Alıştırma esna-

sında doku kültüründen çıkmış bitkiciklerin geleneksel metotla yetiştirilenlere kıyasla stomalarının daha açık olması su kaybının fazla olması anlamına geldiği için ortam neminin sağlanmadığı sınırlı koşullarda alçak plastik tünel altına alınan bitkiciklere zaman zaman el spreyi ile püskürtme yapılarak nemli bir ortam sağlanmıştır. Bu safhada bitkiciklere düşük dozda gübreleme yapılarak aynı zamanda gelişmeleri teşvik edilmiş ve her hafta düşük dozda fungusit ile koruyucu ilaçlama yapılmıştır.

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Şebin ve KR–2 ceviz çeşitlerinin doku kültürü ile üretiminin amaçlandığı bu çalışmada; kullanılan besi ortamının, eksplant tipi ve kaynağının önemli olduğu görülmüştür. MS, WPM, DKW ortamlarında meristem, sürgün ucu ve üzerinde bir göz bulunan 1,5–2 cm uzunluğundaki eksplantlar ile oluşturulan kültürlerde MS ve WPM ortamlarında DKW ortamına nazaran çok daha fazla kararma meydana gelmiştir. Bu durum göz önüne alınarak DKW ortamı ile çalışmaya devam edilmiştir (5).

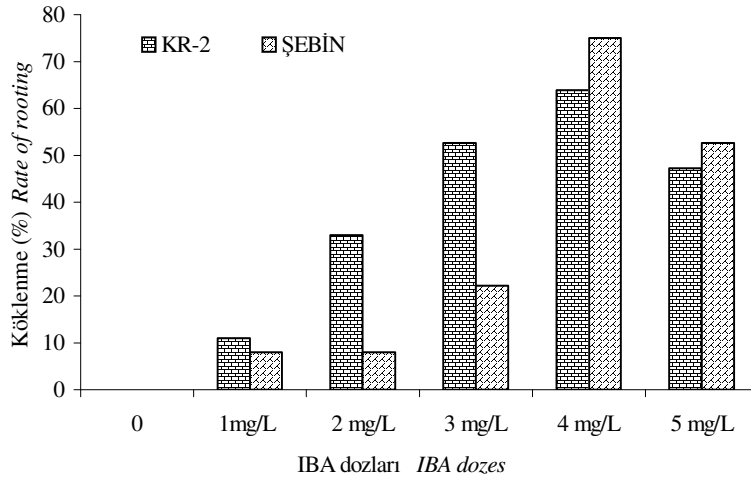
DKW ortamında meristem ile oluşturulan kültürlerde meristemler kararma ve bulaşmaya bağlı sebeplerden dolayı kaybedilmiştir. Birkaç kez bu deneme tekrar edilmiş meristem kültüründen sonuç alınamayacağına karar verilmiştir. Sürgün ucu ile oluşturulan kültürlerde de kararma ve bulaşma çok yoğun olmuş ve bu eksplant tipi ile de çalışmaya devam etmek mümkün görülmemiştir. Üçüncü eksplant tipi olarak seçilen 1,5–2 cm uzunluğunda, üzerinde bir göz bulunan genç sürgünlerle çalışmanın yürütülmesine karar verilmiştir. Bunlarda eksplant kaynağından alınan sürgünlerin orta kısımları kullanılmıştır. Sürgün ucuna yakın kısımlarda çok fazla kararma meydana gelmiştir. Son kısımların daha sert olması, odunsulaşması nedeniyle kullanılmamış ve sürgünün orta gözleri tercih edilmiştir. Her üç eksplant tipinde de kültür oluşturmaya takip eden ilk günlerde ortamdaki kararma yoğunluğu dikkate alınarak materyaller, 2–4 günde bir taze ortama aktarılmıştır (5).

Üç farklı eksplant kaynağından alınan materyal ile oluşturulan kültürlerde bahçeden alınan materyallerde, serada geniş saksılarda tutu-

lan 1–2 yaşlı bitkilerden alınan sürgünlere nazaran yoğun kallus oluşumu, yavaş gelişme ve çok yoğun bulaşma meydana gelmiştir. Cevizin mikro üretiminde kültür oluşturma safhasında karşılaşılan en önemli problem bulaşma ve kararma olarak görülmüştür. Ceviz eksplantlarının salgıladığı fenollerin oksidasyonu sonucu oluşan kararmalar eksplantların ölmelerine neden olmaktadır (5).

