

## **FAGACEAE FAMILİYASINDA *IN VITRO* TEKNİKLERİN KULLANIMI VE SON GELİŞMELER**

Mehmet SEZGİN<sup>1\*</sup>

Hatice DUMANOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ÇKÜ Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü 18200, ÇANKIRI

<sup>2</sup> AÜ Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 06110, ANKARA

\*sezginmehmet@hotmail.com

### **ÖZET**

Bu makalede, çoğaltım ve ıslah amacıyla ormancılıkta halen kullanılmakta olan klasik yöntemlerin etkinliğini arttırmak ve bu yöntemler ile üstesinden gelinmesi güç ya da olanaksız olan sorunların çözümüne karşı, Dünya ormancılığında üzerinde önemle durulan *in vitro* tekniklerin, *Fagaceae* familyasına ait cins ve türlerde kullanımı konusunda yapılmış olan araştırmalar derlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Fagaceae*, *in vitro* teknikler, biyoteknoloji

### **USAGE OF *IN VITRO* TECHNIQUES IN *FAGACEAE* FAMILY AND RECENT DEVELOPMENT**

#### **ABSTRACT**

In this study, the researches on the use of *in vitro* techniques which have been given great importance in the world forestry, increase the efficiency of classical methods which have still been used in forestry with the aims of breeding and rehabilitation and are used to solve current problems that can hardly or not be solved by using classical methods, in species and genera of *Fagaceae* were compiled.

**Keywords:** *Fagaceae*, *in vitro* techniques, biotechnology

## 1. GİRİŞ

Biyoteknoloji kavramı içerisinde ele alınan *in vitro* teknikler, bitkilerde çoğaltım ve ıslah başta olmak üzere birçok konuda klasik yöntemlerle çözümü güç ya da olanaksız olan sorunlara karşı bazen tek başına ve bazen de klasik yöntemler ile birlikte kullanılan tekniklerdir. Bu teknikler ile bitki genotipleri kontrollü koşullarda yoğun ve çok hızlı bir şekilde klonal olarak çoğaltılabilmekte, virüslerden arındırılabilen, gen kaynakları dar alanlarda uzun süreli muhafaza edilebilmekte, somatik embriyolar, homozigot hatlar, taksonomik sınırlama olmaksızın farklı genetik kombinasyonlar elde edilebilmekte, yaşama şansı düşük olan ya da bulunmayan zigotik embriyoların gelişimi ve çimlenmesi sağlanabilmekte, sekonder metabolitler üretilebilmekte, somaklonal varyasyonlar ve mutasyonlar ile genetik varyasyonlar yaratılabilmekte, stres koşullarına karşı genotiplerin dirençleri test edilebilmekte, temel fizyolojik ve biyolojik olayların seyri kontrollü olarak izlenebilmektedir.

Türkiye’de genel olarak ormancılık alanında oldukça yeni sayılan biyoteknolojinin, ormancılıkta klasik yöntemlerin yanında ülke ekonomisine büyük katkı sağlayacağı çok açıktır. Ayrıca, orman kaynaklarının korunması ve geliştirilmesi konusunu ele alan gerek bölgesel gerekse uluslararası süreçler biyoteknoloji uygulamalarını gündeme getirmişlerdir. Türkiye’nin de 1990 yılından bu yana alınan kararların tarafı olduğu, Avrupa Birliği kapsamında yürütülen, Avrupa Ormanları Korunması Bakanlar Konferansı süreci de “Eurosilva” şebekesinin kurulması kapsamında biyoteknoloji araştırmalarının desteklenmesini karara bağlamıştır (Dölerslan, 2005).

Türkiye ve Avrupa’da ormancılık açısından en önemli yapraklı ağaç türlerinin yer aldığı *Fagaceae* familyası, her iki yarı kürede yayılmış 600’den fazla taksonu bulunan altı cinsi (*Castanea* sp., *Fagus* sp., *Quercus* sp., *Nothofagus* sp., *Castanopsis* sp. ve *Lithocarpus* sp.) kapsamaktadır. Türkiye’de 21.2 milyon ha toplam orman alanının % 39.25’ini *Fagaceae* familyasına dahil ağaç türleri kaplamaktadır (Anonim, 2006). Özellikle ülkemiz yapraklı ormanlarının büyük çoğunluğunu meşe (*Quercus* sp.) (6.5 milyon ha) ve kayın (*Fagus* sp.) (1.75 milyon ha) meşcereleri oluşturmaktadır (Anonim, 2006) ve söz konusu iki cins park ve peyzaj açısından da özel bir değer taşımaktadır. Meşe, kayın ve kestanelerin (*Castanea* sp.) Türkiye’de doğal örnekleri bulunmaktadır.

Ayrıca *Fagaceae* familyasına ait meşe, kayın ve kestane cinsleri, meyve ve odun üretiminde ekonomik değere sahip olan ağaç türleridir (Manzanera ve Pardos, 1990; Carraway ve Merkle, 1997; Puigderrajols vd. 2001; Naujoks, 2003; Anonim, 2006). Bu türlerin üretiminde kaliteli bireylerin elde edilerek, yoğun olarak üretime alınması gereklidir (Kermode ve Bewley, 1985; Kim vd. 1997; Hernandez vd. 2003; Preece, 2008). Bu kapsamda, klasik çoğaltım yöntemlerinden farklı olarak, günümüzde uygulanan yoğun çoğaltım tekniklerinden biri olan *in vitro* teknikler ile büyük oranda başarılı sonuçlar alındığını belirtmek gerekir (Schenk ve Hildebrandt, 1972; Teasdale, 1992; Özcan vd. 2002; Preece, 2008). Her ne kadar ilk yatırım maliyeti açısından daha pahalı olarak gözükse de, söz konusu uygulamalar kapsamında ekolojik koşullara daha uygun ve mevcut hastalıklara

dayanıklı bireylerin, kısa zaman içerisinde, yoğun ve klonal çoğaltımı düşük maliyetle yapılabilmektedir (Teasdale, 1992; Özcan vd. 2002; George ve Debergh, 2008).

Tüm bunlar kapsamında bu derlemede, *Fagaceae* familyasında bugüne kadar *in vitro* teknikler konusunda yapılmış çalışmaların amaçları, uygulama yöntemleri ve bulguları ile ilgili bilgiler sunulmuştur.

