

Orman Bakanlığı Yayın No: 099
Müdürlük Yayın No: 19

ISSN 1300 - 9508



**SİĞLA AĞACI (*Liquidambar orientalis* Mill.)'nin
DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİĞİ İLE ÜRETİLMESİ**

**Propagation of (*Liquidambar orientalis* Mill.) Using
Tissue Culture Technique**

ODC : (232.328.9)

Dr. Ali GENÇ

TEKNİK BÜLTEN NO: 14

1999

**T.C.
ORMAN BAKANLIĞI
EGE ORMANCILIK ARAŞTIRMA
ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**

EGE FORESTRY RESEARCH
INSTITUTE

İZMİR - TÜRKİYE

ÖNSÖZ

Hamamelidales takımının, Hamamelidaceae familyasının, Liquidambar cinsi içerisinde yer alan sığla ağaçlarının yer yüzünde 3 önemli türü bulunmaktadır. Bunlar, Amerika Birleşik Devletlerinin güneydoğu sahilinde bulunan Amerikan sığla ağacı, Sweetgum (Liquidambar styraciflua L.) formosa adasında ve Çin'in kuzeybatısında yetişen formaza sığlası (Liquidambar formosana) ve Türkiye'nin güneybatısında toplu olarak meşcereler oluşturan, onun dışında grup ve küme şeklinde Antalya, Mersin, Denizli, Aydın, Isparta illeri içerisinde çok özel yerlerde ve Rodos Adasında görülen Anadolu sığla ağacı (Liquidambar orientalis Mill.)'dir. Gövdelerinin yaralanması ile elde edilen sığla eterik yağı özellikle parfüm sanayisinde, fiksator olarak, çok eski zamanlardan beri kullanılmaktadır.

Uzun zaman, dünya sığla yağı piyasasında monopol olmamızı sağlayan sığla ormanları, bugün yaşlı, degrade ve ıslaha muhtaç durumda bulunmaktadır. Vejetatif üretimdeki zorluk, zengin genetik varyasyonundan yararlanmamızı engellemektedir. Gerek doku kültüründe kitlesel üretim amacıyla ve gerekse klasik vejetatif yöntemlere yardımcı olması açısından, bu çalışma E.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Islahı Ana Bilim dalınca doktora çalışması olarak verilmiş ve E.Ü. Rektörlüğü Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir. Fona sağladığı destek nedeniyle teşekkür ederim. Başlangıçta E.Ü. Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülen çalışmalar daha sonra Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Doku kültürü laboratuvarının kurulmasıyla burada yürütülmüştür.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm doktora danışmanım, Hocam Prof. Dr. Metim Birkan YILDIRIM'a, dersleriyle beni konuya hazırlayan ve çalışmam boyunca yardımını gördüğüm Hocam Prof.Dr. Ülkü EMİROĞLU'na, çalışmalarımnda Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü'nün her türlü olanağını sağlayan, Dr. M. İlker ACAR ve personeline ayrıca değerlendirmelerde ve grafiklerin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Orman Mühendisi M. Emin AKKAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZ

Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.) üzerinde yapılan doku kültürü çalışmalarında, sürgün ucu ve tomurcuklar explant olarak kullanılmıştır. Kallus ve sürgün elde edilmesinde Blaydes (1966)'ın 1 ppm BA ve 1 ppm Kinetin ilavesiyle elde edilen ortamında ve bu ortamın %10 seyreltilmiş konsantrasyonunda iyi sonuç alınmış, Kallus ve sürgünlerde 25. ve 30.günler arasında gelişmenin maksimum olduğu, alt-kültüre bu arada gidilmesinin uygun olacağı tespit edilmiştir. Kallus ve sürgün oluşumu %90'ın üzerinde sağlanan genç materyelde bütün olarak elde edilen bitkicik oranı %11 olmuştur. Köklenme, Blaydes ortamında elde edilen çoklu sürgünlerin, Blaydes'in hormonsuz ortamına 0,5 cm boyunda parçalar halinde aktarılmasıyla sağlanabilmiştir. Elde edilen bitkicikler seraya transferden sonra 1 ay yaşatılabilmektedir.

ABSTRACT

Shoot tips and buds have been utilized as explant for tissue culture research works with sweetgum (*Liquidambar orientalis* Mill.). Good results have been obtained in producing callus and shoot with modified Blaydes with 1 ppm BA+1 ppm Kinetin and also 10% diluated of this media. Since maximum callus and shoot devalopments have been observed on 25-30 th. days, it is concluded sub-culture operations should be started at this stage. Plantlets ratio was 11% with young material which over 90% callus and shoot devalopment can be obtained. Multiple shoots have been obtained in Blaydes media then transferred to Blaydes media without hormone as 0,5 cm segments of shoots, later on these plantlets have been transferred into the green house but they could survive around one mount.

1. GİRİŞ

Sığla, sigala veya günlük ağacı olarak adlandırdığımız *Liquidambar orientalis* Mill. ülkemizin relik-endemik en önemli türlerden birisidir. Avrupa'da ve Türkiye'de yapılan paleobotanik ve polinolojik çalışmalar sonucu eosene kadar uzanan bir geçmişe sahip olduğu, tersiyer sonrası buzullaşmalar sırasında daha güneye çekilerek, Anadolu'nun bazı korunaklı yerlerinde günümüze kadar gelebildiği ortaya konmuştur. (Acar ve ark.1993).

Sığla ağacı bu relik-endemik özelliğinin yanında yağındaki tarçın asidi, stacin, styrol, stresinol ve styrojanin gibi maddeleri ihtiva etmesiyle ilaç, parfümeri, sabun ve kimya endüstrisinde kullanım yeri bulmaktadır (İşçi, 1988). Özellikle parfüm formülüne kokulu karakteri ile iştirak etmesi ve çok etkili bir fiksator olması (İktüeren ve ark 1987,Acar 1989), bu alanda gerçek yerini bulmasına neden olmuştur.

Elimizdeki kayıtlar, 1947 yılında sığla orman alanlarının 7000 hektar ve sığla yağı üretiminin 200 ton olduğunu göstermektedir (Huş 1948,Topçuoğlu 1968). Bu konumuyla dünya sığla üretiminde tekel olan Türkiye'nin günümüzde, dünya sığla yağı piyasasında pazar payının yüzde kaç olduğunu tespit etmek mümkün olamamışsa da bizim ormanlarımızın geldiği noktayı vurgulaması açısından bazı rakamları sunmak yerinde olacaktır; 1949 yılında orman varlığı 6312 ha. , üretilen sığla yağı 180 ton, 1955 yılında 4316 ha. orman, 100 ton sığla yağı, 1980 yılında orman alanı 1337 ha.'a sığla yağı verimi 19.5 tona düşmüştür, 1988 yılı envanter çalışmalarında orman alanlarının 1215 ha. olduğu ve 1989 yılı yağ üretiminin 1.3 ton'a indiği tespit edilmiştir. Yağ üretimindeki hızlı düşüşe, alan kaybının yanında demode sığla yağı üretim tekniği ile yaralanan yağ verimi yüksek genotiplerin hastalanması ve popülasyondan ayrılarak yerini yağ vermeyen sağır bireylere bırakmasına da neden olmuştur (Resim 1-2).

İnsanlar tarafından uygulanan seleksiyon bir popülasyonun genetik yapılarını değiştiren en etkili yoldur (Yıldırım, 1981). Bu arada yaşama şansı azaltılarak, yağ verimi yüksek popülasyondan uzaklaştırılmış olabilir. Ortak gen havuzunu paylaşan bireylerden bazılarının popülasyondan uzaklaştırılmasıyla popülasyonun genetik dengesini kısa zamanda bozmak mümkünken, hayat devresini yüzlerce yılda tamamlayan orman ağaçlarında bu dengeyi yeniden sağlamak oldukça uzun bir zamanı gerektirmektedir. Sığla ormanlarımızın yaşama şansını azaltan diğer bir konu da, civar köylülerin drenajla taban suyu seviyesini düşürmeleri olmuştur. Biyolojisi gereği rutubetli topraklar üzerinde yaşamını sürdüren sığla ağaçları bozulan bu dengeye uyumda da zorlanmaktadırlar.

Bu kadar olumsuzlukların yanında sevindirici bazı yaklaşımlar da bulunmaktadır. Mevcut sığla ormanlarının sınırlarının belirlenmesi, bir bölümünün dikenli tel çit içerisine alınması, bazı alanların tabiat ormanı olarak düşünülmesi ki buralarda beyaz yağ veren günlük, sarı yağ veren günlük, yağ vermeyen sağır günlük olarak halk arasında adlandırılan bu genotipleri, uzun zaman sonrada olsa Hardy-Weinberg dengesi içinde popülasyonda görmemiz mümkün olabilecektir.

Bu çalışmaların yanı sıra Orman Bakanlığının, sığlanın yetişebileceği yerlerde sığla ağaçlandırmalarını başlatmış olması olumlu bir yaklaşımdır. 1960'lı yıllarda başlatılan bu çalışmalarda tohumdan elde edilen fidanlar kullanıldığından yağ verme aşamasına kadar, yaklaşık 30 yıl sonra, dikilen fidanların genotipleri hakkında bilgi sahibi olmak mümkün olabilmektedir (Resim 3).

Genotipleri morfolojik olarak ayırtetmek mümkün olamadığından fidanlık aşamasında da seleksiyona gitmek mümkün olamamaktadır. Burada uygulanacak tek yön-tem, ormanda yağ verimi yüksek bireyleri belirleyip bunlardan alınacak çeliklerin köklendirilmesiyle veya kalemlerin aşıda kullanılmasıyla vejetatif olarak üretilmesidir (Kaya 1988, Şimşek 1993). Yapılan aşı çalışmalarında %90'ın üzerinde başarı sağlanmıştır (Genç ve Ark. 1993). Aynı şekilde çeliklerin köklendirilmesi konusunda da çalışmalar sürdürülmektedir.

Sığla ağaçları çok amaçlı kullanım imkanı veren ağaçlar olduğundan (Auberlind 1984), vejetatif üretim için gerekçeler de farklı olmaktadır, örneğin park ve bahçelerde çok güzel görünüm veren, özellikle sonbaharda yaprakların aldığı rengi uzun süre seyredilebilir amacıyla yaprağını geç döken genotiplerin özelliklerini olduğu gibi taşımak veya yol kenarı ağaçlandırmalarında, kök yapısı kaldırım taşlarına zarar vermeyenlerden üretim yapmak için yapılan çalışmaların yanında (Sutter and Barker, 1984), sığla ağaçlarının hızlı sürgün verme yeteneğinden yararlanarak, baltalık işletmelerinde idare müddetini 5-7 yıla indirmek için de vejetatif üretim ve doku kültürü çalışmaları yapılmaktadır (Sommer, 1983).

Yukarıdaki gerekçelerin yanında, Anadolu sığla ağacının vejetatif üretim tekniğini belirlemek ve kitlesel üretimde kullanmak için çok önemli bir nedenimiz de yağ veriminin ağaçtan ağaca farklılık göstermesidir. Bu varyanstan yararlanıp en çok yağ veren bireylerden vejetatif üretimle plantasyonlara gitmek genetik kazancı önemli ölçüde artıracaktır.

Gerek ekonomik önemi, gerekse relikt-endemik bir türümüz olması nedeniyle, vejetatif üretimi önem kazanan Anadolu sığla ağacının, diğer sığlalarda olduğu gibi, klasik vejetatif yöntemlerle köklendirilmesi oldukça zordur. Sweetgum'in doku kültürü ile üretimi konusunda yoğun çalışmalar yapılmış ve belli bir mesafe kaydedilmiştir. Bununla beraber bulunan ortamlar ve yöntemler genotiplerden ve yükseltilerden etkilenecek farklı sonuçlar vermektedir. Sweetgum'da bulunan sonuçları Anadolu sığlası için uygulamaya koymak mümkün olmayabilir. Bu çalışmanın amacı anadolu sığlası için en uygun doku kültürü çoğaltım seçilmesidir.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

Ülkemizde orman ağaçlarının doku kültürüyle üretilmesi konusunda yapılmış çalışmalar yok denecek kadar azdır. Dış ülkelerde tarımsal alanda yapılan doku kültürü çalışmalarından çok daha sonra orman ağaçlarındaki çalışmalara başlanmıştır. Winton ve Huntinen (1976), 1966 yılından sonra bu alandaki çalışmaların arttığını ifade etmiştir. Aynı araştırmacılar kallus üretimi, hücre kültürleri ve protoplast izolasyonlarının ağaç ıslah programlarına katkıda bulunduğu için önemle üzerinde durulduğunu, köklenmesi ve aşılması zor orman ağaçlarının vejetatif üretiminde doku kültürünün, dikimde kullanılacak fidan stoklarının elde edilme zamanını %75 oranda azaltabileceğini belirtmişlerdir.