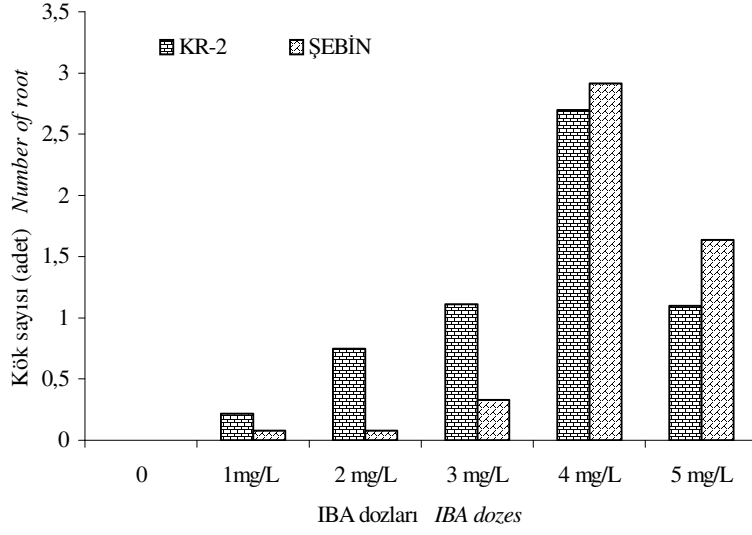
Doku kültüründe ceviz çeşitlerinin hızlı üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biri de mikro sürgünlerin köklenmesindeki güçlülüdür (1,4,5,8). Köklenmede IBA'nın 4 farklı dozunda farklı oranlarda köklenme elde edilmiştir. Mevcut çalışmada en yüksek köklenme, kök

sayısı, kök uzunluğu ve kök kalınlığı yönünden her iki çeşitte de 4 mg/L IBA dozunda gerçekleşmiştir. Şebin çeşidinde 4 mg/L IBA dozunda %75, KR-2 çeşidinde ise %63,9 oranında köklenme başarısı elde edilmiştir (Şekil 1,2,3,4). Alıştırma safhasında genç bitkilerin normal şartlara alışmasında güçlükler yaşanmıştır. *In vitro*'da köklendirilmiş bitkiciklerde alıştırma serasında gelişme görülmemiş aksine 4. haftadan itibaren bitkiciklerin sürgün ucundan başlayarak kök boğazına doğru ilerleyen kararmalar tespit edilmiştir. Bu durum bitkinin fizyolojik yapısından kaynaklanan hassasiyetin uygun olmayan çevresel şartlarla birleşmesi ile oluşan strese bağlanmıştır.



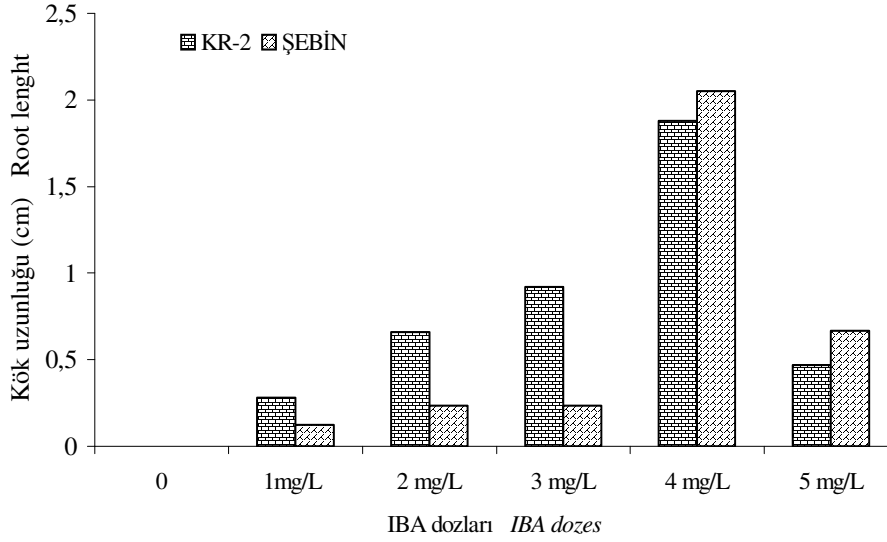
Şekil 1. İki ceviz çeşidinde IBA dozlarının köklenmeye etkisi.