## 2. FAGACEAE FAMILİYASINDA *IN VITRO* TEKNİKLERİN KULLANIMI

### 2.1. Somatik embriyogenesis

Bitkilerde embriyo gelişimi sadece döllenmiş yumurta hücresi (zigot) ile sınırlı değildir ve somatik dokulardan da embriyo elde edilebilmektedir. Bu dokulardan *in vitro* koşullarda embriyo elde edilmesi tekniği somatik embriyogenesis olarak adlandırılmaktadır. Bu teknik ile somatik embriyolar dokular üzerinde doğrudan (direkt) ya da kallus aşamasından sonra indirekt olarak meydana gelebilmektedir. Klonal çoğaltım, sentetik tohum üretimi, genetik materyalin muhafazası, gen aktarımı, *in vitro* testler ve temel çalışmalar için önemli bir potansiyel sunan bu tekniğin başarısı üzerine genotip, eksplant kaynağı, büyümeyi düzenleyici maddeler, azot kaynağı ve inkübasyon koşulları etkili olmaktadır (Özcan vd., 2002).

*Fagaceae* familyasına ait türlerde somatik embriyogenesis konusunda yapılmış çalışmalar Çizelge 1’de özetlenmiştir.

Çizelge 1. *Fagaceae* familyasında somatik embriyogenesis çalışmaları

Literatür, Tür ve Eksplant	Kültür koşulları	Sonuç
-(Maataoui vd. 1990) -Mantar meşesi ( <i>Q. suber</i> L.) -Boğum arası	MS (Murashige ve Skoog) temel besin ortamı (22 g/l glukoz ve 8 g/l agar agar katılmıştır). Başlangıç aşamasında, IBA (2 mg/l), BA (2 mg/l), kasein hidrolizat (g/l) ilave edilmiştir. Inkübasyon, karanlıkta ve 27°C sıcaklıkta yapılmıştır.	Embriyogenik kallustan proembriyolar oluşmuştur.
-(Manzanera vd. 1993) -Mantar meşesi -Hipokotil	Sommer (makro elementler)+MS (mikro elementler) besin ortamları (askorbik asit (11 µM), nikotik asit (8.1 µM), glutamine (3.4 mM), kalsiyum pantothenate (4.2 µM), pyridoxine.HCL (4.9 µM) ve thiamine.HCL (3 µM), 30 g/l sakaroz, 8 g/l agar katılmıştır). Başlangıç aşamasında (30 gün) 2,4-D (0.5, 1, 5, 10 mg/l) eklenmiş ve BDM içermeyen ortama transfer edilmiştir. Inkübasyon, başlangıçta 16 saat aydınlıkta yapılmıştır.	Embriyolar, eksplantan ya da kallustan oluşmuştur. Çimlenme (%50’nin üzerinde), 5°C (10 hafta) ya da 2°C (2 hafta) soğuklatma ile sağlanmıştır.
-(Cuenca vd. 1999) -Saplı meşe ( <i>Q. robur</i> L.) - Boğum arası ve yaprak	MS temel besin ortamı (500 mg/l kasein hidrolizat, %3 sakaroz ve %0.6 agar katılmış). Başlangıç aşamasında (6 hafta) BA (0.5, 1, 2 mg/l)+NAA (1, 2, 4 mg/l) ya da BA+IBA ve daha sonra (4 hafta) BA (0.1 mg/l)+NAA (0.1 mg/l) ya da BA+IBA kombinasyonları denenmiştir. Alt kültürler (aylık periyotlarla) BDM içermeyen ortamda yapılmıştır. Inkübasyon, başlangıçta karanlık, daha sonra 16 saat aydınlıkta yapılmıştır.	Embriyogenesis oranı yaprak ve boğum arası eksplantlarında sırasıyla %16 ve %4 olmuştur.