Bango (1988), vejetatif üretimin oldukça ekonomik ve karakterlerin daha iyi taşınmasını sağladığından genetatif üretime tercih edilmesi gerektiğini, özellikle köklendirmenin zor olduğu ağaçlarda doku kültürünün yardımcı bir teknik olarak çok daha fazla önem kazandığını bildirmiştir. Aynı araştırmacı doku kültüründe bitkinin elde edilebilmesi için öncelikle sürekli bir kültürün belirlenmesini, bitkicik oluşturacak şartların tanımlanmasını ve bitkicikğin aseptik kültürden toprağa transferinin yapılmasının gerektiğini kaydetmektedir.

Dodds and Roberts (1986), doku kültüründe ortamın bitkinin türüne, kültüre alınacak doku veya organa aynı zamanda denemenin amacına göre seçilmesi gerektiğini; Narayanaswamy (1988) rejenerasyon için her dokunun ihtiyaçlarının farklı olduğunu; Pierik (1987) kallus adventif köklerinin, adventif sürgünlerden daha çok rejenere olma yeteneğine sahip olduğunu bildirmiştir.

Sıgla konusunda yerli Literatürlerimizde Anadolu sıgla ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.)'in morfolojisi, yayılış yerleri, sitotaksonomisi ve anatomisi konusunda yayınlar mevcutken, doku kültürü konusunda herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Buna karşın Amerikan Sıgla'sı Sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.) ile ilgili çok sayıda yayın izlenmektedir (Bonga ve Durzan 1985).

Kesercioğlu (1973) *L. orientalis*'in kromozom sayısının $2n=30$ olduğunu gerek kromozom sayısı gerekse por tanelerinin şekli, büyüklüğü ve sayısının *L. styraciflua*'ya çok benzerlik gösterdiğini, morfolojisinde görülen bazı farklılıklarında ekolojik ortam farklılıklarından ortaya çıkabileceğini kaydetmektedir.

Peşmen (1972) *L. orientalis*'in 2 varyetesinin bulunduğunu bunlardan *L. orientalis* var. *integriloba*'nın yaprak yönünden *L. styraciflua*'ya benzediğini ve *L. orientalis* ile *L. styraciflua* arasında geçiş pozisyonunda bulunduğunu ifade etmektedir.

Gökmen (1973) *L. orientalis*'in, *L. orientalis* var. Suber olarak bir varyetesinin bulunduğunu genç sürgünlerdeki mantar kabarcıklarıyla ayırtıldığını kaydetmektedir.

Efe (1988) sığıla ağcının sığıla yağı veren tipi ile sığıla yağı vermeyen tipi arasında morfolojik yönden görülen bazı farklılıklara paralel olarak iç morfolojisinin batıdan doğuya ve kuraklığın arttığı oranda farklılıklar gösterdiğini, *L. orientalis*'i karakterize eden balsam kanallarının sadece gövdede değil ağacın birçok organında bulunduğunu, yaralanmaların dışında ağacın primer yapısını tamamlarken doğal olarak meydana geldiğini öne sürmektedir.

Acar (1988) Türkiye'de yapılan sığıla plantasyonlarında köklü çelik kullanımı ile sığıla ağacı için optimum bir ıslah programı hazırlanmasının önem ve gereğini vurgulamaktadır.

Ürgenç (1982), doku ve organ kültürü tekniği ile vejetatif üretmenin günümüzde geniş ölçüde odunsu bitkilere de uygulanmaya başladığını, bu alanda yapılan araştırma sonuçlarının ağaçların doku ve organ kültürüyle üretilmesiyle kalmayacağını aynı zamanda çeliklerin köklendirilmesinde geleneksel tekniğe de uygulanabileceğini bildirmektedir.

Angiospermlerde gövde ve kökten alınan kambiyum dokularının tomurcuk şeklinde farklılaşmasında kışın adeninin sınırlayıcı rol oynadığını, yazın da İnositol'un sınırlayıcı etmen olduğunu kaydetmektedir.

Sommer and Brown (1979), Amerikan sığılası ve Lale ağacı tomurcuklarını Şubat ortasında kış dormansisini tamamladıktan sonra explant olarak kullandıklarını, modifiye edilmiş Risser and White (RW) ile Murashige Skoog (MS) ortamlarında tomurcuğun gelişimini takiben IBA ile modifiye edilmiş Morel ortamına transfer ettiklerini, 2 hafta sonra da Risser ve White'ın oksinsiz ortamında bekl ettiklerini, çalışmanın sonunda Lale ağacı tomurcuklarında sürgün uzanması görülmesine rağmen sığılada başlatılamadığını bildirmiştir.

Sommer ve Brown (1980), Amerikan sığılası tohumlarını yüzeysel sterilizasyona tabi tutarak 1 ay bekl ettiklerini daha sonra 1 nolu ortam olarak adlandırılan katı ortama aktardıklarını, elde edilen hipokotilleri 3-5 mm. uzunluğunda bölümlere ayırarak 2 nolu ortam üzerinde kültüre aldıklarını ve burada 2 ay bekl etildiklerini, elde edilen kalluslar üzerinde kök ve sürgünlerin görüldüğünü, fakat her ikisinin aynı kallus üzerinde görülmediğini bildirmiştir. Yüksek stokin/auxin oranının tomurcuk oluşmasında, düşük stokin/auxin oranının kök oluşmasında etkili olduğunu ve skoog and Miller (1957)'in tütünde gözlemlediğine benzer sonuçlar elde edildiğini belirtmektedirler.

Sommer (1981) Amerikan sığılasını klonal çelikle çoğaltmanın zorluğundan dolayı, hipokotil bölümlerini explant olarak kullandığını belirterek denemede, Murashige and skoog (MS) (1962), Blaydes (BL) (Witham at al., 1971), ve modifiye edilmiş Risser and White (RW) (1964), ortamlarının kullanıldığını, BL ortamının diğerlerinden daha iyi sonuç verdiğini, taban araziden toplanan tohumlarda daha başarılı sonuç alınırken, aynı yükseltideki tohumların aynı ortam üzerinde farklılık gösterdiğini bildirmiştir..

Sutter and Barker (1984), 20-30 ve 2 yaşlı Amerikan sığıla ağacı tomurcukları ile yaptıkları çalışmada besin ortamı olarak Linsmaier, Skoog (LS) ve Woody Plant Medium (WPM)'i kullandıklarını, 25 °C sıcaklıkta 16 saat uzungün koşullarında, 60 Em⁻² sec⁻¹ ışıktaki tomurcukları inkübe ettiklerini, fidanlardan alınan tomurcukların 0,2 mg/l IBA ve 1,0 mg/l IBA ihtiva eden WPM ortamında 4-6 hafta sonra büyüme yaptığını, 1,0 mg/l IBA kallus geliştirdiğini, köklenme için 0,5 mg/l IBA'lı ortamın uygun olduğunu, bu yöntemin yaşlı ağaçlar için tavsiye edilebileceğini, fakat başarımın düşük olabileceğini ve genotipten genotipe fark yaratacağına dikkati çekmiştir.

Sommer ve ark. (1985) sığılanın üretiminde geleneksel doku kültürü yöntemlerinin yetersiz kaldığını ifade ederek alternatif yöntemlerin araştırıldığını, bu amaçla Risser and White'ın temel ortam üzerinde çimlendirilen tohumların Risser and White'ın 1,0 ppm IAA ve 5 ppm 2IP ile modifiye edilmiş ortamına hipokotil parçaları yerleştirilerek köklenmenin sağlandığını bildirmiştir. Sıvı kültür ortamında ise yine modifiye edilmiş RW ortamında çimlendirilen tohumların, modifiye edilmiş BL ortamında çoğaltıldığını ve RW 'ın temel ortamında köklendirildiğini belirterek, beyaz soğuk florasan lambalar altında 15 saatlik fotoperyotla 25±2 °C sıcaklıkta inkübe edildiğini ifade etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu araştırmada kullanılan tomurcuk ve sürgün ucu materyali sağlamak için sığlanın optimum yetişme yeri olan Muğla İli-Kızılyaka köyü yakınlarındaki Köybucağı Serisi sığla ormanlarında 3 genotip belirlenmiştir. Genotip seçiminde yağ verimi ve yağın rengi temel alınmıştır. Beyaz yağ veren 4 ağacın gövdesine (B), Sarı yağ veren 4 ağacın gövdesine (S), yağ vermeyen 4 ağacada (Y.V) rumuzları yağlı boya ile işaretlenmiş ve çevreleri yağlı boya ile halkalanarak uzaktan farkedilmeleri sağlanmıştır.

Ağaçlardan alınan sürgünler muhafazalı kutulara yerleştirilip etrafı ıslak yosun ve ıslak telisle sarılarak rutubet kaybı önlenmiş, İzmir Ormancılık Araştırma Müdürlüğü laboratuvarına taşınmıştır. Genç bitkilerden alınacak sürgün ucu ve tomurcuk için Muğla Orman Fidanlık Müdürlüğünün ürettiği 300 adet tüplü sığla fidanı Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğünün serasına getirilmiştir. İzmir Orman Bölge Müdürlüğü Kampüsü içerisinde mevcut 2 adet yaşlı sığla ağacından da materyal sağlanmıştır. 6 yağ grubundaki bitkilerden sağlanan tomurcuk ve sürgünler 1986 yılında Muğla-Köybucağı serisi içerisinde plante edilen fidanlardan getirilmiştir.

Bu araştırma 1989-1992 yılları arasında önce Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında, ve daha sonra Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Doku Kültürü Laboratuvarında yürütölmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Denemenin Düzenlenmesi

Sığlada kallus, sürgün ve kök elde etmek için sürgün ucu, Meristem ve tomurcuklar explant olarak kullanılarak Blaydes BL (1966), Murashige Skoog (MS) (1962) ve Nitsch (1951) temel ortamlarıyla, Blaydes ortamının modifikasyonlarında 1 ve 2 faktörlü denemeler düzenlenmiştir. Ortam farklılıkları olan denemelerde; birinci faktör ortamla ikinci faktör olarak da genotipler veya bitki yaşları alınmıştır. Tek ortam içerisinde bitki yaşlarının gösterdiği performans araştırılırken, bitki yaşları birinci faktör kallus ve sürgün oluşturma günleri ikinci faktör, mavsım etkileri araştırılırken; aylar faktör, bitki yaşları tekerrür olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 1 : Denemelerde kullanılan 3 temel ortama ait bileşikler (mg/l)

(Makro) Bileşikler	Nitsch (1951)	MS (1962)	Blaydes (1966)
Mg SO ₄ .7H ₂ O	250	370	72
K CL	1500	-	65
CaCl ₂ .2H ₂ O	25	440	-
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	500
KNO ₃	2000	1900	1000
NH ₄ NO ₃	-	1650	1000
NAH ₂ PO ₄ .H ₂ O	250	-	-
KH ₂ PO ₄	-	170	300
(Mikro) Bileşikler			
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	27,85	-
Na ₂ EDTA	-	37,25	-
MnSO ₄ .H ₂ O	3	22,3	6,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,5	8,6	2,7
CuSO ₄ .5H ₂ O	00,25	0,025	-
H ₂ SO ₄	0,5	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	2,5	-
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0,025	-
FeC ₆ O ₅ H ₇ .5H ₂ O	10	-	-
KI	0,5	0,83	0,8
H ₃ BO ₃	0,5	6,2	1,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025	0,25	-
NaFe EDTA	-	-	32
Organik Bileşikler			
Sakkaroz	50 g/l	30 gr/l	-
Myo-inositol	-	100	-
Nikotikasit	-	0,5	0,5
Piridoksin HCl	-	0,5	0,1
Thiamine HCl	-	0,1	0,1
Glisin	-	2,0	-
Sistenik HCl	10	-	-
Glycin	-	-	2,0

Denemelerde kullanılan ortamlar.

