

Okaliptus'te Klasik Bitki Doku Kültürü ve Yeni Nesil Biyoreaktör Uygulamalarında Son Gelişmeler

Recent Developments in Classical Plant Tissue Culture and New Generation Bioreactor Applications in *Eucalyptus*

 Meslihma KARAYEL^{1,*},  Recep YILDIZ²,  Senem UĞUR¹,
 Yeşim YALÇIN MENDİ¹,  Mustafa ALBAYRAK²

Özet

Eucalyptus türleri, hızlı büyüme ve kereste kaliteleri nedeniyle dünya genelinde ormancılıkta önemli bir yere sahiptir. Bu türlerin mikroçoğaltımı, genetik olarak üstün klonların elde edilmesi ve geniş çapta yaygınlaştırılması amacıyla yaygın olarak yapılmaktadır. Bu derleme, *Eucalyptus* türlerinin mikroçoğaltımındaki güncel teknikleri, karşılaşılan zorlukları ve başarı oranlarını ele almaktadır. Bu çalışmada, hem klasik doku kültürü yöntemleri hem de yeni nesil biyoteknolojik yaklaşımlar incelenmiştir. Özellikle, bazı araştırmacıların çalışmalarında tanımlanan fizyolojik olaylar ve hızlı mikroçoğaltım protokollerine vurgu yapılmıştır. Mikroçoğaltım protokollerinin optimizasyonunda, eksplant kaynağı, ortam kompozisyonu ve çevresel faktörler son derece önemlidir. *Eucalyptus* türlerinin mikroçoğaltımında kullanılan eksplantlar (nodal segmentler, kotiledon ve yaprak eksplantları) farklı araştırmacılar tarafından incelenmiştir, farklı *Eucalyptus* hibritlerinin mikroçoğaltımında karşılaşılan zorlukları ve bu zorlukların nasıl aşılabileceğini tartışmışlardır. Ayrıca, bazı araştırmacıların genotipten bağımsız protokollerin geliştirilmesi ve bu protokollerin ticari uygulamalara entegrasyonunu incelemiştir. Bunlara ek olarak, geçici daldırma biyoreaktör sistemleri (TIS) ile sürgün çoğaltımının iyileştirilmesi ve bu sistemlerin sağladığı avantajlar, detaylı bir şekilde ele alınmıştır. Sonuç olarak bu çalışma, *Eucalyptus* türlerinin mikroçoğaltımında, klasik doku kültürü yöntemleri ve biyoreaktörlerin kullanılması hakkında kapsamlı bir bilgi sunmaktadır. Bu tekniklerin optimizasyonu ve geniş çapta uygulanabilirliğinin artırılması, *Eucalyptus* türlerinin sürdürülebilir ormancılık uygulamalarında daha etkin bir şekilde kullanılmasını sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Eucalyptus*, Mikroçoğaltım, Doku Kültürü, Geçici Daldırma Sistemi (GDS).

Abstract

Eucalyptus species have an important place in forestry worldwide due to their rapid growth and timber quality. Micropropagation of these species is widely used to obtain genetically superior clones and to disseminate them on a large scale. This review discusses current techniques, challenges and success rates in micropropagation of *Eucalyptus* species. In this study, both classical tissue culture methods and new generation biotechnological approaches were examined. In particular, emphasis was placed on physiological events and rapid micropropagation protocols defined in the studies of some researchers. In the optimization of micropropagation protocols, explant source, medium composition and environmental factors are extremely important. Explants (nodal segments, cotyledon and leaf explants) used in micropropagation of *Eucalyptus* species were examined by different researchers, and they discussed the challenges encountered in micropropagation of different *Eucalyptus* hybrids and how these challenges can be overcome. In addition, some researchers have investigated the development of genotype-independent protocols and their integration into commercial applications. In addition, the improvement of shoot multiplication by temporary immersion bioreactor systems (TIS) and the advantages of these systems have been discussed in detail. In conclusion, this study provides comprehensive information on the use of classical tissue culture methods and bioreactors in micropropagation of *Eucalyptus* species. Optimization of these techniques and increasing their wide-scale applicability will enable more effective use of *Eucalyptus* species in sustainable forestry practices.

Keywords: *Eucalyptus*, Micropropagation, Tissue Culture, Temporary Immersion System (TIS).

1. Giriş

Angiospermae (kapalı tohumlu) bitkilerinin, Myrtales takımının, Myrataceae familyasının *Eucalyptus* cinsine mensup olan okaliptuslar, Akdeniz ve Ege'nin kıyı bölgelerinde yoğun olarak yetişmektedir. Anavatanı olan Avusturalya'da 150 m'ye kadar boylanabilen okaliptuslar, fakir topraklarda, bataklıklarda, kumsal ve çakıllı topraklarda yetişebilirler. Özellikle dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde yaygın şekilde yetiştirilen bitkiler arasındadır. Herdem yeşil bitkilerdir, çalılar halinde veya boylu ağaç olarak bulunan odunsu bitkilerdir ve çoğunlukla ağaç olarak bulunurlar. Yaprakları düz kenarlı, sade yaprak durumunda ve aşağıya doğru sarkıktır. Çiçekleri tek ya da şemsiyemsi salkım görünüşünde ve beyaz, kırmızı veya sarı renktedir. Meyveleri kapsül şeklindedir ve olgunlaştıkça kapsüllerin rengi yeşilden kahverengiye dönüşmektedir. Kazık kökleri güçlüdür. Yan kökleri genişçe bir alana yayılma gösterir (Etikan ve Kayabaşı, 2009; Brooker, 2002; Görcelioğlu, 1988).