## SDÜ ORMAN FAKÜLTESİ DERGİSİ

<p>(Puigderrajols vd. 2001) -Mantar meşesi -Zigotik embriyo</p>	<p>SH (makro elementler)+MS (mikro elementler) (%3 sakaroz ve %0.6 agar ilave edilmiş) besin ortamında önce (20 gün) 2.22 mg/l BA+1.86 mg/l NAA, daha sonra (20 gün) 1.11 mg/l BA+0.93 mg/l NAA üzerinde ve son olarak BDM içermeyen ortamda (aylık periyotlarla) kültürler yapılmıştır. İnkübasyon, başlangıçta karanlıkta ve daha sonra 16 saat aydınlıkta yapılmıştır.</p>	<p>Somatik embriyogenesis sağlanmış ve sekonder embriyolar elde edilmiştir.</p>
<p>-(Hernandez vd. 2003) -Mantar meşesi -Yaprak</p>	<p>Gamborg (1/2 makro elementler)+MS (mikro element, vitamin, Fe-EDTA) (%1 sakkaroz, %0.6 agar katılmıştır) ortamında 7 gün ve daha sonra SH (makro)+MS (mikro element, vitamin, Fe-EDTA) (%3 sakkaroz, %0.6 agar), 10µM BA+50µM NAA'da 30 gün, 0.5µM BA+0.5 µM NAA'da 30 gün ve son olarak BDM içermeyen ortamda kültüre alınmıştır. İnkübasyon, ilk 7 gün karanlıkta, daha sonraki kültürlerde 16 saat aydınlıkta yapılmıştır.</p>	<p>Somatik embriyogenesis sağlanmış ve embriyolar soğuk uygulamasının (4°C'de 60 gün) ardından çimlenmiştir (%40).</p>
<p>-(Toribio vd. 2004) -Mantar meşesi -Saplı meşe (<i>Q. robur</i> L.) -Yaprak</p>	<p>Mantar meşesi için Hernandez vd. (2003) tarafından bildirilen protokol uygulanmıştır. Saplı meşede eksplantlar 0.56 mg/l BA, 3.72 mg/l NAA, %3 sakaroz, %0.6 agar, %0.05 kasein hidrolizat ilave edilmiş MS temel besin ortamında 30 gün süreyle kültüre alınmıştır. Somatik embriyogenesis için BDM içermeyen ortama transfer edilmiş ve çoğaltım için 0.1 mg/l BA+0.05 mg/l NAA katılmış MS temel besin ortamında 5'er hafta arayla alt kültüre alınmıştır. İnkübasyon, 25°C'de, 16 saat aydınlık koşullarda yapılmıştır.</p>	<p>Çimlenme öncesinde somatik embriyolar kasein hidrolizat içermeyen makro element düzeyi ½ olan ve %6 sorbitol, %3 sakaroz katılmış besin ortamında 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Çimlenme (%17-60), 0.1 mg/l BA ilave edilmiş ortamında sağlanmıştır.</p>
<p>-(Vieitez vd. 1990) -Kestane hibriti (<i>C. sativa</i> x <i>C. crenata</i>) -Zigotik embriyo</p>	<p>Embriyogenik kallus (%6-8), 1-2 mg/l BA ile ya da BA'sız 0.5-1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l zeatin ile 0.1 mg/l 2,4-D bulunan MS temel besin ortamında elde edilmiş ve embriyonik kalluslar 2,4-D içermeyen MS ortamına transfer edilmiştir.</p>	<p>Globular ve kalp şekilli somatik embriyolar elde edilmiş, bu embriyolar WPM ortamında olgunlaştırılmış, ancak çimlenme olmamıştır.</p>
<p>-(Merkle vd. 1991) -Amerikan kestanesi (<i>C. dentata</i> (Marsh.) Borkh.) -Ovul ve olgunlaşmamış embriyo</p>	<p>WPM temel besin ortamı (0.25 mg/l BA+6 mg/l NAA ya da 4 mg/l 2,4-D ilave edilmiş). Bu ortamda 1 veya 2 hafta inkübasyondan sonra 0.25 mg/l BA içeren ya da içermeyen ortama transfer edilmiştir. Ayrıca eksplantların bir kısmı başlangıç ortamında alt kültüre alınmıştır.</p>	<p>Çiçeklenmeden 6-7 hafta sonra kültüre alınan ovuller 1-2 hafta BDM içeren ortamda tutulduktan sonra oksinsiz ortama alındığında radikulda direkt somatik embriyogenesis meydana gelmiştir.</p>
<p>-(Carraway ve Merkle, 1997) -Amerikan kestanesi -Ovul, olgunlaşmamış ya da olgun zigotik embriyolar</p>	<p>WPM ortamı, BA (0.25 mg/l) ve TDZ (0.1 mg/l)'nin, 2,4-D, IAA ve NAA (0.1, 0.5, 3.0, 10.0, 20.0 mg/l) ile oluşturduğu farklı kombinasyonlar denenmiştir. İnkübasyon 25°C'de karanlıkta yapılmıştır. Somatik embriyolar WPM ortamında çimlendirilmiştir.</p>	<p>Embriyogenik kültürler 3 mg/l 2,4-D ve 0.25 mg/l BA ilave edilmiş sıvı WPM ortamında çok hızlı gelişim göstermiştir. Aktif kömür (5 g/l) somatik embriyoların miktarını ve gelişimini iyileştirmiştir.</p>
<p>-(Şan vd. 2007) -Avrupa kestanesi Olgunlaşmamış kotiledon</p>	<p>DKW temel besin ortamına başlangıçta (4 hafta) 1 mg/l BA, 2 mg/l KIN, 0.01 mg/l IBA ve 250 mg/l L-Glutamin ilave edilmiş, daha sonra BDM ve L-Glutamin içermeyen ortama transfer edilmiştir. İnkübasyon 25°C'de ve karanlıkta yapılmıştır.</p>	<p>Embriyogenesis oranı %40-70, eksplant başına embriyo sayısı 4-7.7'dir. Başarı tam çiçeklenmeden 5, 6 ve 7 hafta sonra toplanan kotiledonlarda daha yüksektir.</p>

## FAGACEAE FAMILYASINDA *IN VITRO* TEKNİKLERİN KULLANIMI VE SON GELİŞMELER

-Corredoira vd. 2008) -Avrupa kestanesi -Somatik embriyo	Somatik embriyolarda çimlenme düzeyinin artırılması amacıyla farklı uygulamalar yapılmıştır. Somatik embriyolar önce BDM içermeyen MS ortamı (makro elementleri ½ düzeyinde, %3 maltoz ve %0.7 agar ilave edilmiş) (olgunlaştırma ortamı) üzerinde 4 hafta süreyle kültüre alınmış ve daha sonra çimlendirme ortamlarına transfer edilerek 4°C'de 2 ay soğuklatılmıştır. Çimlendirme uygulamaları 1) kısmi olarak yavaş ya da hızlı kurutma, 2) çimlenme ortamına BDM (BA, NAA ya da IBA) veya glutamin ilavesi yapılmıştır.	En iyi sonuç somatik embriyoların laminar hava akışlı kabin içerisinde 2 saat süreyle hızlı kurutma yapılması ile elde edilmiştir. Embriyolarda nem kapsamı %57-58'dir. Çimlenme ortamına (%16-19) 0.44 µM BA ve 200-438 mg/l glutamin ilavesi rejenerasyonu artırmıştır. Bitki kalitesi için BA'nın yanında 0.49 µM IBA'nın olumlu etkisi belirlenmiştir.
-Naujoks, 2003) -Kayın ( <i>Fagus sylvatica</i> ) -Zigotik embriyo	Olgunlaşmamış zigotik embriyolardan embriyogenik kallus elde etmek üzere bir yöntem geliştirilmiştir.	Embriyogenesis oranı %7.9'dur. Embriyolar olgunlaştırılmış, köklendirilmiş ve toprağa başarıyla transfer edilmiştir.

### 2.2. Sürgün ucu, boğum, boğum arası ve kök kültürleri

Bir bitkinin sürgün, tomurcuk, yaprak, kök gibi vegetatif kısımları tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahiptir. Bu doku ve organlar aseptik koşullarda yapay besin ortamları üzerinde kontrollü koşullarda kültüre alındıklarında klon olarak kısa zamanda çok sayıda çoğaltılabilmektedir. Bu teknik mikroçoğaltım olarak tanımlanmaktadır (George ve Debergh, 2008). *Fagaceae* familyasında özellikle seçilmiş elit bitkilerin *in vitro* çoğaltımı amacıyla eksplant kaynağı olarak sürgün ucu, boğum, boğum arası ve kök segmentleri kullanılarak mikroçoğaltım çalışmaları yapılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. *Fagaceae* familyasında sürgün ucu, boğum, boğum arası ve kök kültürü çalışmaları