Blaydes (BL)

Nitsch

Murashige Skoog (MS)

Blaydes %10 seyreltik

BL+1 ppm IBA

BL+1 ppm IBA+1 ppm IAA

Sıvı BL ortamı

BL+IBA 2 mg/l+GA3 0,1 mg/l+inositol 100mg/l

%10 seyreltik BL+IBA 1 mg/l+GA3 0,1 mg/l

%10 seyreltik BL+IBA 1 mg/l

BL ortamı hormonsuz

BL+1 ppm BA

BL+1 ppm NAA+1 ppm BA

BL+1 ppm NAA

Alt parsel olarak kullanılan sığla genotipleri ve değişik yaş grupları;

Beyaz yağ veren sığla ağaçları

Sarı yağ veren sığla ağaçları

Yağ vermeyen sığla ağaçları

Karşıyaka (yaşlı) sığlaları

2 yaşlı sığla fidanı

3 yaşlı sığla fidanı

6 yaşlı sığla fidanından alınan explantlar kullanılmıştır. Alt kültürler Blaydes (BL) ortamı ile hormonsuz Blaydes (BL) ortamlarına yapılmıştır.

3.2.2. Kallus, sürgün ve köklerin elde edilmesi:

Kallus, sürgün ve kök elde etmek için vejetasyon mevsimi içerisinde sürgün uçları kullanılmış, sürgün ucu ve meristem kültürü yapılmıştır. Vejetasyon mevsimi dışında tomurcuklar, alt kültürlerde ise kallus, kalluslu sürgün ve sürgün parçaları explant olarak kullanılmıştır.

3.2.2.1. Kültür için Besin Ortamlarının Hazırlanması:

Blaydes (BL) (1966) ortamında makro inorganik bileşikler, mikro inorganik bileşikler ve vitaminler tüm çalışmalarda sabit tutulmuş, modifikasyonlar hormon, agar ve şeker dozlarındaki değişikliklerle yapılmıştır. Blaydes temel

ortamı denemelerde 1 ppm BA+1 ppm kinetin ilave edilerek kullanılmıştır (Sommer, 1980).Ortam pH'ları seyreltilmiş NAOH ve HCL yardımıyla Blaydes ve Murashige Skoog (MS) ortamlarında 5,7 ye Nitsch ortamında 5,5'a ayarlanmıştır. Ortamların sterilizasyonu otoklavda 1 atmosfer basınç altında 121°C de 1 litrelik ortamlarda 30 dakika, 2 litrelik ortamlarda da 40 dakika bekletilerek yapılmıştır (Watherell 1982).

3.2.2.2. Sürgün Ucu ve Tomurcukların Yüzeysel Sterilizasyonu ve Besin Ortamına Yerleştirilmesi:

Sürgün ucu ve tomurcuklar 3 cm. boyunda kesilerek %70 alkol içerisinde 30 saniye bekletilmiş, bol steril saf suda çalkalanmış bilahare %2,5 lık klorak içerisinde 30 saniye bekletilmiş ve tekrar saf steril su içerisinde 3 kez çalkalanmıştır.

Sürgün uçları ve tomurcuklar steril kabin içerisinde steril pensler yardımıyla yapraklardan arındırılmış olarak birkaç yaprak primordiyası ile birlikte alınarak 3-4 mm. boyunda kesilmiş ve tüplere yerleştirilmiştir. Tüp ağzları, yakılarak sterilizasyonu yenilenen pamuklarla kapatılmış ve aliminyum folyo sarılmıştır.

3.2.3. Kültür Koşulları:

3.2.3.1. Laboratuvarda:

Fotoperiyot: Çalışmaların yapıldığı inkübatörde uzun gün koşulları olarak 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyot uygulanmıştır.

Aydınlatma: Floresan lambalarıyla sağlanmış 2000 lux ışık sabit tutulmuştur. Yalnız bir denemede ortam seviyesinde tüpler kağıtla kapatılarak kök oluşturacak bölge karartılmaya çalışılmıştır.

Sıcaklık: Denemelerin tamamına yakın bir bölümü inkübatörde kurulduğundan sıcaklık çok hassas takip edilebilmiştir. 26 ± 1 derece sıcaklık denemelerin tamamında ortak kullanılmıştır.

3.2.3.2. Serada:

İnkübatörde elde edilen bitkiciklerin transfer edileceği, saksı toprağı

3.2.4. Kültürde İnceleme Yöntemleri:

Kallus oluşumu ve sürgünler 5 er gün arayla gözlenerek, kalluslar çapları, sürgünler boyları ölçülerek kaydedilmiştir. Enfeksiyonlu tüpler toplam kültür sayısından çıkarılarak kalan tüpler % olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4.1. Kültürlerdeki Kallusların İncelenmesi:

Sürgün uçlarının ve meristemin explant olarak kullanıldığı kültürlerde explant ortama temas ettiği yüzey küçük olduğundan, meydana gelen kallusta oval veya küremsi şekil almaktadır. Bunlarda çap ölçülmüştür. Çiçek tomurcuğu altında alınan diskelerde taban geniş olduğundan kallus başlangıçta tabaka şeklinde teşekkül etmektedir, bunlar oval şekil alınmaya kadar kalınlıkları ölçülmüştür.

Kalluslar büyüklüklerine göre dört grupta toplanmıştır. Çapı yada kalınlığı 0,5 cm. nin altında olanlar küçük , 0,5-1 cm. olanlar orta, 1,0-1,5 cm. olanlar büyük, çapı 1,5 cm. yi geçenler çok büyük olarak sınıflandırılmıştır. Tür içindeki kallusların ölçülmesi direkt temas sağlanamadığından tüp dışına cetvel tutularak 30-40 cm. uzaktan gözlem yapılmıştır.

3.2.4.2. Kültürlerdeki Sürgünlerin ve Kök Oluşumlarının İncelenmesi:

Sürgünlerde boy ölçümleri beş günlük aralarla yapıldığından, tüp dışına cetvel tutularak 30-40 cm. uzaktan gözlemlenerek ölçülmüştür. Başlangıçtaki sürgün ucu 3-4 mm. civarında olduğundan bunun üzerindeki bölüm ölçüye alınmıştır.

Sürgün boylarında da dört grup oluşturulmuştur. Sürgün boyu 0-0,5 cm. arasında olanlar küçük, 0,5-1,0 cm. orta, 1,0-1,5 cm. büyük , boyu 1,5 cm. yi geçenler çok büyük olarak sınıflandırılmıştır.

Sürgünler canlılıklarını sürdürdükleri sürece kültürde bekletilmiş kuruyanlar denemeden çıkarılarak kayıtlara işlenmiştir. Köklenmede kök oluşumunun başlangıcı ve kökün şekli ile boyu ölçülerek gözlemler yapılmıştır.

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi:

Kurulan tüm denemeler tesadüf blokları deneme desenine göre düzenlenmiştir. Yine tüm çalışmalarda 30 tüp sayısı sabit tutulmuştur. Değerlendirmeler 30 tüp veya enfekte kültürler çıktıktan sonra kalan tüp sayıları 100 kabul edilerek ele alınmıştır. 3 temel ortamda kurulan denemelerde ortamlar 1. faktör, genotipler 2. faktör olarak alınmıştır. Değerlendirmelerde ise genotipler tekerrür olarak kullanılmıştır. Blaydes ortam ve modifikasyonlarında; genç ve yaşlı materyalden kallus ve sürgün oluşturma yüzdeleri araştırılırken, bitki yaşları 1. faktör, günler 2. faktör olarak alınmıştır. Kallus ve sürgün oluşumunda mevsimin

etkileri araştırılırken aylar 1. faktör, materyal yaşı tekerrür olarak kullanılmıştır. Modifikasyonlarda ortamlar faktör, genotipler veya bitki yaşları, bir denemede de ginler tekerrür olarak alınmıştır.

Elde edilen veriler veryans analizine tabi tutulmuş alınan değerlerin F korumalı çoklu t testi ile veya Khi- kare testi ile farklılıkları yakalınmaya çalışılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Kallus, sürgün ve köklerin elde edilmesi

1991 ve 1992 yılları içerisinde Blaydes (1966) Nitsch (1951) ve Murashige Skoog (1962) temel ortamlarıyla Blaydes ortamının modifikasyonlarında denemeler kurulmuştur.

4.1.1. Temel ortamlarda:

3 temel ortamda yaşlı genotiplerden Sarı yağ veren, Beyaz yağ veren ve yağ vermeyen 3 genotiple, 3 yaşlı fidanların sürgün uçları explant olarak kullanılarak kurulan denemelerde elde edilen sürgünler Çizelge 1 de verilmiştir.

Gelişmenin maksimum noktasını oluşturan 25. günde 0.5 cm. yi geçen sürgün boyları, ortamlar itibariyle değerlendirmeye alınmıştır. Dördüncü sırada yer alan üç yaşlı sürgün uçları büyük yaş farkından dolayı bu değerlendirmede kullanılmamıştır.

Çizelge 2: Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	Serbes Derece.	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	Hesapl F	Tablo Degeri%5 %1
Tekerrür	2	158.000	79.000	0.395ns	6.940 18.000
Faktor-A	2	5484.667	2742.333	13.723*	6.940 18.000
HATA	4	799.333	199.833		
Genel	8	6442.000	805.250		

Ortamlar ve oluşturdukları sürgün yüzdeleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. ($p < 0.05$) . Yapılan F korumalı çoklu t testinde Blaydes ortamının üst sırada MS ortamının alt sırada yer aldığı, Nitsch ortamının ikisinin arasında geçiş bölgesi oluşturduğu görülmüştür. Elde edilen sürgün yüzdesinin 3 ayrı boy grubuna dağılımı yönünden, yine aynı sıralama içerisinde Blaydes'le Nitsch ortamları birbirine yakın değerler gösterirken MS ortamında sürgün yüzdesinin çok düşük olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

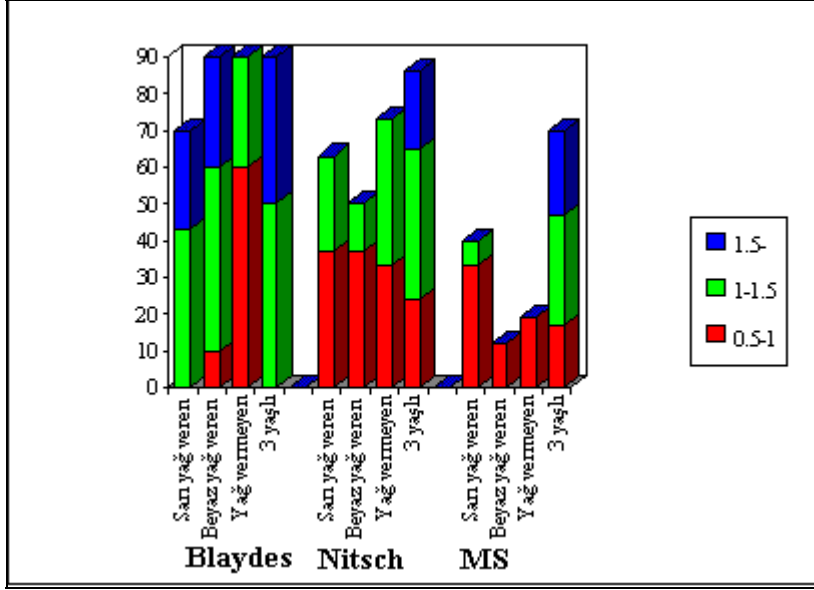
Nitsch ve MS ortamlarında kallus elde edilememiştir. Her iki ortamda bazı tüplerde 0,2-0,3 cm. çaplarında küçük kallus oluşumları gözlenmiştir. Blaydes ortamında sürgün gelişimine paralel olarak altta kalluslar gelişmiştir.

Sürgün uzunlukları yönünden MS ve Nitsch ortamlarında en fazla 2 cm. boy elde edilirken BL ortamında 3 cm. yi geçen sürgünler elde edilebilmiştir. Sürgünlerin kültürde canlılıklarını sürdürmeleri yönünden de Blaydes ve Nitsch

ortamları birbirine benzer sonuçlar vermiştir. Her iki ortamda hızlı kurumalar 60. günde başlarken MS ortamında 30. günde olmuştur.