Halk arasında sıtma ağacı, sağlık ağacı, kızıl okaliptus veya bataklık ağacı olarak da bilinmektedir (Özgün, 2013). Okaliptusların; odunları kereste olarak kullanılmasının yanı sıra yapraklarındaki değerli yağlardan, süs bitkisi olarak ve çiçeklerinin arıcılık gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Brooker, 2002; Görcelioğlu, 1988).

Dünyada görülen ekonomik gelişme ve hızlı nüfus artışı, odun hammaddesine olan ihtiyacı giderek arttırmakta ve dolayısıyla doğal ormanlarımız üzerinde bir baskı oluşturmaktadır. Bu nedenle, odun hammaddesi ihtiyacının karşılanmasında, hızlı büyüyen ağaç türleri ile endüstriyel orman ağaçlandırmalarının yaygınlaştırılması son derece önemlidir.

Türkiye'deki endüstriyel odun talebi yıllık 17-18 milyon m³ civarındadır ve bu talebin yaklaşık %94'ü yerli kaynaklardan karşılanmaktadır. Kalan miktar ise ithalat yoluyla temin edilmektedir. Ormancılık Ana Planı'na göre, Türkiye'de kişi başına düşen odun hammaddesi tüketimi yıllık 0,571 m³ olarak belirlenmiştir.

Gelişmiş ekonomilere sahip ülkelerde ise bu değer, kişi başına 1,0-1,5 m³ arasında değişmektedir. Bu durum, artan odun hammaddesi talebini karşılayabilmek için Endüstriyel Plantasyon İşletmeciliği'ne daha fazla önem verilmesi gerektiğini ve bu sayede odun üretiminin artırılmasının hedeflendiğini göstermektedir (OGM, 2013).

Biyoteknolojik doku kültürü yöntemleri ile yılda yaklaşık 1 milyon fidan elde edilebilmekte, klonal fidan üretimi ile hem birim alandan daha fazla ürün elde etme, hem de istenilen miktarda üstün nitelikli bireylerin elde edilmesine olanak sağlanmaktadır.

Son yıllarda klasik doku kültürüne alternatif olarak da ticari ölçekte fidanlıklarda klonal üretimin sağlanması için yeni nesil biyoreaktör sistemleri (RITA, PlantForm, SETIS, ELECTIS vb. gibi özel yetiştirme kapları) kullanılmaya başlanmıştır.

Bu sistemin avantajları arasında : Bitkinin besin ortamına homojen bir şekilde temas etmesi, oksijensizlik nedeniyle gelişmemesi (boğulma) ve vitrifikasyon sorunlarının minimum seviyede görülmesi, kahverengileşmeye yol açan toksik bileşiklerin katı-sıvı ortama oranla birikmesi, kültür kapları içindeki atmosferin periyodik olarak değişmesi sayesinde CO₂ ve etilen gibi zararlı gazların birikmesinin önlenmesi, büyük ölçekli kültür kapları kullanılmasıyla altkültür süresinin uzaması, iş gücünden tasarruf sağlanması, hava sirkülasyonu nedeniyle oluşan baloncukların hücre bölünmesini teşvik etmesi ve böylece hem çoğalma oranının hem de sürgün kalitesinin artması sayılabilir.

Bu çalışmada ise okalıptus'te klasik bitki doku kültürü ve yeni nesil biyoreaktör uygulamalarında son gelişmeler hakkında bazı bilgiler derlenmiştir.

2. Okalıptus Bitkisi Çoğaltım Yöntemleri

Okalıptus'da fidan eldesi, tohum, çelikle veya doku kültürü ile sağlanmaktadır (Schroeder, 2017). Çelikle çoğaltımda büyük bir köklenme problemi yaşandığı için alınan çeliklerde %50-60 civarında kayıplar yaşanmaktadır. Bu nedenle, *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. klonlarının üretilmesine yönelik hızlı klonal çoğaltma tekniklerine, genel verimliliğin artırılmasına yönelik stratejik yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1. Okalıptus Fidanlık Tekniği

Okalıptus fidanı yetiştirmek için tohum ve çelik (klonal fidan üretimi) kullanılmaktadır (Anonim, 2024).