Figure 1. Effect of IBA concentrations on rooting rate of two walnut cultivars.



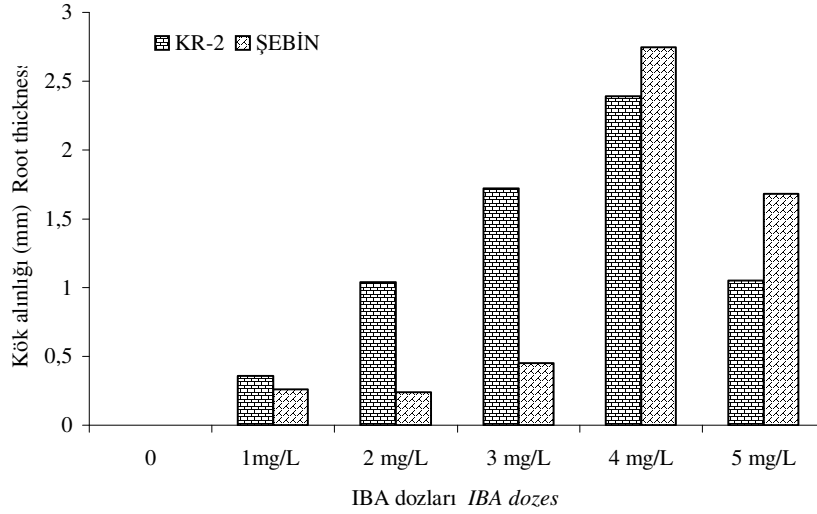
Şekil 2. İki ceviz çeşidinde IBA dozlarının kök sayısına etkisi.

Figure 2. Effect of IBA concentrations on number of roots formed in vitro of two walnut cultivars.



Şekil 3. İki ceviz çeşidinde IBA dozlarının kök uzunluğuna etkisi.

Figure 3. Effect of IBA concentrations on length of root of two walnut cultivars.



Şekil 4. İki ceviz çeşidinde IBA dozlarının kök kalınlığına etkisi.  
Figure 4. Effect of IBA concentrations on thickness of root of two walnut cultivars.

#### KAYNAKLAR

- Ding, P., D. Pei and L. Yuan, 2003. Optimal Rooting System Establishment For *in vitro* Microcutting of Six Walnut Cultivars (*Juglans regia* L.). XXVI. International Horticultural Congress. Canada (Abs.).
- Fidancı, A., M. Burak B. Erenoğlu ve M.E. Akçay, 2005. Determination of *in vitro* Propagation Techniques of Some Clonal Cherry Rootstocks. 5<sup>th</sup> International Cherry Symposium. June 06–10, 2005 Bursa-TURKEY (Basımda).
- Grusella, R., N., Badia and Ph. Boxus, 1987. Walnut Micropropagation: First Result. *Acta Horticulturae* 212. *in vitro* Problems Related to Mass propagation. 511-513
- Kaşka, N., 2001. Türkiye’de Cevizle İlgili Araştırmaların Değerlendirilmesi ve Geleceğe Bakış. *Türkiye I. Ulusal Ceviz Sempozyumu Bildirileri*. 1–11. 5–8 Eylül 2001, Tokat.
- Leslie, C., and G. McGranahan, 1992. Micropropagation of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 18.136–148.
- Natavel, J., and L. Bourrain, 2001. Plant Production of Walnut *Juglans regia* L. by *in vitro* Multiplication. *Abst. Acta Horticulturae* 544.
- Rodriguez, R., A. Revilla and C. Perez, 1989. Walnut (*Juglans* spp.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 5.99–125.
- Saadat Y.A., and M.J. Hennerty, 2001. The Effects of Different *in vitro* and *ex vitro* Treatments on the Rooting Performans of Persian Walnut (*Juglans regia* L.) Microshoots. *Abst. Acta Horticulturae* 544.