Üç temel ortamda en iyi performansı 3 yaşlı fidanların sürgün uçlarından alınan explantların yaptığı gözlenmiştir.

Şekil 1: Üç temel ortamda 25. günde elde edilen sürgün uzunluğu yüzdesi.

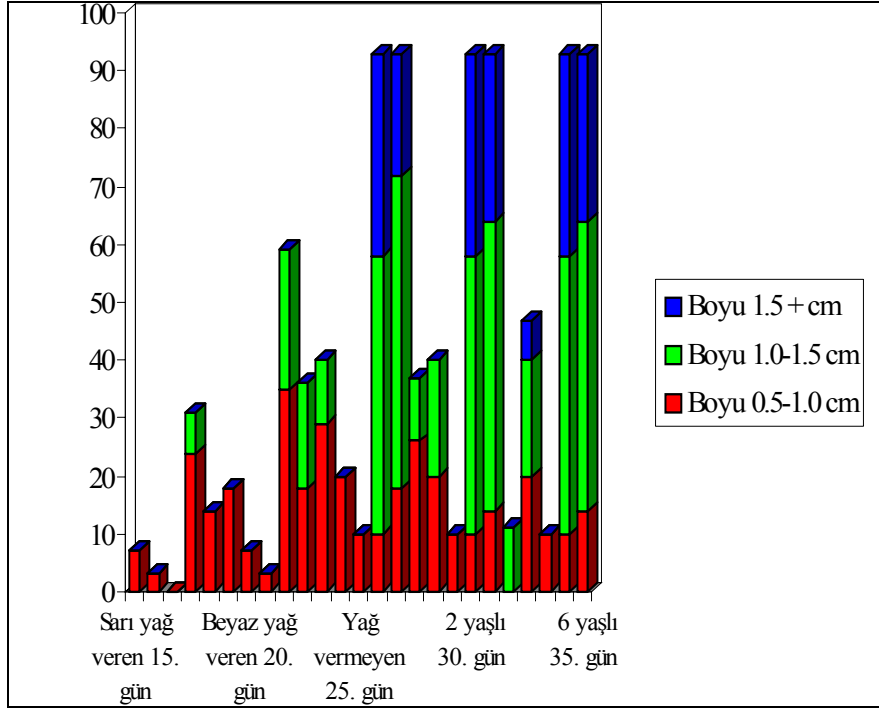


4.1.2. Blaydes ortamında ve modifikasyonlarında

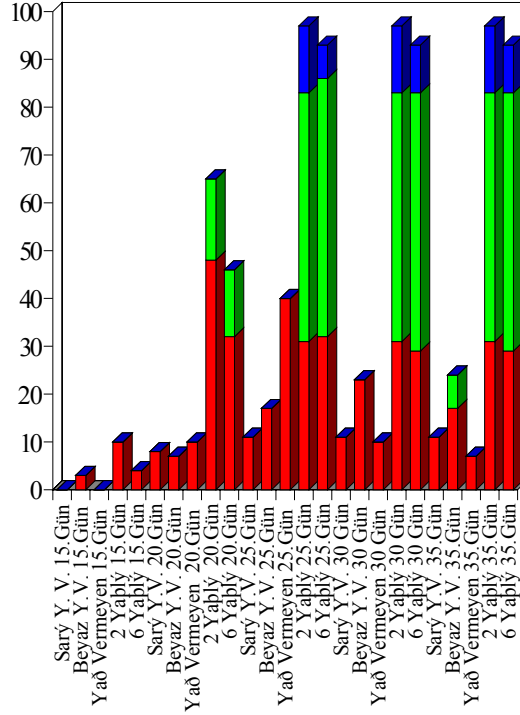
a- Blaydes ortamında

Blaydes ortamında Diğer iki ortamdan daha iyi sonuç alınması nedeniyle kök oluşumunu sağlamak için bu ortam üzerinde çalışılmış ve modifikasyonlara bu ortamda gidilmiştir. Blaydes ortamında beş gün arayla yapılan ölçümlerde elde edilen sürgün boy ve kallus çap grupları yüzdeleri şekil-2 ve şekil-3'de gösterilmiştir.

Şekil 2: Günler itibariyle Blaydes ortamında elde edilen sürgün yüzdeleri.



Şekil 3: Günler itibariyle Blaydes ortamında elde edilen kallus yüzdeleri



Gerek kallus oluşumunda ve gerekse sürgün oluşumunda gençlerin daha iyi performans göstermesi nedeniyle iki genç bitki ile (2-6 yaşlılar) iki yaşlı genotip gruplandırılarak değerlendirilmeye gidilmiştir. (çizelge 3-4-5-6)

Çizelge 3:Genç ve yaşlı fertlerden alınan explantlarla üretilen boyu 0,5 cm. nin üzerindeki Sürgün yüzdeleri.

Yaşlar	Bloklar	15.gün	20.gün	25.gün	30.gün	35.gün	40.gün
Yaşlı	I	7	18	40	37	11	11
Yaşlı	II	3	7	20	40	47	47
Genç	I	31	66	93	93	93	90
Genç	II	14	36	93	93	93	86

Çizelge 4: Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	Serbes. Derece	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	Hesapl. F	Tablo Değeri %5 - %10	
Tekerrür	1	5.042	5.042	0.026ns	4.84	9.65
Faktör – A	1	14652.042	14652.042	74.394**	4.84	9.65
Faktör – B	5	8842.708	1768.542	8.980**	3.2	5.32
A*B	5	1652.708	330.542	1.678ns	3.2	5.32
HATA	11	2166.458	196.951			

Genel	23	27318.958	1187.781			
-------	----	-----------	----------	--	--	--

Çizelge 5:Genç ve yaşlı fertlerden alınan explantlarla üretilen çapı 0,5 cm. yi geçen kallus yüzdeleri.

Yaşlar	Bloklar	15.gün	20.gün	25.gün	30.gün	35.gün	40.gün
Yaşlı	I	0	8	11	11	11	11
Yaşlı	II	3	7	17	23	23	23
Genç	I	10	65	97	97	97	90
Genç	II	4	46	93	93	93	86

Çizelge 6: Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	Serbes. Derece	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	Hesapl. F	Tablo Değeri %5 - %10
Tekerrü	1	0.375	0.375	0.009ns	4.840 9.650
Faktör-A	1	21780.375	21780.375	510.704*	4.840 9.650
Faktör-B	5	8770.208	1754.042	41.129**	3.200 5.320
A*B	5	4323.875	864.775	20.277**	3.200 5.320
Hata	11	469.125	42.648		
Genel	2	35343.958	1536.694		

□Sürgün ve kallus oluşumu yönünden çoklu t-Testi ile yapılan değerlendirmede yaşlı ve genç bitkiler arasında fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. ($p < 0,01$) genç bitkilerin gerek Kallus üretmede ve gerekse Sürgün vermede daha başarılı oldukları görülmüştür. Varyans analizinde materyal yaşı ile kallusun oluştuğu günler arasında interaksiyon önemli çıkmıştır. 15. gün itibariyle daha başlangıç safhasında olduğu için iki grup arasında istatistiki olarak fark görülmezken 20. günden itibaren iki grup arasında fark başlamıştır.

Sürgün ve kallus oluşumu yönünden çoklu t-Testi ile yapılan değerlendirmede yaşlı ve genç bitkiler arasında fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. ($p < 0,01$) genç bitkilerin gerek Kallus üretmede ve gerekse Sürgün vermede daha başarılı oldukları görülmüştür. Varyans analizinde materyal yaşı ile kallusun oluştuğu günler arasında interaksiyon önemli çıkmıştır. 15. gün itibariyle daha başlangıç safhasında olduğu için iki grup arasında istatistiki olarak fark görülmezken 20. günden itibaren iki grup arasında fark başlamıştır.

Dört ay aralarla Blaydes ortamında kurulan denemelerde kallus ve sürgün oluşturma yönünden fark olup olmadığı araştırılmış elde edilen değerler çizelge 7 de verilmiştir.

Çizelge 7 Üç değişik dönemde Blaydes ortamında elde edilen kallus ve sürgün elde etme yüzdeleri

Deneme Tarihi	Materyal Yaşı	Kültür Sayısı	Enf. Kült. Sayısı	Boyu 0.5 cm'yi geçen sürgün %	Çapı 0.5 cm'yi geçen kallus %
27.3.92	Çok Yaşlı	30	-	40	11
	Genç	30	1	97	97
21.8.92	Çok Yaşlı	30	2	54	14
	Genç	30	-	67	33
20.11.9	Çok Yaşlı	30	-	70	10
	Genç	30	-	90	90
Yapılan X ² testinde önemlilik değerleri aşağıda verilmiştir. Yaşlı Fertlerin Sürgün Yüzdesi				18.185**	
Yaşlı Fertlerin Kallus Yüzdesi				0.841ns	
Genç Fertlerin Sürgün Yüzdesi				37.949**	
Genç Fertlerin Kallus Yüzdesi				126.034**	

Yaşlı ve genç materyalle üretilen kallus ve sürgün yüzdeleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde yaşlı materyalle kallus üretiminde ayların arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamışsada genç sığlaların sürgün ucundan üretilen kallus ve sürgün yüzdeleri ile yaşlı ağaçların sürgün uçlarının explant olarak kullanılmasıyla üretilen sürgün yüzdeleri arasında istatistiki olarak farklılıklar önemli bulunmuştur ($p < 0,01$). Gençlerde 3. ve 11. aylar birbirine yakın değerler gösterirken 8. ayda hem kallus hem de sürgün üretimi daha düşük düzeyde kalmıştır. Yaşlı fertlerde en iyi sürgün 11. ayda elde edilebilmiştir.

b. Modifikasyonlarda:

Temel ortamlarda yapılan ön çalışmalarda temel ortamların yanında değişik dozlarda seyreltilmiş modifikasyonlarda denenmiştir. Blaydes ortamının % 10 seyreltilmiş modifikasyonunda iyi sonuç alındığı görülmüştür. Bu nedenle modifikasyonlarda mukayese imkanı vermesi düşüncesiyle bu ortam bir çok denemede kullanılmıştır.

4.11.1991 tarihinde Blaydes ortamı ve %10 seyreltilmiş Blaydes ortamı ile agarsız sıvı Blaydes ortamı üzerine kağıt köprü kurularak ve tomurcuklar explant olarak kullanılarak bir deneme kurulmuştur. Denemede üç genotipe ilave olarak Karşiyaka'daki sığla ağaçlarının tomurcuk altından alınan diskler de explant olarak kullanılmıştır. (Resim. 4, 5, 6 , 7)

Çizelge 8:3 Blaydes ortamında 30. günde elde edilen sürgün ve kallus yüzdeleri.

ORTAMLAR	GENOTİPLER	KÜLTÜR ADEDİ	ENF. KÜL. ADE Dİ	30.gün Sürgün Boy (cm)				30.gün Kallus Çap (cm)			
				-0.5	0.5- 1	1-1.5	1.5+	-0.5	0.5- 1	1- 1.5	1.5 +
AGARSIZ BL SIVI ORTAM (KÖPRÜDE)	Sarı Yağ Veren	30	-	60	40			73	27		
	Beyaz Yağ Veren	30	3	59	41			89	11		
	Yağ Vermeyen	30	-	50	43	7		53	33	7	
	Karşiyaka(Disk)	30	-	63	37			67	33		
% 10 SEYREL- TİK BL ORTAM	Sarı Yağ Veren	30	2	64	29	7		36	61	3	
	Beyaz Yağ Veren	30	3	70	30			70	30		
	Yağ Vermeyen	30	2	25	39	32	4	36	36	25	3
	Karşiyaka(Disk)	30	1	24	28	34	14	24	28	34	14
NORMAL BL	Sarı Yağ Veren	30	2	50	36	14		68	32		
	Beyaz Yağ Veren	30	3	56	37	7		70	30		
	Yağ Vermeyen	30	1	62	34	4		69	31		
	Karşiyaka(Disk)	30	1	59	31	10		55	34	11	

Çizelge 9 VARYANS ANALİZ TABLOSU(Sürgün Üretimi)

Varyasyon □	Serbes. □	Kareler □	Kareler □	Hesapl. □	Tablo Degeri □	
Kaynağı □	Derece. □	Toplamı □	Ortalaması □	F □	%5 □	%1 □
Tekerrür □	3 □	515 □	171.667 □	0.695ns □	4.76 □	9.78 □
Faktor-A □	2 □	363.5 □	181.75 □	0.736ns	5.14	10.92
HATA □	6 □	1482.5 □	247.083 □	□	□	□
Genel □	11 □	2361 □	214.636 □	□	□	□

Çizelge 10 VARYANS ANALİZ TABLOSU(Kallus Üretimi)

Varyasyon Kaynağı	Serbes. Derece.	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	Hesapl. F	Tablo Degeri	
					%5	%1
Tekerrür	3	1262.917	420.972	4.822*	4.76	9.78
Faktor-A	2	2089.5	1044.75	11.967**	5.14	10.92
HATA	6	523.833	87.306			
Genel	11	3876.25	352.386			

Varyans analiz tablosuna göre yapılan t-Testi sonucu aşağıda gösterilmiştir.