2.2. Çelikten Fidan Üretimi

Çelikten yetiştirilmiş fidan (klonal fidan), ıslah çalışmaları sonucu belirlenen üstün niteliklere sahip bireylerden alınan dal, gövde, kök vb parçaların köklendirilmesiyle elde edilmektedir. Çelikle okalıptus fidanı yetiştirilmesindeki amaç, geleneksel ıslah çalışmaları sonucu bulunan üstün nitelikli ağaçların üstün özelliklerini kaybetmeden aynı genetik özellikleri taşıyan birbirinin kopyası bireyler elde etmektir (Anonim, 2024).

Okalıptus zor köklenen bitki türleri arasında yer almaktadır ve çelikle fidan üretiminde etkili faktörler arasında çelik alacak materyalin (anaç ve çelik) fizyolojik olarak genç olması,

nem, sıcaklık ve ışığın optimum derecede olması istenmektedir. Köklenme için ise tür için istenen köklenme ortamları hazırlanması gerekmektedir (Anonim, 2024).

Yapılan köklendirme çalışmalarına bakıldığında, 2 farklı *Eucalyptus camaldulensis* klonlarının, farklı yetiştirme ortamlarında (Hindistan cevizi torfu, vermikompost ve kül) ve IBA'nın (Kontrol, 3000 ppm, 4000 ppm ve 5000 ppm) kullanarak filizlenmesi ve köklenme tepkisi üzerine etkisini incelemiştir. IBA konsantrasyonlarında, 3000 ppm IBA uygulanan çeliklerde, en yüksek sürgün yüzdesi, sürgün uzunluğu, çelik başına yaprak sayısı, çelik başına kök sayısı, köklenme yüzdesi, hayatta kalma yüzdesi, kök uzunluğu ve toplam bitki boyu elde etmiştir ve en yüksek ölüm yüzdesi kontrol (IBA içermeyen) ortamı olduğu bildirmiştir (Kumar, 2021).

Eucalyptus nitens (Deane & Maiden) Maiden türünde yapılan çelikle çoğaltma çalışmasında, 48 saat boyunca 20 mg.l⁻¹ oksin solusyonuna daldırma uygulamışlar ve en az 4 hafta bekletildikten sonra daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Luckman ve Menary, 2002).

2.3. Tohumdan Fidan Üretimi

Kaliteli fidan üretimi, ekilecek tohum kaynağının tespiti ile başlar. Tohum kaynağı olarak öncelikle tohum bahçeleri ve döl denemeleri sonucuna göre tesis edilmiş tohum plantasyonları kullanılmalıdır. Tohum plantasyonlarının bulunmaması durumunda ağaçlandırma sahalarından düzgün gövdeli çevresindeki ağaçlara göre daha boylu ve kalın çaplı, sağlıklı, birbirinden en az 45 m mesafede, asgari 5 ağaçtan alınacak tohumlar karıştırılarak kullanılmalıdır. Mevsimi dışında çiçek açan ve rastgele ağaçlardan veya birkaç bireyin bulunduğu ağaç topluluklarından tohum alınmamalıdır. Bu şartları sağlayan ağaçlardan *E. camaldulensis*'te Eylül aylarından sonra tohum toplanabilir (Anonim, 2024).

2.4. Doku Kültürü İle Üretimi

Son yıllarda, doku kültürü teknikleri ile orman bitkilerinin mikroçoğaltılması konusunda yapılan araştırmalar hız kazanmıştır. Ülkemiz koşullarına uyum sağlayabilen ve ekonomik açıdan yetiştiriciliği yapılabilen iki okaliptüs türü, *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. ve *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden, doku kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu türler, hem biyotik hem de abiyotik zararlılara karşı dayanıklı olup, aynı zamanda yüksek odun verimi sağlayan ağaç ırklarının geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Geleneksel ıslah yöntemleri ile modern biyoteknolojik tekniklerin birleştirilmesi, hızlı

büyüyen yerli orman türlerinin üretim potansiyelini artırmak amacıyla yapılan araştırmaların temel odak noktalarından biridir. Biyoteknolojinin süs bitkileri sektöründe kullanımı, bu iki alanın hızla gelişmesine katkı sağlamaktadır.

Günümüzde biyoteknolojik yöntemler, üretilmesi güç olan veya ticari değeri yüksek türlerin (örneğin; ficus, orkide, aloe vera, anthurium, krizantem, gül, Afrika menekşesi, eğrelti ve spathiphyllum gibi iç mekan süs bitkileri) çoğaltılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.5. Okaliptus Bitkisinde Doku Kültürü Çalışmaları

Orman ağaçlarında yürütülen biyoteknoloji çalışmalarının sayısı son yıllarda hızlı bir şekilde artmaktadır. Biyoteknolojik uygulamalardan doku kültürü ve klonal çoğaltım vs. yaygın olarak kullanılmaktadır (Filiz ve ark., 2011).