Literatür, Tür ve Eksplant	Kültür koşulları	Sonuç
-(Vieitez vd. 1985) -Saplı meşe -Sürgün ucu ve boğum	Heler ve GD ortamları (1mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> içeren), (başlangıçta 1 mg/l BA, sürgün çoğaltımında 0.1 mg/l BA katılmış), köklenme mikro çeliklerin dip kısımları 0.5 mg/l (10 dakika) ya da 1 mg/l (2 dakika) IBA'ya daldırılmıştır.	Köklenme oranı %63-83'dür.
-(Juncker ve Favre, 1989) -Saplı meşe -Genç ve yaşlı eksplantlar	MS ortamı (¼ NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ve ½ kuvvetinde makro elementleri bulunan), 0.1, 0.25, 0.5 mg/l BA, 30 g/l sakaroz ve 7 g/l agar katılmıştır. Köklenme için sürgünler önce 1 mg/l IBA ve 20 g/l sakaroz ilave edilmiş ½ kuvvetindeki temel besin ortamında 8 gün ve ardından 1 g/l aktif kömür içeren IBA'sız ortamda kültüre alınmıştır.	BA dozunun artması ile sürgün sayısı ilk kültürlerde 1.6-3.0 ve alt kültürlerde 0-1.5 sürgün/eksplant'tır. Köklenme oranı %20-95'dir.
-(Manzanera ve Pardos, 1990) -Mantar meşesi -Tomurcuk ve gövde segmenti	Sürgün oluşumu için Sommer ya da Heller ortamları, 0.1 mg/l BA, 0.01 mg/l NAA kullanılmıştır. Köklenme için mikro çelikler 1 mg/l IBA ilave edilmiş ortamda 7 gün tutulmuş ve daha sonra oksinsiz ortama transfer edilmiştir.	Köklenme sağlanmıştır.

SDÜ ORMAN FAKÜLTESİ DERGİSİ

- (Mala vd. 2000) - Saplı meşe - Mikro çelik	Mikro çelikler önce 14.0 mg/l NAA ilave edilmiş besin ortamında 1 hafta süreyle karanlık koşullarda inkübe edilmiş ve daha sonra oksinsiz, %1 PVP bulunan ya da bulunmayan ortamlara ve aydınlık koşullara transfer edilmiştir.	Köklenme oranı PVP ilave edilmiş ve edilmemiş ortamlarda sırasıyla %86.6 ve %81.5 olmuştur.
-(Tsvetkov ve Hausman 2005) - Meşe türleri ( <i>Q. robur</i> L. ve <i>Q. cerris</i> L.) - Mikro çelikler	GD temel besin ortamı (0.88 µM BA ve 7.5 g/l agar ilave edilmiş), apikal ve boğum segmentleri şeklinde mikro çelikler (4-5 mm) %4 sodyum aljinat katılmış sıvı besin ortamı (0.88 µM BA içeren GD) ile kaplanmış, %1.4'lük CaCl <sub>2</sub> solusyonu ile 10 dakika muamele edilmiştir. İkişer dakika 3 kez kez sıvı GD ortamı ile çalkalanmış ve kapsüller 0.88 µM BA ve 7.5 g/l agar ilave edilmiş GD ortamında kültüre alınmıştır. Inkübasyon 23°C ve 18 saat aydınlıkta yapılmıştır.	Kaplanmış mikroçeliklerde rejenerasyon oranı apikal segmentlerde, boğum segmentlerine göre daha yüksek. Boğum segmentleri 4°C'de 2-6 hafta soğuklatıldığında rejenerasyon daha başarılıdır.
-(San Jose vd. 1984) - Avrupa kestanesi - Kök, hipokotil ve epikotil segmentleri	Heller'in makro elementlerinin kullanıldığı düşük mineral madde içerikli ortamlar kullanılmıştır.	En yüksek tomurcuk farklılaşması 2 mg/l BA + 0.01 mg/l NAA ya da IBA uygulamasında meydana gelmiştir. Adventif tomurcuklara 0.1 mg/l BA etkili olmuştur. Köklenme için IBA uygulamasının gerekli olduğu belirlenmiştir.
-(Sanchez vd. 1997) - Kestane hibriti - Sürgün ucu ve boğum	GD temel besin ortamı (başlangıç aşamasında 0.5 mg/l BA, 30 g/l sakaroz ve 7 g/l agar; sürgün çoğaltımında 0.2 mg/l BA ilave edilmiş) kullanılmıştır. Köklendirme için 2 uygulama yapılmış; 1/3 kuvvetindeki GD ortamına 3 mg/l IBA (ilk 5 günü karanlıkta olmak üzere 7 gün) ya da 25-50 mg/l IBA içeren ortamda 24 saat süreyle kültüre alınmıştır.	Köklenme (%17.6-96.4) için 25-50 mg/l IBA içeren ortamda 24 saat süreyle kültüre alma uygulaması ve bazı klonlarda %1 aktif kömür ilavesi önerilmiştir.
-(Soylu ve Ertürk 1999) - Avrupa kestanesi ve hibritler - Sürgün ucu ve tomurcuk	Sürgün oluşumu için MS (NO <sub>3</sub> düzeyi ½ olan) temel besin ortamı (1 mg/l BA ilave edilmiş) kullanılmıştır.	Bazı genotiplerde 2-3 aylık ya da 1 yıllık bitkilerden alınan yan tomurcuklar ile yapılan kültürler başarılı sonuç vermiştir.
-(Giovannelli ve Giannini 1999) - Avrupa kestanesi - Sürgün ucu ve boğum	WPM besin ortamı (başlangıçta 1.0 mg/l BA+0.01 mg/l IBA, sürgün çoğaltmada 0.1 mg/l BA ilave edilmiş) kullanılmıştır. Köklendirme için mikro çelikler 3 mg/l IBA ilave edilmiş makro element düzeyi 1/3 kuvvetinde olan temel besin ortamı üzerinde 5 gün süreyle karanlık koşullarda ve daha sonra oksin içermeyen besin ortamının katıldığı steril perlitte kültüre alınmıştır.	Genç bitkilerden kaynağını alan <i>in vitro</i> sürgünlerde köklenme başarısı %65.5, bitkileri dış koşullara alıştırma oranı %40'tır.
-(San-Jose vd. 2001) - Avrupa kestanesi - Embriyo, hipokotil, epikotil ve kotiledon	Embriyonun çimlendirilmesi için MS temel besin ortamı (0.1 mg/l TDZ ya da 1 mg/l BA ilave edilmiş); sürgün oluşumu için MS besin ortamı (farklı TDZ dozları+0.01 mg/l NAA ilave edilmiş), alt kültürler için TDZ içermeyen düşük BA dozları kullanılmıştır. Sürgün gelişimi sadece kotiledon eksplantlarda meydana gelmiştir.	Çimlenme için BA; sürgün oluşumu için 1-2 mg/l TDZ en uygun doz olarak bulunmuş, sürgün uzaması 0.05 mg/l BA içeren GD ortamında sağlanmıştır. 21 klonun 16'si köklenmiştir (%75'ten fazla).
-(Tetsumura ve	Temel besin ortamı Sato'nun BW ortamı. Farklı	Sato'nun BW ortamı, ½