Ori.Sıra	Sıralanmış Sıra
1 27.750	2 58.500 A
2 58.500	3 34.500 B
3 34.500	1 27.750 B

Varyans analiz tablosunda sürgün oluşumu yönünden istatistiksel bir fark görülmemiştir. değerlendirmede 0.5 cm boyu geçen sürgünler ele alındığından 0.6 cm boyundaki sürgünle 2.5 cm boyundaki sürgün aynı kategoride yer almıştır. Gerçekte %10 seyreltik Blaydes ortamında en fazla sürgün boyu elde edilmiş bunu temel Blaydes ortamı izlemiştir. Kağıt köprüler kurularak sıvı Blaydes ortamına yerleştirilen explantlarda bir santim boyu geçen sürgün sayısı çok az olmuştur. Kalluslar ile ilgili yapılan varyans analizinde üç ortamın kallus oluşturması yönünden aralarındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). İki nolu ortam yani %10 seyreltik Blaydes ortamı en üst sırada yer alarak en iyi performansı yapmış, Blaydes'in agarlı ortamı ile sıvı ortamı ikinci grubu oluşturmuştur.

21.8.1992 günü modifiye edilmiş 4 Blaydes ortamı üzerinde kurulan denemede, yinelemenin biri yaşlı bireylerden alınan explantlarla, diğeri genç explantlarla tesis edilmiştir. Denemede Blaydes ortamının dışındakilerle kallus çok küçük olduğundan değerlenmeye alınmamış yalnız 0.5 cm. yi geçen sürgünler çizelgede gösterilmiştir (30. günde).

Çizelge 11: Modifiye edilmiş 4 Blaydes ortamında elde edilen sürgün yüzdeleri (0,5 cm. boyu geçenler).

Ortamlar	Sürgün Ucu Alınan Materyal	0.5 'cmyi Geçen sürgün % si
1. Hormonsuz Blaydes □ □	Yaşlı □	20 □
	Genç □	42 □
2. Blaydes ortamı+1 ppm BA □ □	Yaşlı □	54 □
	Genç □	67 □
3. Blaydes ortamı+1 ppm NAA □ □	yaşlı □	33 □
	Genç □	44 □
4. Blaydes +1 ppm NAA □ □	Yaşlı	27
	Genç □	30 □

Sükroz 30 gr/l, Agar 7 gr/l, (2 nolu ortamda 6 gr/l) fotoperiyot 16 saat/gün

Çizelge 12 Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon □ Kaynağı □	Serbes. □	Kareler □	Kareler □	Hesapl. □	Tablo Degeri □	
	Derece. □	Toplami □	Ortalamasi □	F □	%5 □	%1
Tekerrur □	1 □	300.125 □	300.125 □	9.854ns □	10.13 □	34.12 □
Faktor-A □	3 □	1270.38 □	423.458 □	13.903* □	9.28 □	29.46 □

HATA	3	91.375	30.458			
Genel	7	1661.88	237.411			

Çizelge 11 deki veriler iki şekilde değerlendirmeye alınmıştır. Tesadüf bloklarına göre oluşturulan varyans analiz tablosunda faktör olarak ortamlar alınmış materyal yaşı tekerrür olarak değerlendirilmiştir. F testinde ortamlar arasında 0,95 olasılık düzeyinde fark meydana gelmiştir. Çoklu T-testi uygulandığında bu farkın iki nolu ortam lehine olduğu ve bunu 3,1 ve 4 nolu ortamların izlediği görülmüştür. İkinci değerlendirmede genç fertlerden alınan explantla üretilen sürgünler kendi aralarında, yaşlılardan üretilen sürgünler de kendi aralarında X^2 testinde değerlendirilmiştir. Her iki yaş grubunda ortamların sürgün üreme yüzdeleri arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,01$).

Genç ve yaşlı fertlerin X^2 test değerleri aşağıdadır.

Genç fertler	28.879**
Yaşlı fertler	29.953**

12.9.1991 ve 9.1.1992 tarihlerinde Karşıyaka Orman Fidanlığı içerisinde bulunan yaşlı sığla ağaçlarının yan dallarından alınan tomurcuklar modifiye edilmiş altı Blaydes ortamında kültüre alınmıştır (çizelge 13).

1 nolu ortam: BL+2 mg/l IBA+0,1 mg/l GA3+100 mg/l Inositol+20 gr/l Sükroz+8 gr/l Agar

2 nolu ortam: %10 seyreltik BL+1 mg/l IBA+0,1 mg/l GA3+30 gr/l Şeker+6 gr/l Agar

3 nolu ortam: %10 seyreltik BL+1mg/l IBA+ 30 gr/l Şeker+6 gr/l Agar

4 nolu ortam: %10 seyreltik BL (kök bölgesi kağıtla kapatılmıştır.)

5 nolu ortam: BL+1 ppm IBA+şeker 40 gr/l Agar 8 gr/l

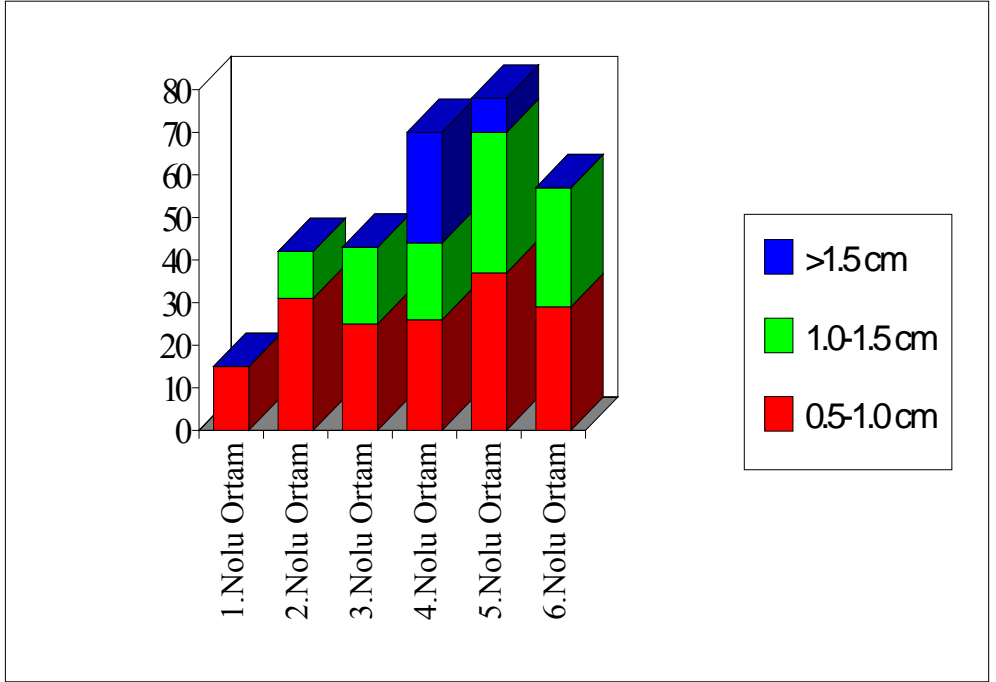
6 nolu ortam: BL+1ppm IBA+1 ppm IAA+Şeker 40 gr/l+Agar 8 gr/l

Çizelge 13. Modifiye edilmiş 6 Blaydes ortamında 30. günde elde edilen kallus ve sürgün yüzdeleri.

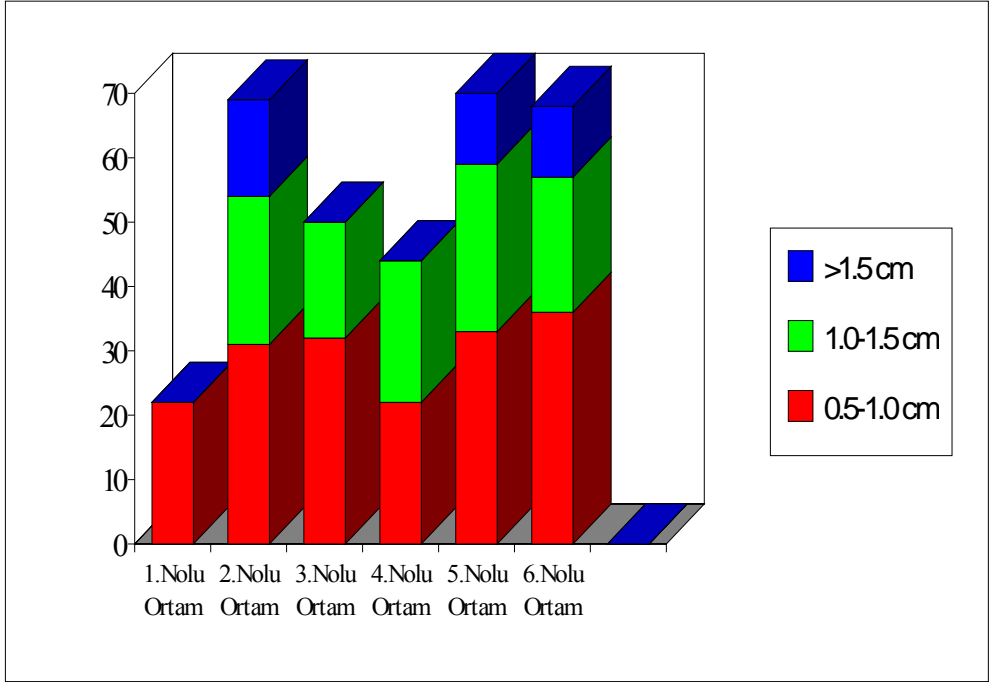
Ortamlar	Kül. Say.	Enf. Kül.Say.	Sürgün Yüzdeleri				Kallus Yüzdeleri			
			0.0-0.5 cm	0.5-1.0 cm	1.0-1.5 cm	>1.5 cm	0.0-0.5 cm	0.5-1.0 cm	1.0-1.5 cm	>1.5 cm
1.Nolu Ortam	30	3	85	15	-	-	28	22	-	-
2.Nolu Ortam	30	4	58	31	11	-	31	31	23	1
3.Nolu Ortam	30	2	57	25	18	-	50	32	18	-
4.Nolu Ortam	30	3	30	26	18	26	56	22	22	-
5.Nolu Ortam	30	3	22	37	33	8	30	33	26	1
6.Nolu Ortam	30	2	43	29	28	-	32	36	21	1

Sürgün boyu 0,5 cm.'yi ve kallus çapı 0,5 cm. yi geçen kültürler grafik halinde şekil 4 ve 5 'de verilmiştir.

Şekil 4: Modifiye edilmiş altı Blaydes ortamında elde edilen sürgün boyuna göre sürgün elde edilme yüzdeleri



Şekil 5: Modifiye edilmiş altı Blaydes ortamında elde edilen kallus çaplarına göre elde edilme yüzdeleri



Altı ortamda elde edilen kalluslardan çapı 0,5 cm. yi geçenlerle sürgün boyu 0,5 cm. yi geçenler değerlendirildiğinde her ikisinde de ortamlar arasında istatistiki olarak fark olduğu görülmüştür ($p < 0,01$).