1980'li yıllardan itibaren orman ağaçları biyoteknolojisi gelişmeye başlamış ve ağaç fizyolojisi, ağaç ıslahı ve çoğaltımını kapsayacak şekilde günümüzde de gelişmeye devam etmektedir (Burdon ve Libby, 2006). Biyoteknolojide; mikroçoğaltım, somatik embriyogenesis, anter kültürü, protoplast kültürü gibi doku kültürü teknikleri ile çoğaltım önem kazanmıştır. Diğer tarımsal türlerin aksine, orman ağaçlarındaki uzun jenerasyon süresi geleneksel ıslah için önemli bir engel oluşturmaktadır (Filiz ve ark., 2011).

Süs bitkileri sektörü ve biyoteknolojinin kullanımı hızla gelişen sektörler arasındadır. Biyoteknoloji sektörü günümüzde; çoğaltılması zor olan türlerin ve ticari olarak önemli olan tür ve çeşitlerin çoğaltımında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Doku kültüründe, *Eucalyptus camaldulensis* Dehn.'nin sürgünleri mikro çoğaltım için en yaygın kullanılan tekniktir ve her biri 2 ile 6 hafta süren aşamalardan oluşur. Sürgün kültürü, sürgün çoğaltımı, sürgün uzaması, kök oluşumu ve dış koşullara alıştırmaya, ortalama 6 ay civarında bir süre gerektirir (Sumkaew ve ark, 2010). Bu protokollerin süresini kısaltmanın olası bir yolu, bazı aşamaların aynı zaman diliminde yoğunlaşmasıdır.

Bu yüzden son yıllarda doku kültürü teknikleri kullanılarak orman bitkilerinin mikro çoğaltımı yapılmaktadır. Yurdumuzun ekolojik koşullarına uyum sağlayabilen ve ekonomik olarak yetiştiriciliğinin yapılabileceğine karar verilen iki okaliptüs türü belirlenmiştir. Bunlar; *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. ve *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden türleridir (Anonim, 2024).

Nitekim birim alandaki odun üretiminin artırılması ve biyotik-abiyotik zararlılara karşı dayanıklı orman ağacı ırklarının geliştirilmesi amacıyla hızlı gelişen yerli orman ağacı

türlerinde geleneksel ıslah ile modern biyoteknolojik yöntemlerin birlikte kullanılması hakkında araştırmalar artmaktadır.

Ne yazık ki, *Eucalyptus camaldulensis* türünde odunsu aşılama, budama veya köklü çelikler gibi geleneksel eşeysiz çoğaltma teknikleri başarılı bir şekilde geliştirilememiştir. Okalıptus'un çelikle üretiminde optimal sera koşullarında dahi %50-60 kayıplar yaşanmaktadır (Anonim, 2024)

In vitro çoğaltım, hem iğne yapraklı hem de sert ağaç türlerinde ağaçların kitlesel klonal üretimi için uygun bir tekniktir. Okalıptuslarla yapılan çalışmalar incelendiğinde ise;

Soğuğa toleranslı iki tür (*E. macarthurii* ve *E. smithii*), soğuğa toleranslı bir melez (*E. macarthurii*×*E. grandis*) ve *E. saligna*, tarlada yetiştirilen fidelerden ve klonal çitlerden toplanan düğüm eksplantlarından *in vitro* çoğaltılmıştır. Sürgün büyümesi, 0.1 mg.l⁻¹ BA içeren modifiye MS ortamında başlatılmıştır. 0.2 mg.l⁻¹ BA + 0.01 mg.l⁻¹ NAA içeren modifiye MS ortamı, sürgün çoğalmasını teşvik etmede en etkili olarak bulunmuştur. Kök oluşumu, 2 mg.l⁻¹ IBA içeren yarı-kuvvetli modifiye MS ortamında gerçekleştirilmiştir (Le Roux ve Staden, 1991).

Eucalyptus nitens Maiden'in mikro çoğaltılmasında fideler ve 1 yaşındaki sürgün uçları ve düğümleri kullanılmıştır. En iyi çoğalma oranı (2.25) ise Murashige ve Skoog (1962) ortamının makro besin maddelerini (yarı kuvvette) ve mikro elementlerini içeren ortamda kültüre alındığında elde edilmiştir. Büyüme düzenleyicilerinin bulunmadığı bazal ortamda da kök oluşumuna rastlanmıştır. Kök gelişimi için en iyi sonuçlar, 14,7 µM 3-indolebutirik asit (%60.0 kök indüksiyonu) içeren bir ortamda elde edilmiştir (Gomes ve Canhoto, 2003).

Mikroçoğaltım amacıyla tarlada yetiştirilen *E. grandis* Hill ex Maiden ve *E. grandis* melezlerinin, sürgün materyalinin toplanması ve kısa süreli depolanması için basit bir yöntem oluşturulmuştur. İlk çalışmalar, sera dışında yetiştirilen, gübre ve fungusit uygulaması yapılmayan bitkilerle yürütülmüştür. Yöntem, daha sonra test edilmiştir ve tarlada yetiştirilen klonlara uyarlanmıştır. Bu işlem, üç boğumlu ve yapraksız 35-50 mm uzunluğundaki sapların toplanmasını, bunlara %70 (h/h) etanol püskürtülmesini ve nemli steril vermikülit içeren cam şişelerde 48 saat boyunca saklanmasını içermiştir. İlk kültür ortamına (tomurcuk kırılması) 1 g.l⁻¹ kalsiyum hipoklorit eklenmesi endojen kontaminasyonunu inhibe etmiştir. Tarlada yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantların

depolanmasından sonra çoğalma verimi, klona bağlı olarak 160-264 sürgün/100 eksplant olmuştur (Paula ve ark., 2003).