FAGACEAE FAMILYASINDA *IN VITRO* TEKNİKLERİN KULLANIMI VE SON GELİŞMELER

Yamashita 2004) -Japon kestanesi ( <i>C.crenata</i> ) -Boğum	besin ortamları, büyüme düzenleyiciler ve uygulamaların boğum kültürlerinde sürgün oluşumu, gelişimi ve köklenme üzerine etkileri incelenmiştir. DKW ortamında camlaşma sorunu belirlenmiş. Köklenme, 15µM IBA ilave edilmiş ½ kuvvetindeki BW ortamında 5 gün uyarımdan sonra vermikulit ilave edilmiş yarı katı ½ BW ortamında daha iyi sağlanmıştır.	NO <sub>3</sub> 'lu MS ortamı kadar ve 5µM zeatin aynı dozda BA ve TDZ'den daha etkili olmuştur. Köklenen bitkiler dış koşullarda daha kuvvetli gelişmiştir.
-(Osterc vd. 2005) -Avrupa kestanesi -Boğum	Çoğaltım için 1) MS temel besin ortamı (1/2 NO <sub>3</sub> 'lu) (100 mg/l myo-inositol, 1.0 mg/l thiamin, 30 g/l sakaroz ve 8 g/l agar ilave edilmiş), 2) BW ortamı, her iki çoğaltım ortamına da 1.0 mg/l BA ya da 1.0 mg/l zeatin ilave edilmiştir.	Sürgün sayısı (2.1 adet) ve gelişimi BA ile daha iyi olmuştur. Sürgün gelişimi BW ortamında zayıf kalmıştır.
-(Nadel vd. 1991a) -Kayın -Tomurcuk	Aspen ortamı, IAA, GA <sub>3</sub> ve zeatin kullanılmıştır.	Tomurculardan sürgün uzaması ve yaprak gelişimi iyi olmuştur.
-(Nadel vd. 1991b) -Kayın -Tomurcuk	Farklı zamanlarda kültüre alınan tomurcukların <i>in vitro</i> gelişimi izlenmiştir. BDM olarak IAA, GA <sub>3</sub> ve BA (5 µM) ilave edilmiştir.	Kasım ayındaki içsel dinlenme nedeniyle Ocak ve Şubat'da alınan eksplantlarda BDM kombinasyonu ile sürgün uzaması ve yaprak oluşumu artırılmıştır.
-(Meier ve Reuther 1994) -Kayın -Tomurcuk	Olgun (35 yaşlı) elit ağaçların mikro çoğaltımı üzerine bazı içsel faktörlerin etkisini araştırılmıştır.	İçsel bakteriler ile bulaşmanın düşük ve <i>in vitro</i> gelişimin en yüksek olduğu Şubat ayı uygun eksplant alma dönemi bulunmuştur.
-(Barker vd. 1997) -Amerikan kayını ( <i>F. grandifolia</i> Ehrh.) -Sürgün ucu ve tomurcuk	Sürgün oluşumu için Aspen ortamı (0.2 mg/l BA, 0.05 mg/l NAA, 20 g/l sakaroz ve 7 g/l agar ilave edilmiş), köklenme için 2500 ppm IBA solusyonuna 1 dakika daldırılma uygulaması yapılmıştır. Bitkiler, 20 g/l sakaroz ilave edilmiş ½ kuvvetindeki besin ortamı ile doymuş hale getirilmiş bir Horticube'da (köpük benzeri bir köklenme ortamı) kültüre alınmıştır.	Sürgün çoğaltımı ve köklenme başarılı olmuştur.
-(Cuenca vd. 2000) -Doğu kayını -Boğum arası	Sürgün çoğaltımı için eksplantlar 0.5 mg/l BA, 2 mg/l zeatin ve 0.5 mg/l IAA ilave edilmiş ortamda 8 hafta süreyle kültüre alınmıştır.	Başlangıçta en uygun TDZ dozu 1 mg/l ve BA dozu 4 mg/l

### 2.3. Anter kültürü

Anter kültürü, haploid embriyo ve bitki oluşumu amacıyla olgunlaşmamış mikrosporları (polenleri) içeren anterlerin aseptik koşullarda çiçek tomurcuklarından çıkarılarak yapay besin ortamları üzerinde kültüre alındığı *in vitro* tekniktir. Bu teknik ile elde edilen haploid bitkilerde kromozom sayılarının katlanması yoluyla (dihaploidizasyon) kısa zamanda homozigot saf hatlara ulaşabilmekte, resesif mutasyonlar açığa çıkarılabilmekte, somatik hibridizasyon daha kolay uygulanabilmektedir. Ayrıca haploit embriyo ve bitkiler sitolojik, fizyolojik, genetik ve moleküler çalışmalar için değer taşımaktadır (Ellialtıoğlu vd.,

2002). Anter kültürü çalışmaları *Fagaceae* familyasında az sayıda da olsa gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. *Fagaceae* familyasında anter kültürü çalışmaları

Literatür, Tür ve Eksplant	Kültür koşulları	Sonuç
-(Jørgensen 1987) -Meşe ve kayın -Anter	MS ve WPM besin ortamları (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/l BA ve 2,4-D, 100 m/l inositol, 1 mg/l nicotin amide, 1 mg/l pyridoxine hydrochloride, 2 mg/l thiamine, 0.4 mg/l folic asit, 0.02mg/l p-aminobenzoic asit, 0.01 mg/l biotin, 1 mg/l cholin, 2 mg/l ascorbic asit, 0.01 mg/ vitamin A, 0.01 mg/l vitamin D2, 10 mg/l panthotenic asit, 0.02 mg/l vitamin B12, 2 mg/l adenin, 200 mg/l kasein hidrolizat ve 2 g/l aktif kömür, 500 mg/l glutamine, 30 mg/l serine, 1000 mg/l glutamine ve 500-1000 mg/l PVP ilave edilmiş)kullanılmıştır. İnkübasyon 28 °C'de, 16 saat aydınlıkta yapılmıştır.	Meşede oluşan embriyolar hızlı bir şekilde gelişmiştir.
-(Bueno vd. 1997) -Mantar meşesi -Anter	Sommer (makro elementler)+MS (mikro element ve vitaminler) besin ortamları (%3 sakaroz, %0.8 agar ve %1 aktif kömür ilave edilmiş) kullanılmıştır. Androgenesis için anterler 33°C'de 5 gün süreyle bekletilmiş, daha sonra 25°C sıcaklıkta sekonder embriyogenesis sağlanmıştır.	Embriyo oluşumu %14, AC <sub>1</sub> klonunda kök uçlarında kromozom sayısı 2n=12 (haploid) olarak belirlenmiştir.