X² Test değerleri aşağıda verilmiştir.

Kallus %si itibari ile	73.103**
Sürgün %si itibari ile	102.702** □
□	

c Alt-Kültürlerde:

2.8.1991 günü yaşlı sığla ağaçlarından alınan sürgün uçları Blaydes ortamına yerleştirildi. Burada elde edilen kallus ve sürgünlerin 25-30. gün arasında maksimum gelişmeyi gösterdikleri görölmüştür. 30. günde steril koşullarda tüplerden alınan kallus ve sürgünler 5 mm. büyüklüğünde parçalara ayrılarak Blaydes ortamına yerleştirilmiştir. Denemede iki tip materyal kullanılmıştır. birinci tip yalnız kallus parçalarının alt kültürü, ikinci altta kallus üstte sürgün ihtiva eden explantlarla alt-kültürdür. Alt kültürün kuruluşundan 30 gün sonra yapılan ölçüm ve gözlemlerde yalnız kallusun alt-kültüründe kallus elde edildiği 2. materyalle kurulan denemede ise explanta paralel olarak altta hızlı kallus oluşumu sürerken üstte aynı oranda sürgün gelişimi olduğu görölmüştür (izelge-14).

Çizelge 14: Kallus ve kalluslu sürgün parçalarıyla yapılan alt-kültürde 30. gün sonunda elde edilen kallus ve sürgün yüzdeleri.

Explant □	Kült. Say. □	Enf. Kült. Say. □	Sürgün Boyu %si				Kallus apı %si			
			0.0- 0.5 cm □	0.5- 1.0 cm	1.0- 1.5 cm	>1.5 cm	0.0- 0.5 cm	0.5- 1.0 cm	1.0- 1.5 cm	>1.5 cm
Kallus Aktarma □	30 □	- □	- □	- □	- □	- □	15 □	20 □	45 □	20 □

Kalluslu Sürgün Aktarma	30	-	-	20	50	30	10	15	40	35
-------------------------------	----	---	---	----	----	----	----	----	----	----

25.5.1992 tarihinde kurulan bir denemede Blaydes ortamında elde edilen 2-6 ve çok yaşlı ağaçların sürgünleri explant olarak kullanılmıştır. Üç değişik yaşlı materyalin sürgün uçlarından üretilen çoklu sürgünler 0.5 cm. boyunda steril ortamda kesilerek Miller (1961 a) Makro elementler, Miller (1961 a) Mikro elementler ve Bonner (1940) vitaminlerinden oluşan Blaydes'in hormonsuz ortamına yerleştirilmiştir (ph 5,7 Agar 8 gr/l Şeker 30 gr/l). İlk 30 gün sonunda explantlarda herhangi bir değişikliğin meydana gelmediği görülmüştür. İlk kurumlar yaşlı fertlerden üretilen sürgünlerde görülmüş bunu altı yaşlı fidanların sürgünleri takip etmiştir. Hormonsuz Blaydes ortamında alt-kültüre alınan sürgün uçlarından hiç birinde kallus oluşmamıştır. 70. günde yaşlı ağaçlardan üretilen ve 6 yaşlı fidanlardan üretilen sürgün uçları tamamen kurumasına karşılık 2 yaşlı fidanlardan üretilen sürgün uçlarında ilk kök oluşmaları görülmüştür. 94. günde köklerde saçak oluşumu ile birlikte yapraklarında gelişimini tamamladığı tespit edilmiştir (çizelge 15, resim-9).

Çizelge 15: Değişik yaşlı fertlerden alınan sürgün uçlarının Blaydes ortamında üretilmesiyle elde edilen sürgünlerin alt kültürdeki sürgün yüzdesi.

Explant □	Kült. Say. □	Enf. Kült. Say. □	30 .gün Sürgün Boyu %si				60. gün Sürgün Boyu %si			
			0.0- 0.5 cm	0.5- 1.0 cm	1.0- 1.5 cm	>1.5 cm	0.0- 0.5 cm	0.5- 1.0 cm	1.0- 1.5 cm	>1.5 cm
2 yaşlının sürgünleri □	30 □	2 □	100 □	- □	- □	- □	50 □	36 □	- □	- □
6 yaşlının sürgünleri □	30 □	1 □	100 □	- □	- □	- □	41 □	28 □	- □	- □
Çok yaşlının sürgünleri □	30 □	2 □	- □	- □	- □	- □	- □	-	-	-

70 .gün Sürgün Boyu %si □				85 .gün Sürgün Boyu %si □				94 .gün Sürgün Boyu %si □			
0.0-0.5 cm □	0.5- 1.0 cm □	1.0- 1.5 cm □	>1.5 cm □	0.0- 0.5 cm □	0.5- 1.0 cm □	1.0- 1.5 cm □	>1.5 cm □	0.0- 0.5 cm □	0.5- 1.0 cm □	1.0- 1.5 cm □	>1.5 cm □
- □	22 □	7* □	-	-	18	4*	7*	-	-	-	11*
- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □
- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □	- □

** -Kök elde edilenler.

Resim 9. tam olarak elde edilen bitkiciklerden biri.

4.2. Bitkilerin toprağa transferi:

İnkübatörde elde edilen bitkiciklerin transfer edileceği saksı toprağı 1/6 Humus+1/6 Toprak+ 1/6 Gübre+1/3 Torf olmak üzere hazırlanan ve pH 6.66 olan karışım 1 atmosferlik basınç altında 121 C de otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Saksı ve tabanına serilen çakılların da yüzeysel sterilizasyonundan sonra hazırlanan saksılara steril kabin içinde pensle çıkarılan bitkicikler 29.9.1992 günü yerleştirilmiştir. İlk sulama 1 lt saf su içine %20 (N) azot, %20 (P) fosfor, %20 (K) potasyum ile iz elementleri içeren hazır bitki besleyicilerden 1 çay kaşığı karıştırılarak hazırlanan su ile yapılmıştır. Hava sirkülasyonunun menfi etkisini önlemek için saksılar üzerine içinde yeterli hava kalacak şekilde polietilen torbalar geçirilmiştir. Hava sıcaklığı 30-37 C arasında değişen seranın üstüne gölgeleme yapılarak direk güneş ışığının bitkiciklere gelmesi önlenmiştir. Transferin 2. günü 10 dakika polietilen torbalar çıkarılarak bitkiciğin doğrudan hava ile teması sağlanmıştır. Devamındaki her gün 10 ar dakikalık artırımlarla bu işleme devam edilmişse, 1 aylık dönem sonunda bitkiciklerde kurumaların başladığı görülmüştür.

5- TARTIŞMA

Türkiye'nin endemik türlerinden biri olan **Anadolu Sığla Ağacı** (*Liquidambar Orientalis* Mill.)' nın doku kültürü tekniğiyle üretilmesi konusunda yurdumuzda ve diğer ülkelerde yayınlanmış herhangi bir literatüre raslanmamıştır. Amerikan Sığla Ağacı Sweetgum (*L. styraciflua* L.) ile benzerliğinden dolayı (Kesercioğlu 1973, peşmen 1972) bu ağaç üzerinde yapılan çalışmalardan yararlanılmıştır.

Blaydes (BL), Nitsch ve Murashige skoog (MS) temel ortamları üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen sürgün yüzdesi ve sürgün boyu açısından Blaydes ortamında daha iyi sonuç alınmıştır. Amerikan Sığla Ağacının hypkotil bölümleri üzerinde Sommer (1981)'in yaptığı çalışmada da Blaydes ortamından Risser and White (1964) ve Murashige Skoog (1962) ortamlarından daha iyi sonuç alındığını kaydetmektedir. Sommer (1983) Amerikan Sığlasının kallus, hypkotil ve sürgün ucundan organogenesis gösterdiğini, kallustan nadiren embriogenesis meydana geldiğini, ortam olarak Blaydes'i ve yüksek azotlu Risser and White ortamının başarılı olduğunu MS ortamının tatmin edici olmadığını diğer bir çalışmada kaydetmektedir. Çalışmamızda MS ve Nitsch ortamlarında çapı 0,5 cm. yi geçen kallus elde edilememiş, Blaydes ortamında ise sürgün gelişimine paralel kallus elde edilmiştir. Sommer (1981)'in Amerikan Sığla ağacında yaptığı araştırma bizim Anadolu Sığla Ağacında yaptığımız çalışmada kullandığımız ortak iki ortam birbirine yakın sonuçlar vermiştir.

Blaydes ortamı üzerinde kurulan denemelerde kallus ve sürgün oluşumunu günler itibariyle gösterdiği performans incelendiğinde (Şekil-2,3) ilk 25 gün içinde hızlı bir gelişim görülmüştür. Bazı çalışmalarımızda 30. güne kadar bu gelişmenin olduğu tespit edilmiştir. Kallus ve sürgündeki gelişme bu dönemden sonra da devam etmekte fakat büyüme daha yavaş seyretmektedir. Thomas and Davey (1975) kallusun büyüme periyodunu 2 hafta ile 3 ay arasında olabileceğini, Dodds ve Roberts (1986) kallusların alt-kültürü için 28. gün sonunda erişilen büyüklüğün yeterli olacağını Street (1969)'e atfen bildirmektedir. Bizim çalışmamızda Street (1969)'in bulgularına çok yakın değerler elde edilmiştir.

İki ve beş yaşlı genç fidanlarla (.....) yaşlı fertlerden alınan explantların Blaydes ortamında kültüre alınmasıyla elde edilen kallus ve sürgün yüzdeleri yönünden genç bitkilerin daha performans gösterdikleri tespit edilmiştir. Aynı ortam üzerinde Sommer and Wetzstein (1989)'in yaptığı çalışmada 1-3 aylık fidanların sürgün uçlarında %70-80 çoklu sürgün elde edilirken, 5-30 yaş arasındaki Amerikan Sığılası ile yapılan sürgün uçlarından bazılarında çoklu sürgün elde edilebildiği kaydedilmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada 2 ve 5 yaşlarda ortalama %99 oranında, yaşlı fertlerin sürgün ucu kültürlerinden %38 oranında çoklu sürgün elde edilmiştir. Kallusun elde edilmesinde de genç fertlerden alınan explantlarla benzer sonuçlar %95 elde edilmiş, fakat yaşlı fertlerin sürgün ucundan kallus üretimi ortalaması (çapı 0,5 cm. yi geçenler) %17 civarında kalmıştır.

Blaydes ortamı üzerinde farklı aralıklarla kurulan denemelerde sürgün ve kallus üretimine mevsimlerin etkileri araştırılmıştır. Banga (1988), Sussex and Clutter'a (1959), atfen kallusların oluşumunun mevsimlerden etkilendiğini, birçok gymnosperm ve angiosperm ağaçları üzerinde yapılan araştırmalarda en çok çoğalmanın ilkbaharda elde edilen explantlarda olduğunu vurulamaktadır. Bizim çalışmamızda da genç bitkilerden alınan explantlarda kallus ve sürgün üretimi yönünden en iyi sonuç ilkbaharda (mart ayı) elde edilmiş, bunu sonbaharda alınan explantlar izlemiştir. En az kallus ve sürgün veriminin ise Ağustos ayı ortalarında alınan explantlarda olduğu görülmüştür. Gönülşen (1987), meristemin izole edileceği dönemin çok önemli olduğunu, Stone (1963)'e atfen ilkbahar ve erken sonbaharda izole edilen karanfil meristemlerinin kış ve yazı nazaran daha iyi geliştiklerini belirtmiştir. Yaşlı fertlerden alınan explantlarda kallus ve sürgün üretimi yönünden mevsim etkilerinin azaldığı görülmüşse de, aynı dönemlerde yapılan farklı çalışmalarda elde edilen sürgün ve kallus yüzdelерinin değışikliğini explant alınan ağaçların yaşlarının farklılığına bağlamak mümkündür. Yaşlı ağaçların çoğunun içlerinin çürük ve kovuk olması yaş tespitine imkan vermediğinden bu konuda netlik sağlanamamıştır.