Eucalyptus globulus Labill'in *in vitro* elit genotiplerini çoğaltmaya yönelik bir yöntem planlanmıştır. Bitki materyalinin toplanması için en uygun dönemin Kasım-Nisan arasında olduğu belirlenmiştir. Bu dönemde epikormik bir tomurcuğun filizlenmesi için gereken sürenin daha kısa olduğu ve filizlenen dalların oranının ve filizlenen epikormik tomurcukların ortalama sayısının diğer toplama zamanına (Mart'tan Temmuz'a) göre daha yüksek olduğu bilinmekteydi. Aksenik kültürleri oluşturmak için en iyi tepki, mikroçoğaltım sürgün uçlarından başlatıldığında elde edilmiştir. Büyüme düzenleyicilerle ilgili olarak çoğalma için en iyi yanıt 6-benzilaminopurin (BA) ve Indolebutirik asit (IBA) ile elde edilmiş ve en iyi sonuçlar sırasıyla 0.2 mg.l⁻¹/0.02 mg.l⁻¹ olmuştur. Değerlendirilen 58 klondan beşinin çoğalmaya iyi yanıt verdiği kabul edilmiştir. En iyi uzama, 0.1 mg.l⁻¹ BA/0,5 mg.l⁻¹ IBA içeren ortamdan sağlanmıştır. Köklenme tepkisi klona ve tedaviye bağlı olarak değişkenlik göstermiş ve %25'i geçmemiştir. Köklenen sürgünler seradaki saksı toprağına başarıyla aktarılmıştır (Sotelo ve Monza, 2007).

Oldukça önemli okalıptus melezlerinin çoğaltılmasına yönelik mikro çoğaltma protokolleri elde edilmiştir. FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *Eucalyptus*) olarak iki okalıptus melezi ve FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* F. V. Muell x *Eucalyptus citriodora* Hook) için seçilmiş olgun ağaçlardan (30 - 32 yaş arası) eksplant olarak düğüm segmentleri kullanılarak mikro çoğaltma sağlanmıştır. Bu okalıptus melezleri Dehradun Orman Araştırma Enstitüsü tarafından üretilmiştir (Arya ve ark., 2009).

Eucalyptus tereticornis Sm.'nin seçilmiş seçkin bir klonunun mikro çoğaltılmasını etkileyen çeşitli faktörler araştırılmıştır. Test edilen farklı sitokinler arasında 6-benziladenin'in, sürgün çoğalması ve uzaması için en etkili sitokin olduğu kanıtlanmıştır. Maksimum köklü sürgün sayısı (%80.7), 5.0 µM indolebutirik asitle desteklenen 1/4 kuvvetindeki MS ortamından elde edilmiştir. Fotosentetik olarak aktif radyasyon (PAR) altında inkübe edilen kültürlerde, soğuk floresan ışıklar (CFL) altında inkübe edilen kültürlerle karşılaştırıldığında, çoğalan, uzayan sürgünlerin sayısı, köklenme sıklığı ve bitkilerin iklimlendirilmeden sonra hayatta kalmasının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Aggarwal ve ark., 2012).

Bu araştırmanın amacı bu türün kotiledon boğumlarından mikro çoğaltılmasına yönelik bir protokol oluşturmaktır. Donör olarak 16 günlük fidanlar kullanılmıştır.

Eksplantlar kotiledon boğumlarının uyarılması için iki bölümden oluşmuştur. Karanlık bir kültür ve bunu takip eden bir açık kültür. Baz alınan ortama, 30 g.l⁻¹ sakaroz, % 10 hindistan cevizi suyu eklenmiş ve 7 g.l⁻¹ agar ile katılaştırılmıştır. Karanlık kültür için ortam 3.6 µM NAA (Naftalenoasetik asit) ve 4.4 µM BAP (6-Benzilaminopurin) ile desteklenmiştir (Da Silva ve ark., 2015).

De Oliveira ve ark. (2017)'nin yapmış oldukları çalışmada, *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* AEC 224 klonunun yaprak eksplantlarından dolayı organogenez için bir protokol oluşturulması amaçlanmıştır. Kalojenez aşaması sırasında, çeşitli NAA konsantrasyonları ve ardından TDZ ile birleştirilmiş NAA veya 2,4-D, 30 gün boyunca JADS kültür ortamında test edilmiştir, ardından eksplantların, 5.0 uM BA ve 0.5 uM NAA içeren rejenerasyon ortamında alt kültürü yapılmıştır. Bu ortamlarda eksplant oksidasyon oranı yüksek çıkmıştır (%95). Bu nedenle oksidasyonu azaltmak için farklı kültür ortamları karşılaştırılmıştır (De Oliveira ve ark., 2017).