#### 2.4. Protoplast kültürü

Aseptik koşullarda bir hücreden protoplastın izole edilmesi, daha sonra canlı protoplastta yeniden hücre duvarının oluşturulması, hücrelerin mitoz bölünme ile çoğaltılması ve bitki rejenerasyonunun sağlanması aşamalarını içeren *in vitro* teknik protoplast kültürü olarak tanımlanmaktadır. Protoplast kültürü, somatik melezlemelere olanak sağladığı için bitki ıslahında önemli bir tekniktir. Protoplastlar, mutant izolasyonu, hücre zarından madde taşınımı, hücre organellerinin (nükleus, kloroplast, mitokondri gibi) izolasyonu, gen aktarımı ile ilgili çalışmalarda da kullanılabilir (Babaoğlu ve Özcan, 2002). Çizelge 4'de *Fagaceae* familyasında yapılmış protoplast kültürü çalışması sunulmuştur.

Çizelge 4. *Fagaceae* familyasında protoplast kültürü çalışmaları

Literatür, Tür ve Eksplant	Kültür koşulları	Sonuç
-(Sasamoto ve Hosoi 1992) -Meşe -Embriyogenik hücreler	Embriyogenik kültürler, 0.1 µM 2,4-D ve BA içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolardan elde edilmiştir. Kültürler 7 ay süreyle alt kültüre alınmış ve protoplast izolasyonu 0.6 M mannitol solusyonu içerisinde %1 Cellulase RS enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protoplastlar, 0.6 M mannitol, %3 sakaroz, 0.1 µM ya da 1 µM 2,4-D ve BA kombinasyonu ilave edilmiş sıvı MS ortamında kültüre alınmıştır.	Kültüre alınan protoplastlarda etkili koloni oluşumu meydana gelmiştir.

## 2.5. Genetik materyalin *in vitro* muhafazası

Bitkilerde genetik materyaller (germplazm) *in vitro* koşullarda büyümenin yavaşlatılması ve soğukta muhafaza (kryoprezervasyon) olmak üzere iki şekilde muhafaza edilmektedir. Bunlardan kryoprezervasyon, biyolojik materyalin canlı olarak dondurulması ve daha sonra sıvı azot içerisinde çok düşük sıcaklıklarda (-196 °C) muhafaza edilmesidir. Bu teknik ile sürgün uçları ve meristemler, hücreler ve somatik embriyolar, protoplastlar, embriyo, endosperm, ovul, anter, polen ve tohum vb. yapılar muhafaza edilmektedir (Emeklier, 2002). *Fagaceae* familyasında da genetik materyalin soğukta muhafazasında eksplant olarak zigotik ve somatik embriyoların ve sürgün uçlarının kullanıldığı görülmektedir (Çizelge 5).

Çizelge 5. *Fagaceae* familyasında genetik materyalin *in vitro* muhafazası çalışmaları

Literatür, Tür ve Eksplant	Kültür koşulları	Sonuç
-(Corredoira vd. 2004b) -Avrupa kestanesi -Zigotik ve somatik embriyo	Tohumlar kurutulduktan (nem kapsamı %20–24) sonra sıvı azot içerisinde depolanmıştır. Globular ve kalp aşamalarında 6–8 mg'lık yığınlar halinde 7 gün süreyle yüksek şeker içeren ortam üzerinde ön kültürü yapılan somatik embriyolar, daha sonra sıvı azot içerisinde depolamadan önce %25 nem düzeyine kadar kurutulmuştur. Embriyo yığınları yüksek şeker içeren ortam üzerinde 3 gün süreyle ön kültürü yapıldıktan sonra kryoprezervasyondan önce PVS2 vitrifikasyon solusyonunda (0.4 M sakaroz içeren MS ortamında %30 gliserol, %15 DMSO, %15 etilen glikol) 60 dakika bekletilmiştir.	Tohumların embriyonik eksenlerinde yaşama oranı %93-100 ve bitkiye dönüşüm oranı %63'tür. Somatik embriyolarda çözülmeden sonra embriyogenesinin sürdürülebilirlik oranı %33 bulunmuştur. Bu oran kryoprezervasyondan önce PVS2 solusyonunda bekletilen embriyolarda %68 olmuştur.
-(Jorquera vd. 2005) -Avrupa kestanesi -Sürgün ucu	Hızlı dondurma öncesinde ön kültürler yapılmış ve sürgünler vitrifikasyon solusyonlarında tutulmuştur.	
-(Vidal vd. 2005) -Avrupa kestanesi -Soğukta muhafaza edilmiş (kryoprezervasyon) <i>in vitro</i> sürgünler	3-5 haftalık kültürlerden izole edilen ve 2 hafta 4°C'de pişkinleştirilen sürgünlerin uç kısımlarından 0.5-1 mm uzunlukta hazırlanan eksplantlar kullanılmıştır. Bunlar önce soğukta 0.2 M sakaroz katılmış katı GD ortamında kültüre alınmış ve daha sonra oda sıcaklığında 20 dakika 2 M gliserol+0.4 M sakarozdan oluşan solusyona batırılmıştır. Sıvı azota hızlı daldırılmadan önce 0°C'de 120 dakika PVS2 solusyonu kullanılmıştır. Sıvı azotta 1 gün bekletildikten sonra hızla yeniden ısıtılmış ve 20 dakika süreyle 1.2 µM sakaroz solusyonuna bırakılmıştır.	Uygulanan protokol ile muhafazadan sonra <i>in vitro</i> sürgünlerin yeniden gelişimi sağlanmış ve 5 kestone klonunda %38-54 başarı elde edilmiştir. Sürgün uçları yeniden 2.2µM BA, 2.9µM IAA ve 0.9µM zeatin içeren GD ortamında geliştirilmiştir.