Sommer, Wetzstein, Tee (1985), ortamlarındaki agarın su stresine yol açabileceğini kaydetmektedir. 4.12.1991 tarihinde kurduğumuz denememizde Blaydes ortamı sıvı olarak alınmış, içerisine filtre kağıdı ile köprüler kurulmuş ve explantlar bunun üzerine yerleştirilmiştir. Kök elde

edilememesine agarın neden olup olmadığını anlamak için kurulan bu denemede, ayrıca kallus ve sürgün elde etmede başarılı Blaydes ortamı ile onun %10 seyreltilmiş konsantrasyonundaki ortamda kullanılmıştır. Üç ortamda elde edilen çapı 0,5 cm. yi geçen kallus ve boyu 0,5 cm. yi geçen sürgün yüzdeleri yönünden önemli fark çıkmamasına rağmen agarsız Blaydes ortamında sürgünlerin boy büyümesi ve kallusların çap gelişimi daha sınırlı olmuştur. Ayrıca bu denemede kullanılan çiçek tomurcuğunun erkek çiçeklerin altından kesilen 2-3 mm. kalınlığındaki dişi çiçek saplarını ve kaidesini içeren disklerden oldukça iyi sonuç alınmıştır (çizelge 8).

Modifiye edilmiş dört Blaydes ortamı ile kurulan denemede (çizelge 9) ilk ortama hiç hormon konmamıştır. İkinci. ortam Blaydesin 1 ppm BA ve 1 ppm kinetin ilavesiyle ortam, üçüncü ortam iki nolu ortamdaki kinetinin yerine 1 ppm NAA konularak elde edilen ortam, dört nolu ortamda ise hormon olarak yalnız 1 ppm NAA konulmuştur.

Bouharmont, Dabin (hocadan alınacak)'in küpe çiçeğini hormonsuz katı ortamda köklendiğini kaydetmekte, Sommer, Wetzstein and Lee (1985) Amerikan sığılasının hypkotal bölümlerini Risser and White'in hormonsuz ortamında köklendirdiklerini, ve Blaydes'in NAA ile BA'lı ortamlarında çoğaldıklarını kaydetmektedir. Diğer bir çalışmada da Sommer (1981) Blaydes ortamındaki yüksek NAA/BA oranının kök gelişimini artırdığını düşük NAA/BA ortamın tomurcuk gelişimi sağladığını ifade etmektedir. dört ortamdan en iyi sürgün ve kallus oluşumu diğer çalışmalarımızda

kullandığımız 1 ppm BA ve 1 ppm kinetin içeren Blaydes ortamında elde edilmiştir. Hiçbir ortamda köklenme belirtileri görülmemiştir.

Keza çizelge 10'da verilen ve Blaydes ortamının 1 ppm IBA, 1 ppm IAA, 0,1 mg/l GA3 ile modifiye edilmesiyle sağlanan 6 değişik ortamda da köklenme sağlanamamıştır.

İlk alt-kültür çalışmamızda yaşlı ağaçların sürgün ucundan üretilen kallus ve sürgünler kullanılmıştır. Kalluslar 4-6 mm. çapında parçalara ayrılarak yeni hazırlanan Blaydes ortamına aktarılmıştır, Dodds and Roberts (1986), Street (1969)'a atfen 5-10 mm. çapa ulaşan kalluslar için alt kültür önermekte, Emiroğlu (1989) 10-100 mg. ağırlığındaki kallus kütlelerini alt-kültür için yeterli büyüklük olarak tanımlamakta, hücre bölünmesi ve bitki rejenerasyonu için daha büyük potansiyele sahip genç dokuların kullanılmasını önermektedir. Bizim yaptığımız çalışmada da sürgün ucundaki genç dokular kültüre alındığında 4. hafta sonunda 1.5 cm. çapında kallus kütlesi elde edilebilmiş ve alt-kültürde bu kalluslar kullanılmıştır. Blaydes ortamına yapılan aktarmalarda yalnız kallus aktarılanlarda kallusların geliştiği, kallusla üzerinde geliştirdiği sürgün parçasının aktarılmasıyla yapılan alt kültürlerde ise altta kallus gelişimi ile birlikte üstte çoklu sürgünler elde edilmiştir.

Hormonsuz ortamların dışında tüm çalışmalarımızda kallus oluşması, kallusun olmadığı bir ortamda kök elde edebileceğimizi düşündürdü, bu konuda Gönülşen (1987), hücre bölünmesi ve kallus

oluşumunun uyarılmasında, endogen ve eksogen büyüme maddelerinin kompleks interaksiyonunun rol oynadığını ve kallus kültüründe hormon kullanılmasının zorunluluğunu belirtmesi, Bonga (1988) bazı ağaç türlerinin kambial explantları Auxin'sizde ve hatta vitaminsiz ve amino asitsiz kültür ortamında kallus başlatabilir fakat stokininsiz başlatamaz vurgulamasıyla, alt-kültürümüzde üç değişik yaş grubundan Blaydes ortamında üretilen sürgünler 0.5 cm. boyunda parçalara bölünerek hormonsuz Blaydes ortamına aktarılmıştır. Ortamda önce çok yaşlı fertlerden üretilen ve alt-kültüre alınan sürgünlerde kurumaların olduğu, devamın da altı yaşlılarda kurumaların başladığı görülmüştür. İki yaşlıların sürgün parçalarında ise 70. günde köklenme başlamıştır.

İlk kök oluşumundan sonra 24 gün aynı ortam içinde bekletilen bitkilerde kök saçakları gelişmeye başlamıştır. Kökler saçak gelişimini tamamlamasına rağmen çok zayıf oldukları ve toprağa transfer sırasında agarlı ortamdaki çıkarılırken bazılarının kırıldığı görülmüştür. Bonga (1988) besin ortamı içine işleyen köklerin çoğunlukla kılcal köklerden yoksun kaldığını ve bu nedenle toprağa transferin zor bir işlem olduğunu, Murashige (1974), toprak koşullarına derece derece adaptasyonun arzu edildiğini, ışık entansitesinin artırılması ve besin ortamının derece derece basitleştirilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Bizim çalışmamızda da steril hale getirilmiş torf ağırlıklı karışım saksılara konmuş üzeri direkt hava ile teması kesmek için polietilen torbalarla kapatılmıştır. Hergün tetdrici olarak

arttırılan aralarla havalandırılmıştır. Sera içerisinde bu koşullar altında bitkiler bir ay yaşatılabilmektedir.

2 LİTERATÜR ÖZETLERİ

Ülkemizde orman ağaçlarının doku kültürüyle üretilmesi konusunda yapılmış çalışmalar yok denecek kadar azdır. Dış ülkelerde tarımsal alanda yapılan doku kültürü çalışmalarından çok sonra orman ağaçlarına başlanmıştır. Winton and Huntinen (1976), 1966 yılından sonra bu alandaki çalışmaların arttığını ifade etmişlerdir. Aynı araştırmacılar kallus üretimi, hücre kültürleri ve protoplast izolasyonlarının ağaç ıslah programlarında katkıda bulunduğu için önemle üzerinde durulduğunu, köklenmesi ve aşılması zor orman ağaçlarının vejetatif üretiminde doku kültürünün, dikimde kullanılacak fidan stoklarını elde edilme zamanını %75 oranda azaltabileceğini belirtmişlerdir.

Bango (1988), Thulin and Faulds, (1968) ve Murashige (1974)'e atfen vejetatif üretimin oldukça ekonomik ve karakterlerin daha iyi taşınmasını sağladığından generatif üretime tercih edilmesi gerektiğini, Muarshige (1974)'e atfan kaydetmektedir.

Dodds and Roberts (1986), doku kültüründe ortamın bitkinin türüne, kültüre alınacak doku veya organa, aynı zamanda denemenin amacına göre seçilmesi gerektiğini, Narayanswamy (1988) regenerasyon için her dokunun ihtiyaçlarının farklı olduğunu, Pierik (1987) kallusun adventif kökleri, adventif sürgünlerden daha çok rejenere etme yeteneğine sahip olduğunu ifade etmektedir.

Sığıla konusunda yerli Literatürlerimizde Anadolu sığıla ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill.)'in morfolojisi, yayılış yerleri, sitotaksonomisi

ve anatomisi konusunda yayınlar görmek mümkünken, doku kültürü konusunda herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Bunun yanında Amerikan Sığıla'sı Sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.) ile ilgili her alanda literatür bulmak mümkün olabilmektedir.

Kesercioğlu (1973) *L. orientalis*'in kromozom sayısının $2n=30$ olduğunu gerek kromozom sayısı gerekse portanilerinin şekli, büyüklüğü ve sayısının *L. styraciflua*'ya çok benzerlik gösterdiğini, morfolojisinde görülen bazı farklılıklarında ekolojik ortam farklılıklarından ortaya çıkabileceğini kaydetmektedir.

Peşmen (1972) *L. orientalis*'in iki varyetesinin bulunduğunu bunlardan *L. orientalis* var. *integriloba*'nın yaprak yönünden *L. styraciflua*'ya benzediğini ve *L. orientalis* ile *L. styraciflua* arasında geçiş pozisyonunda bulunduğunu ifade etmektedir.

Gökmen (1973) *L. orientalis*'in, *L. orientalis* var. *Suber* olarak bir varyetesinin bulunduğunu genç sürgünlerdeki mantar kabarcıklarıyla ayırd edildiğini kaydetmektedir.

Efe (1988) sığıla ağcının sığıla yağı veren tipi ile sığıla yağı vermeyen tipi arasında morfolojik yönden görülen bazı farklılıklara paralel olarak iç morfolojisinin batıdan doğuya ve kuraklığın arttığı oranda farklılıklar gösterdiğini, *L. orientalis*'i karakterize eden balsam kanallarının sadece gövdede değil ağacın birçok organında bulunduğunu, yaralanmaların

dışında ağacın primer yapısını tamamlarken doğal olarak da meydana geldiğini öne sürmektedir.

Acar (1988) Türkiye'de yapılan sığla plantasyonlarında köklü çelik kullanımı ile sığla ağacı için optimum bir ıslah programı hazırlanmasının önem ve gereğini vurgulamaktadır.

Ürgenç (1982), doku ve organ kültürü tekniği ile vejetatif üretmenin günümüzde geniş ölçüde odunsu bitkilerde uygulanmaya başladığını, bu alanda yapılan araştırma sonuçlarının ağaçların doku ve organ kültürüyle üretilmesiyle kalmayacağını aynı zamanda çeliklerin köklendirilmesinde geleneksel tekniğe de uygulanabileceğini Eriksson (1977)'a atfen bildirmektedir.

Sommer (1983), Jacquot (1949,1951,1951 a,b)'e atfen angiospermlerde gövde ve kökten alınana kambiyum dokularının tomurcuk şeklinde farklılaşması için kurduğu denemede kışın adeninin sınırlayıcı rol oynadığını, yazın da İuositor'un tomurcuk oluşumunda sınırlayıcı etmen olduğunu kaydetmektedir.

Sommer and Brown (1979), Amerikan sığlası ve Lale ağacı tomurcuklarını Şubat ortasında kış dormansisini tamamladıktan sonra explant olarak kullandıkların, modifiye edilmiş RW ile MS ortamlarında tomurcuğun gelişimini takiben IBA ile modifiye edilmiş Morel ortamına transfer ettiklerini, iki hafta sonra da Risser ve White'ın Oskinsis ortamında

beklettiklerini, çalışmanın sonunda Lale ağacı tomurcuklarında sürgün uzaması görülmesine rağmen sığlada başlatılamadığını kaydetmektedirler.

Sommer and Brwon (1980), Amerikan sığlası tohumlarının yüzeysel sterilizasyona tabi tutarak bir ay beklettiklerini daha sonra bir nolu ortam olarak adlandırılan katı ortama aktardıklarını, elde edilen hypkotilleri 3-5 mm. uzunluğunda bölümlere ayırarak iki nolu ortamları üzerinde kültüre aldıklarını ve burada iki ay bekletildiklerini, elde edilen kalluslar üzerinde kök ve sürgünlerin görüldüğünü, fakat her ikisinin aynı kallus üzerinde görülmediğini kaydetmektedirler. Yüksek stokin/auxin oranının tomurcuk oluşmasında, düşük stokin/auxin oranının kök oluşmasında etkili olduğunu ve Skoog and Miller (1957)'in tütünde gzlemlediğine benzer sonuçlar elde edildiğini belirtmektedirler.