Bu çalışma, çoğaltılması zor olan okalıptusların üstün tam kardeş melezlerinde (7 yaşındaki ağaçlar) makro ve mikro çoğaltma yoluyla köklendirme hakkındaki bilgi birikiminin artırılması amaçlanmıştır. Varyans Analizi (ANOVA), *Enterobacter* sp. (106 cfu.ml⁻¹) ile desteklenen IBA (2.000-4.000 ppm) hormon uygulamasının makropropagasyon yoluyla hibrit köklenmesini önemli ölçüde artırdığını ($p < 0.05$) ortaya koymuştur. Özellikle, FRI-PH3 (*Corymbia torelliana* × *C. citriodora*; 2A) ve FRI-PH4 (*E. pellita* × *E. urophylla*; 1D) hibrit genotipleri için 3.000 ppm IBA'da sırasıyla %10,00 ± 0,91 ve %3,75 ± 0,48 maksimum kök gelişimi ile köklenme gözlenmiştir. Mikroçoğaltım çalışmalarında, FRI-4s genotipi (*E. tereticornis* × *E. camaldulensis* baltalık sürgünleri, 100) çeşitli hormon kombinasyonları (BAP, KIN ve TDZ) ile önemli farklılıklar ($p < 0.01$) göstermiş; ve maksimum sürgün sayısı (4. 0 ± 0.82) çoğalması ve ortalama sürgün uzunluğunun 2.5 ± 0.15 cm olması Duncan Çoklu Aralık Testi (DMRT)'ne göre 0.5 mg.l⁻¹ BAP, ½ MS ortamı ve 0.5 mg.l⁻¹ KIN'de gözlemlenmiştir (Bhandari ve ark., 2022).

Maerua crassifolia Forssk'un mikro çoğaltımı için hızlı ve etkili bir *in vitro* çoğaltma protokolü geliştirilmiştir. 7.5 µM 6-benzilaminopurin (BA) ve 1.0 µM 1-naftaleneasetik asit (NAA) içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamı, en yüksek sürgün oluşumunu (yetiştirilen hipokotillerin %85.7'sinde eksplant başına 13.9 sürgün) sağlamıştır. Diğer tüm uygulamaların yanı sıra, en iyi *in vitro* kök oluşumu, 1.0 µM indol 3-butirik asit (IBA) içeren yarı-kuvvetli MS ortamından elde edilmiştir. Yetiştirilen sürgünlerin %94.1'i mikro sürgün başına ortalama 6.8 kök oluşturmuştur. Mikro çoğaltılan bitkilerin genetik doğruluğu akış

sitometrisi yoluyla doğrulanmıştır. Mevcut çalışmanın sonuçları, nesli tükenmekte olan *M. crassifolia* ağaçlarının mikro çoğaltılmasına yönelik basit, uygun maliyetli ve etkili bir protokolü açıklamıştır (Alatar ve ark., 2023).

Geçici daldırma biyoreaktör sistemleri, sıvı besin ortamı veya sıvı/hava giriş ve çıkış sistemleri kullanılarak steril koşullarda bitki yetiştirilmesini sağlayan bir çoğaltım sistemidir. Sistem, ayarlanabilir havalandırma ve basınç altında daldırma sistemine sahiptir ve hava akımı vasıtasıyla çalıştırılır. Geçici daldırma sisteminin (TIS) avantajları arasında emek ve zamandan tasarruf, çok sayıda bitkicik üretiminin kolaylaştırılması ve bitkiciklerin ortamla teması yoluyla besinlerin kolayca alınmasının kolaylaştırılması yer alır. Dezavantajları arasında, sürekli daldırılan kültürlerde fizyolojik bozukluklar, asfiksi, hiperhidrisite ve kontaminasyon tüm bitkiciklerin kaybına yol açabilir. Geçici daldırma sistemleri; RALM, SETIS, ELECTIS, PLANTFORM, BIT[®], PLANTIMA ve RITA[®] sistemlerini içerir. Bunlara ek olarak, modifiye edilmiş biyoreaktörler de vardır (Murthy ve ark., 2023).

Okaliptus bitkilerinde yapılan geçici daldırma sistemi (GDS) ile yapılan çalışmalar kısıtlıdır fakat yapılan çalışmalar incelendiği zaman kullanılan GDS sistemlerinden BIT[®], RITA[®] ve modifiye edilmiş sistemler kullanılmaktadır. *Eucalyptus* türlerinde yapılan çalışmalar Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. *Eucalyptus* türlerinin geçici daldırma sistemi ile çoğaltılması