## 2.6. Gen transferi çalışmaları

Gen transferi, belirli bir özelliği tanımlayan nükleik asit dizilerinin (genlerin) bir bitkinin genomuna genetik mühendisliği teknikleri ile aktarılmasıdır. Gen transferi için ilk aşama genlerin izolasyonu ve manipulasyonudur. *Agrobacterium tumefaciens* ile gen aktarımı dikotiledon bitkilerde en yaygın kullanılan yöntemdir

(Hatipoğlu, 1999). *Fagaceae* familyasında yapılan gen transferi çalışmalarında da bu teknikten yararlanılmıştır (Çizelge 6).

Çizelge 6. *Fagaceae* familyasında gen transferi çalışmaları

Literatür, Tür ve Eksplant	Transformasyon Protokolü	Sonuç
-(Alvarez vd. 2004) -Mantar meşesi -Embriyo	Gen transferi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ile gerçekleştirilmiştir. <i>A. tumefaciens</i> hatları EHA105, LBA4404 ya da AGL1, <i>nptII</i> (neomycin phosphotransferase II) ve <i>uidA</i> beta -glucuronidase) genlerini içeren pBINUbiGUSint plazmitini kapsamaktadır.	En yüksek transformasyon etkinliği (%4) <i>A. tumefaciens</i> hattı AGL1 ile elde edilmiştir.
-(Seabra ve Pais, 1998) -Avrupa kestanesi -Hipokotil segmentleri	<i>Agrobacterium</i> aracılığıyla <i>nptII</i> geni stabil olarak transfer edilmiştir. Yaralanmış eksplantlar p35SGUSINT plazmitini kapsayan LBA 4404 bakteri hattı ile bulaştırılmıştır. β-Glucuronidase histokimyasal analizler, transgenik eksplantlardan rejeneren olan sürgünlerde <i>uidA</i> geninin varlığını kanıtlamıştır.	PCR analizleri bitki genomuna <i>nptII</i> geninin bağlandığını göstermiştir.
-(Seabra ve Pais, 1999) -Avrupa kestanesi -Gövde segmentleri	Glucanase ( <i>glu</i> ) ve chitinase ( <i>chi</i> ) genlerinin, mürekkep hastalığına dayanıklı bireyler elde etmek üzere eksplantlara aktarılması amacıyla <i>A. tumefaciens</i> 'in LBA 4404 hattı kullanılmıştır. Bu bakteri hattı, <i>nptII</i> , <i>glu</i> ve <i>chi</i> genleri bulunan T bölgesine sahip pGJ40 plasmidini kapsamaktadır.	Funguslar ile biyolojik testlerin daha sonra yapılacağı bildirilmiştir.
-(Corredoira vd. 2004a) -Avrupa kestanesi -Somatik embriyo	Globular ya da erken torpedo safhasındaki embriyoların 4 gün süreyle <i>A. tumefaciens</i> hattı EHA105 ile kokültivasyonu ile yapılmıştır. Bu bakteri hattı markör genleri içeren pUbiGUSINT plasmidini kapsamaktadır. Seleksiyon ortamı olarak 150 mg/l kanomycin katılmış MS ortamı kullanılmıştır. <i>Uida</i> ve <i>nptII</i> genlerinin transformasyonu beta -glucuronidase (GUS) testi, PCR ve Southern blot analizleri ile kontrol edilmiştir. Test ve analizlerde çimlenen embriyolardan alınan yaprak ve sürgünler kullanılmıştır.	Transformasyon etkinliği %25 olarak belirlenmiştir. GUS-pozitif 93 embriyogenik kestone hattı kültüre alınmıştır. Transgenik somatik embriyolarda çimlenme oranı (%6.3) oldukça düşüktür.
-(Corredoira vd. 2008) -Avrupa kestanesi ( <i>C. sativa</i> Mill.) -Somatik embriyo	Somatik embriyogenesis, proliferasyon ortamı üzerinde 6 hafta ara ile alt kültürler yapılarak sağlanmıştır. Bu ortam 3 mM glutamin, 0.1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA %3 sakkaroz ve %0.7 agar ilave edilmiş makro elementler ½ kuvvetinde olan MS temel besin ortamıdır. Kültürler 16 saat aydınlık koşullarda 25/20°C sıcaklık rejiminde inkübe edilmiştir. Gen transferleri <i>A. tumefaciens</i> ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla pUbiGUSINT plasmidini ( <i>nptII</i> ve <i>uidA</i> genlerini içermektedir) taşıyan EHA105 bakteri hattı kullanılmıştır. Transgenik hatlarda krayoprezervasyon Corredoira vd. (2004)'ye göre yapılmıştır.	Globular ya da globular/kalp şeklinde 2-3 embriyolu kümeler transformasyon için etkili bulunmuştur (%30). Embriyolar kotiledon aşamasına ulaştığında başarı %6.7 olmuştur. Ayrıca transgenik 3 embriyo hattı vitrifikasyon işlemi uygulanarak başarıyla soğukta muhafaza edilmiştir (krayoprezervasyon).

### 3. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ormanların gerek odun hammaddesi, gerek yan ürün ve gerekse rekreasyonel olarak kullanılması sürdürülebilir ormancılık yaklaşımı çerçevesinde değerlendirilmelidir. Mevcut orman alanlarında ıslah amaçlı silvikültürel müdahalelerin yapılması, ağaçlandırma faaliyetlerinin kaliteli fidanlarla gerçekleştirilmesi ve böylelikle yüksek başarının beklenmesi sürdürülebilir ormancılığın gereklerindedir. Bu amaçla planlanan çoğaltım ve ıslah çalışmalarında zaman ve yer kaybının önlenmesi, biyolojik ve fizyolojik sorunların giderilmesinde *in vitro* tekniklerin kullanılması otsu ve odunsu bitki türlerince oldukça zengin olan ormanlarımız ve meralarımız için bulunmaz bir fırsattır. *Fagaceae* familyasına ait meşe, kayın ve kestane gibi asli orman ağaçlarımızın iyileştirilmesinde mevcut bazı sorunlarının giderilmesinde *in vitro* tekniklerin sunduğu potansiyel, bugüne kadar bu konuda yapılmış çalışmaların ele alındığı bu derlemeden rahatlıkla anlaşılmaktadır.