Sommer (1981) Amerikan sığlasını klonal şekille elde etmenin zor olmasından, hypkotal bölümlerini explant olarak kullandığını belirterek denemede, Murashige and Skoog (MS) (1962), Blaydes (BL) (Witham at al., 1971), ve modifiye edilmiş Risser and White (RW) (1964), ortamlarının kullandığını, BL ortamının diğerlerinden daha iyi sonuç verdiğini, taban araziden toplanan tohumlarda daha başarılı sonuç alınırken, aynı yükseltideki tohumların aynı ortam üzerinde farklılık gösterdiğini kaydetmektedir.

Sutter and Barker (1984), 20-30 ve iki yaşlı Amerikan sığla ağacı tomurcukları ile yaptıkları çalışmada besin ortam olarak Linsmaier. Skoog

(LS) ve Woody Plant Medium (WPM)'li kullandıklarını, 25 °C sıcaklıkta 16 saat uzun gün koşullarında, 60 Mem⁻² sec⁻¹ ışıkta tomurcukları inkübe ettiklerini, fidanlardan alınan tomurcukların 0,2 mg/l IBA ve 1,0 mg/l IBA ihtiva eden WPM ortamında 4-6 hafta sonra büyüme yaptığını, 1,0 mg/l IBA kallus geliştirdiğini, köklenme için 0,5 mg/l IBA'lı ortamın uygun olduğunu bunun yaşlılarada tavsiye edilebileceğini, fakat başarının düşük olabileceğini ve genotipten genotipe fark yaratacağını kaydetmişlerdir.

Sommer, Wetzstein and Lee (1985) sığlanın üretiminde geleneksel doku kültür yöntemlerinin yetersiz kaldığını ifade ederek alternatif yöntemlerin araştırıldığını, bu amaçla Risser and White'ın temel ortam üzerinde çimlendirilen tohumların Risser and White'ın 1,0 ppm IAA ve 5 ppm 2İP ile modifiye edilmiş ortamına hypkotil parçaları yerleştirilerek köklenmenin sağlandığını kaydetmiştir. Sıvı kültür ortamında ise yine modifiye edilmiş RW ortamında çimlendirilen tohumların, modifiye edilmiş BL ortamında çoğaltıldığını ve RW'in temel ortamda köklendirildiğini belirterek, beyaz soğuk florasan lambalar altında 15 saatlik fotoperyotla 25±2 °C sıcaklıkta inkübe edildiğini ifade etmişlerdir.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Sığla ağacının doku kültürü tekniğiyle üretilmesini amaçlayan bu çalışmalarda elde edilen sonuçları aşağıdaki şekilde sunmak mümkündür.

Temel ortamlardan Blaydes kallus ve sürgün elde edilmesinde MS ve Nitsch ortamlarından daha iyi sonuç vermiştir.

İlkbahar ve sonbaharın explant alımı için daha uygun olduğu genç bitkilerden kallus ve sürgün üretimi yaşlı bitkilere oranla daha başarılı görülmüştür.

Blaydes'in 1 ppm kinetin ve 1 ppm BA ile modifikasyonunda keza kallus ve sürgün oluşturmada iyi sonuç verdiğiinden sığlanın kallus kültürü için önerilebilir.

Köklenme alt-kültürde hormonların ortamdan kaldırılmasıyla 70. günde elde edilebilmiştir. Bu sürenin kaldırılması ortama konacak fakat kallus oluşumuna neden olmayacak çok küçük dozlardaki auxin grubu regülatörlerle mümkün olabileceği kanaatine varılmıştır. Gerek kök oluşumunun hızlandırılması gerekse materyal alınacak bitki yaşının yükseltilmesi amacıyla yapılacak çalışmalarda alt kültüre aktarılacak sürgün parçaları, ortam tazelenerek alt kültürünün sürdürülmesi durumunda daha olumlu sonuç verebilecektir.

Agar ortamı içerisinde zayıf kökler elde edilebilmiştir. Bu köklerle toprağa transferin son derece zor olacağı düşünülmüş toprağa transferden

nce bitkicik köklerini geliştirecek tekniklerin araştırılması faydalı olacaktır.

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Sığla ağacının doku kültürü tekniğiyle üretilmesini amaçlayan bu çalışmalarda elde edilen sonuçları aşağıdaki şekilde sunmak mümkündür.

Temel ortamlardan Blaydes kallus ve sürgün elde edilmesinde MS ve Nitsch ortamlarından daha iyi sonuç vermiştir.

İlkbahar ve sonbaharın explant alımı için daha uygun olduğu genç bitkilerden kallus ve sürgün üretimi yaşlı bitkilere oranla daha başarılı görülmüştür.

Blaydes'in 1 ppm kinetin ve 1 ppm BA ile modifikasyonunda keza kallus ve sürgün oluşturmada iyi sonuç verdiğiinden sığlanın kallus kültürü için önerilebilir.

Köklenme alt kültürde hormonların ortamdan kaldırılmasıyla 70. günde elde edilebilmiştir. Bu sürenin kaldırılması ortama konacak fakat kallus oluşumuna neden olmayacak çok küçük dozlardaki auxin grubu regülatörlerle mümkün olabileceği kanaatine varılmıştır. Gerek kök oluşumunun hızlandırılması gerekse materyal alınacak bitki yaşının yükseltilmesi amacıyla yapılacak çalışmalarda alt kültüre aktarılabilecek sürgün parçaları, ortam tazelenerek alt kültürünün sürdürülmesi durumunda daha olumlu sonuç verebilecektir.

Agar ortamı içerisinde zayıf kökler elde edilebilmiştir. Bu köklerle toprağa transferin son derece zor olacağı düşünülmüş toprağa transferden

önce bitkicik köklerini geliştirecek tekniklerin araştırılması faydalı olacaktır.

LİTERATÜR

Acar, M.İ., 1988: Sığla (*Liquidambar orientalis* Mill.) ağaçlamalarında köklü çelik kullanımının gerek ve önemi. Ormançılık Araştırma Enstitüsü Yayınları Dergisi No: 68.

Acar, M.İ., 1989: *L. orientalis* Mill. Balzamu Eterik Yağının GC-MS-DS Sistemi ile Analiz Edilerek Birleşiminin Belirlenmesi. Ormançılık Araştırma Enstitüsü Yayınları Ankara.

Acar, M.İ., Gemici, Y., Genç, A., Özel, N., 1993: Anadolu Sığla (*Liquidambar orientalis* Mill.) Ormanlarının ve Günümüzdeki Durumu. 2. Uluslararası Ekoloji ve Çevre Sorunları Sempozyumu. Türk-Alman Kültür İşleri Kurulu Yayın Dizisi No: 3 Ankara.

Auberlind, V., 1984: *Le Liquidambar Afocel-Armef Informations*, Foret 1984: No: 3 Fascicule 252.

Bonga, J.M., Durzan, D.J., 1985: *Tissue Culture in Forestry-* Dordrecht/Boston/Lancaster.

Bonga 1988: *Applications of Tissue Culture in Forestry (in Plant Cell Organ and Tissue Cultures)* sec: 5 pp: 93-108.

Bouharmont, J., Dabin, P., *Somaclonal Variation in Some Cultivars of Fuchsia.*

- Dodds, J. H. and Roberts, L.W., 1986: Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press.
- Efe, A., 1988: *Liquidambar orientalis* Mill. (Sığla Ağacı)' in Morfolojik ve Palinolojik Özellikleri Üzerine Araştırmalar. İ.Ü. Orman Fakülesi Doktora Tezi.
- Emiroğlu, Ü., 1989: Doku Kültürü Tarla Bitkileri Bölümü Yüksek Lisans ve Doktora Ders Notları.
- Genç, A., Akgül, E., Özel, N., Umut, B., 1993: Sığla (*Liquidambar orientalis* Mill.) Ormanlarının Yetişme Ortamı Özellikleri ile Gençleştirilmesi Üzerine Araştırmalar. Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Teknik Bülten Serisi (Yayında).
- Gökmen, H., 1973: Kapalıtohumlular (Angiospermae) 1. Cilt S: 266-272 Orman Genel Müdürlüğü Yayın No: 564 Ankara.
- Gönülşen, N., 1987: Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Md. Yayın No: 87 Menemen-İzmir.
- Gürel, A., 1989: Kallus Kültürü ile Tütün ve Datura Dihaploidlerinin Elde Edilmesinde Bitki Büyüme Madellerinin Etkisi Doktora Tezi.
- Huş, S., 1949: Sığla Ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill.) Ormancılık Bakımından Önemi ve Sığla Yağının Kimyasal Araştırılması Orman Genel Müdürlüğü Yayın No: 83 Sayfa: 7-27.

- İktüeren, Ş., Acar, M.İ., 1987: Sığla Ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill.) Doğal Yayılışı, Sığla Yağı Üretimi ve Pazarlaması. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları Dergi No: 66.
- İşçi, M., 1988: Sığla (Günlük) Ormanlarının Amenajman Esasları. Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi Yüksek Lisans Tezi Trabzon.
- Kaya, Z., 1988: Doku Kültürünün Orman Ağaçları Islah Çalışmalarındaki Yeri. Orman Mühendisliği Dergisi yıl: 25 Sayı: 5 Ankara
- Kesercioğlu, T., 1973: Türkiye Bitkileri Üzerine Sitotaksonomik, Anotomik ve Morfolojik Araştırmalar *L. orientalis* Mill. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi İlmî Raporlar Serisi No: 173
- Narayanaswamy, S., 1988: Regeneration of Plant From Tissue Cultures in Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture Ed.By. J. Reinert and Y.P.S. Bajai. Narosa Publishing. House. New Delhi pp. 179-202.
- Peşmen, H., 1972: The Genus *Liquidambar* L., İu Davis Flora of Turkey and East Aegean Islands, Vol: 4, P: 264-265.
- Pierik, R. L. M. 1987: In Vitro Culture of Higker Plants. Martinus Nijhoff Publishers.
- Sommer, H. E., Brown, C. L., 1979: Application of Tissue Culture To Forest Tree Improvement. In WR Sharp et al., eds, Plant Cell and

- Tissue Culture Principles and Applications. Ohio State Univ. Press, Columbus Ohio, pp: 461-491.
- Sommer, H. E., C. L., 1980: Embryogenesis in Tissue Cultures of Sweetgum for. Sci. 26
- Sommer, H. E., 1981: Propagation of Sweetgum By Tissue Culture. In Proc 18th South For Tree Improvement Conf. pp: 184-188.
- Sommer, H. E., 1983: Organogenesis In Woody Angiosperms. Application To Vegetative Propagation. Bull. Soc. Bot. Fr., Actual. Bot., 130 (2) 79-85.
- Sommer, H. E., Wetzstein, H. Y., Lee, N., 1985: Tissue Culture of Sweetgum (Liquidambar Styraciflua L.) Proc. 18th South For. Tree Improv. Conf. pp: 42-50.
- Sommer, H. E. and Wetzstein, 1987: Tissue Culture of Liquidambar Cell and Tissue Culture In Forestry Volume 3 Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht/Boston/Lancaster.
- Sutter, E., Barker, P., 1984: Tissue Culture Propagation Of Selected Mature Clones Of Liquidambar Styraciflua Intern Plant Propagators Soc. Comb. Proc. Vol 33 pp: 113-117.
- Şimşek, Y., 1993: Orman Ağaçları Islahına Giriş. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Muhtelif Yayınlar Serisi No: 65 Ankara.

- Thomas, E., Davey, M. R., 1975: From Single Cells To Plants. Wykeham Publ. Ltd. London.
- Topçuoğlu, A., 1968: Sığla Ormanlarının Islahı, Bakımı, Sığla Yağı İstihali ve Kıymetlendirilmesi. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Teknik Haber Bülteni Yıl 7 Sayı 28 Ankara
- Ürgeç, S., 1982: Orman Ağaçları Islahı. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayın No: 293 İstanbul.
- Wetherel, D. F., 1982: Introduction To In Vitro Propagation Aveyrs Plant Tissue Culture Series, Universty Of Connecticut.
- Winton, L., Huntinen, O., 1976: Tissue Culture Of Trees. Modern Methods In Forest Genetics 1976 Berlin Chapter: 2 pp: 243-262.
- Yıldırım, M. B., 1981: Populasyon Genetiği 1. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 400 Bornova/İzmir.