Türler	Eksplant	GDS	Daldırma Süresi	Referanslar
<i>Eucalyptus grandis</i> ve <i>hybrids</i>	Sürgün	RITA [®]	30 sn / 10 dk	Alister ve ark., 2005
<i>Eucalyptus camadulensis</i>	Sürgün	İkili katman ve ikili şişe	1 dk / 8 sa	Sumkaew ve ark., 2010
<i>Eucalyptus globulus</i>	Sürgün	BIT [®]	2 dk / 12 sa	González ve ark., 2011
<i>Eucalyptus urograndis</i>	Sürgün	Modifiye TIS	3 dk / 12 sa	Palhares ve ark., 2018

3. Sonuç ve Öneriler

Ekonomik gelişme ve hızlı nüfus artışı, odun hammaddesine olan ihtiyacı giderek arttırmakta ve dolayısıyla doğal ormanlarımız üzerinde bir baskı oluşturmaktadır. Bu

nedenle, odun hammaddesi ihtiyacının karşılanmasında hızlı büyüyen ağaç türleri ile endüstriyel orman ağaçlandırmalarının yaygınlaştırılması önem taşımaktadır. Okalıptus, hızlı bir selüloz hamuru ve masif odun kaynağı olarak son yıllarda büyük önem kazanmış bir odunsu bitki türüdür. Bu çalışmada ise *Eucalyptus* türünün geleneksel ve biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesine yönelik mevcut çalışmalar derlenmiştir. Okalıptus bitkisinin çoğaltım tekniklerine baktığımız zaman klasik çoğaltım yöntemlerinin (tohumla ve çelikle) avantajlar arasında, bu yöntemlerin basit ve düşük maliyetli olması öne çıkar. Aynı zamanda, tohumla üretim genetik çeşitliliği artırarak çevresel koşullara uyum sağlar. Ancak, bu durum ticari üretim için genellikle istenmeyen bir durumdur. Çelikle okalıptus üretimi, üstün özellikteki anaçların, üstün özelliklerini kaybetmeden aynı genetik özellikleri taşıyan birbirinin kopyası bireyler elde edilmektedir. Seçilen bitkilerin özelliklerini koruma imkanı sunar. Bu tekniğin dezavantajları arasında çelikle üretimde köklenme oranları genellikle düşüktür ve bu durum üretimde kayıplara neden olabilir. Ayrıca, her iki yöntemde de süreçler genellikle daha uzun sürer, hastalık ve zararlılara karşı duyarlılık yüksektir.

Geleneksel yöntemlerin sınırlamaları, biyoteknolojik yöntemlerin bu alandaki önemini arttırdığı ve daha verimli çözümler sunduğu ortaya çıkmaktadır. Biyoteknoloji sektörü günümüzde; çoğaltılması zor olan türlerin ve ticari olarak önemli olan tür ve çeşitlerinin üretilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda doku kültürü yöntemleri ile kitlesel çoğaltım yapan araştırmacılar, geçici daldırma sistemlerini kullanarak protokoller geliştirmişlerdir. Bu yöntemle bitkinin tüm özellikleri birebir yeni bitkilere aktarılır. Bu, özellikle üstün özelliklere sahip ticari türlerin çoğaltılması için idealdir. Ayrıca, bu yöntem sayesinde hızlı ve klonal üretim sağlamaktadır. Bitkicikler, kontrollü ve steril koşullarda olduğu için hastaliksız olarak çoğaltılmaktadır. *Eucalyptus* sürgünlerinin çoğaltımında en yaygın kullanılan teknik olarak ortaya çıkmaktadır ve bu durum araştırmacıların çalışmalarına göre desteklenmektedir.

Biyoteknolojik yöntemler arasında özellikle geçici daldırma sistemi, klonal çoğaltımın hızlandırılmasında öne çıkmaktadır. *Eucalyptus* bitkilerinde geçici daldırma sistemi tekniğini kullanarak yapılan çalışmalar kısıtlıdır fakat bu teknik ticari doku kültürü laboratuvarlarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistemin başlıca avantajları yüksek miktarlarda klonal çoğaltım, hızlı üretim ve hastaliksız bitkicikler elde edilmektedir. *Eucalyptus camaldulensis* klonlarının üretilmesine yönelik hızlı bitkisel çoğaltım tekniklerine, genel verimliliğin artırılmasına yönelik stratejik bir yolda ulusal ve dünya çapındaki ormancılık şirketleri tarafından ihtiyaç duyulduğu FAO tarafından duyurulmuştur.

Bu araştırmalar göz önüne alındığında *Eucalyptus* türünün biyoteknolojik çalışmalar ile desteklenmesinin ve üretilmesinin önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Teřekkür

Bu çalışma VIII. Ulusal Süz Bitkileri Kongresinde poster sunum olarak sunulmuştur.

Kaynaklar

- Aggarwal, D., Kumar, A., Sharma, J., & Reddy, M. S. (2012). Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48, 521-529.
- Alatar, A. A., Qahtan, A. A., Abdel-Salam, E. M., Faisal, M., & El-Sheikh, M. A. (2023). Development of an Efficient and Rapid Micropropagation Protocol for in vitro Multiplication of *Maerua crassifolia* Forssk. *Forests*, 14(6), 1160.
- Alister, B. M., Finnie, J., Watt, M. A., & Blakeway, F. (2005). Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, 425-442.
- Anonim. (2024). *Okalıptus yetiştiriciliği*. Orman Bakanlığı, Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü.
- Arya, I. D., Chauhan, S. S. S., & Arya, S. (2009). Micropropagation of superior eucalyptus hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* FV Muell x *E. citriodora* Hook): A commercial multiplication and field evaluation. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), 5718.
- AVCIOĞLU, E. (1982). Türkiye'de Okalıptüsle Ağaçlandırılacak Orman Alanları Özel Ağaçlama Sahalarının Miktar ve Koşulları Üzerine Etüt Çalışmaları. *Kavak ve Hızlı GYTOA Araştırma Enstitüsü Dergisi, İZMİT*, 61-73.
- Bhandari, M. S., Maikhuri, S., Thakur, A., Panwar, G. S., Shamoan, A., & Pandey, S. (2022). Rapid multiplication of mature *Eucalyptus* hybrids through macro-and-micropropagation. *The Nucleus*, 65(3), 379-389.
- Brooker, I. (2002). Botany of the eucalypts. In *Eucalyptus* (pp. 17-49). CRC Press.
- Burdon, R. D., & Libby, W. J. (2006). *Genetically modified forests: from Stone age to modern biotechnology* (p. 79). Durham, North Carolina, USA: Forest History Society.

- Da Silva, A. L. L., Gollo, A. L., Brondani, G. E., Horbach, M. A., Oliveira, L. S., Machado, M. P., ... & Costa, J. (2015). Micropropagation of *Eucalyptus saligna* Sm. from cotyledonary nodes. *Pak. J. Bot*, *47*(1), 311-318.
- de Oliveira, C., Degenhardt-Goldbach, J., de França Bettencourt, G. M., Amano, E., Franciscon, L., & Quoirin, M. (2017). Micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* AEC 224 clone. *Journal of Forestry Research*, *28*, 29-39.
- Etikan, S., & Kayabaşı, N. (2009). Okaliptüs (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnhardt) Ağacının Yapraklarından Elde Edilen Renkler ve Bu Renklerin Bazı Haslıkları Üzerine Bir Araştırma. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, *10*(2), 153-161.
- Filiz, E., Çiçek, E., & Aydın, Y. (2011). Forest genetics and biotechnology. *Turkish Journal of Forestry*, *12*(2), 155-162.
- Gomes, F., & Canhoto, J. M. (2003). Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *39*, 316-321.
- González, R., Ríos, D., Avilés, F., & Sánchez-Olate, M. (2011). In vitro multiplication of *Eucalyptus globulus* by temporary immersion system. *Revista Bosque*, *32*(2), 147-154.
- Görcelioğlu, E. (1988). Ormancılık ve çevre açısından okaliptüs. *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University*, *38*(1), 37-44.
- Gürses, M. K., Gülbaba, A. G., & Özkurt, A. (1995). Türkiye’de okaliptüs yetiştiriciliğinin geliştirilmesi hakkında rapor. *Doğu Akdeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü*.
- Kumar, G. (2021). *Effect of rooting hormone with different growing media on sprouting and rooting response of Eucalyptus clones* (Doctoral dissertation, College of Forestry, Ranichauri Campus, VCSG Uttarakhand University of Horticulture and Forestry).
- Roux, J. L., & Staden, J. V. (1991). Micropropagation of *Eucalyptus* species.
- Luckman, G. A., & Menary, R. C. (2002). Increased root initiation in cuttings of *Eucalyptus nitens* by delayed auxin application. *Plant Growth Regulation*, *38*, 31-35.

- Murthy, H. N., Joseph, K. S., Paek, K. Y., & Park, S. Y. (2023). Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects. *Frontiers in plant science*, *14*, 1159588.
- Özgün, C. (2013). Osmanlı ağaç kültüründe yeni ve egzotik bir tür: Okalıptüs. *Çağdaş Türkiye Tarihi Araştırmaları Dergisi*, *13*(26), 5-29.
- Palhares, G. A., Sánchez, R. R., Ruiz, M. C., Trina, D. P., García, Y. G., & González-Olmedo, J. L. (2018). Effects of photomixotrophic conditions on plants of *Eucalyptus urograndis* propagated in temporary immersion bioreactors. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, *3*(2), 239101.
- Paula Watt, M., Berjak, P., Makhathini, A., & Blakeway, F. (2003). In vitro field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *75*, 233-240.
- Schroeder, P. F. (2017, April). Propagation of eucalypts. In *Durable eucalypts on drylands: protecting and enhancing value* (Altaner, CM, Murray, TJ, Morgenroth, J.(eds). *Workshop proceedings* (pp. 104-111).
- Sotelo, M., & Monza, J. (2007). Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. *Agrociencia Uruguay*, *11*(1), 81-89.
- Sumkaew, R., Pankaew, Y., Puangchit, L., Siripatanadilok, S., & Kokkatiem, S. (2010). In vitro seedling of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. using temporary immersion system with twin flasks.