Son söz olarak, ormancılıkta biyoteknolojinin sunduğu olanaklardan yararlanmak ve gelişmiş ülkelerin gerisinde kalmadan yeni teknoloji geliştirebilmek, bu sektörde karşılaşılan sorunlara karşı proje ve çözüm üretmekle yükümlü bulunan orman mühendislerinin, modern bilimin bu alanında da donanımlı olarak yetiştirilmesi ve gerekli alt yapının hazırlanması ile olasıdır.

**KISALTMALAR:** BDM (büyüme düzenleyici madde). Büyüme düzenleyici maddeler - 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit); GA<sub>3</sub> (gibberellik asit); IAA (indolasetik asit); IBA (indolbütirik asit); KIN (kinetin); NAA (naftalenasetik asit); TDZ (thidiazuron). Temel besin ortamları - BTM (Broad Leaved Tree Medium); BW (1/2 kuvvette broadleaved tree ve 1/2 kuvvette WPM); DKW (Driver ve Kuniyuki walnut); GD (Gresshoff ve Doy); MS (Murashige ve Skoog); SH (Schenk ve Hildebrandt); WPM (Woody Plant Medium).

#### KAYNAKLAR

- Alvarez, R., Alonso, P., Cortizo, M., Celestino, C., Hernandez, I., Toribio, M., Ordas, R. J. 2004. Genetic transformation of selected mature cork oak (*Q. suber* L.) trees. *Plant Cell Reports*. 23(4): 218-223.
- Anonim. 2006. Orman varlığımız. Çevre ve Orman Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü Yayını, Ankara.
- Babaoğlu, M., Özcan, S., 2002. Protoplast kültürü ve somatik melezleme. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (Ed.) *Bitki Biyoteknolojisi I*. Selçuk Üniv. Vakfı Yay. ss. 89-136.
- Barker, M., Pijut, P.M., Ostry, M.E., Houston, D.R. 1997. Micropropagation of juvenile and mature american beech. *Plan. Cell. Tiss. Org. Cult.* 51, 209-213.
- Bueno, M.A., Gomez, A., Boscaiu, M., Manzanera, J.A., Vicente, O. 1997. Stress-induced formation of haploid plants through anther culture in cork oak (*Quercus suber* L.). *Physiol. Plant.* 99: 335-341.
- Carraway, D.T., Merkle, S.A. 1997. Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut. *Can. Jour. For. Res.* 27: 1805-1812.
- Corredoira, E., Montenegro, D., San-Jose, M.C., Vieitez, A.M., Ballester, A. 2004a. Agrobacterium-mediated transformation of European chestnut embryogenic cultures. *Plant Cell Rep.* 23(5): 311-318.
- Corredoira, E., San Jose, M.C., Ballester, A., Vieitez, A.M. 2004b. Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. *Cryoletters* 25: 33-42.

- Corredoira, E., San-Jose, M. C., Vieitez, A. M., Ballester, A. 2008. Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cul.* 91(3): 281-288.
- Cuenca, B., San Jose, M.C., Martinez, M.T., Ballester, A., Vieitez, A.M. 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. *Plant Cell. Rep.* 18: 538-543.
- Cuenca, B., Ballester, A., Vieitez, A.M. 2000. *In vitro* adventitious bud regeneration from internode segments of beech. *Plan. Cell. Tiss. Org. Cult.* 60: 213-220.
- Dölarıslan, E.Ş., 2005. Avrupa Birliği ormancılık stratejisi çerçevesinde sürdürülebilir orman yönetimi kavramı ve Türkiye açısından bir değerlendirme. Türkiye ormancılığında, uluslararası süreçte acilen eyleme dönüştürülmesi gereken konular, mevzuat ve yapılanmaya yansımaları sempozyumu. 22-24 Aralık 2005, TMMOB, Antalya, Turkey. (*basında*).
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K., 2002. Haploid bitki üretimi. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (Ed.) Bitki Biyoteknolojisi I. Selçuk Üniv. V. Yay. 137-189.
- Emeklier, Y., 2002. Germplasm muhafazası. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (Ed.) Bitki Biyoteknolojisi I. Selçuk Üniv. Vakfi Yay. ss. 282-323.
- George, E.F., Debergh, P.C. 2008. Micropropagation: Uses and Methods. In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.J. (eds.) Springer, The Netherlands, pp 29-64.
- Giovannelli, A., Giannini, R. 1999. Effect of serial grafting on micropropagation of chestnut. *Acta Hort.*, 494: 243-246.
- Hatipoğlu, R. 1999. Bitki biyoteknolojisi. Ç.Ü.Zir. Fak. Gn. Yay., No:190.
- Hernandez, I., Celestino, C., Allergre, J., Toribio, M. 2003. Vegetative propagation of *Q. suber* L. by somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 21: 765-770.
- Jorguera, L., Vidal, N., Sanchez, C., Vieitez, A.M. 2005. Optimizing condition for succesful plant regeneration from cryopreserved *Castanea sativa* shoot tips. *Acta Hort.* 693: 511-518.
- Jörgensen, J. 1987. Embryogenesis in *Quercus petraea* and *Fagus sylvatica* J.Plant Physiol. Vol.132., pp: 638-640.
- Juncker, B., Favre, J.M. 1989. Clonal effect in propagating oak trees via *in vitro* culture. *Plan. Cell. Tis. Org. Cult.* 19;267-276.
- Kermode, A.R., Bewley, D.J. 1985. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. *Journal of Experimental Botany*, 36, 1916-1927.
- Kim, Y.W., Youn, Y., Noh, E.R., Kim, J.C. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*. *Plant Cell Reports*, 16: 869-873.
- Maataoui, M. El., Espacnac, H., Michaux-Ferriere, N. 1990. Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Q.suber*) cultured *in vitro*. *Annals of Bot.*, 66: 183-190.
- Mala, J.K., Cvrckova, H., Cvikrova, M., Eder, J. 2000. The effect of reduction of exuded phenolic substances level on rooting of oak microcuttings. *Acta Hort.*, 530: 353-360.
- Manazera, J.A., Pardos, J.A. 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L.. *Plant Cell Tis.and Org. Cult.*, 21: 1-8.
- Manzanera, J.A., Astorga, R., Bueno, M.A. 1993. Somatic embryo induction and germination in (*Q.suber*). *Silvae Genetica*, 42: 2-3, pp:90-93.
- Meier, K., Reuther, G. 1994. Factors controlling micropropagation of mature *Fagus sylvatica*. *Plan.Cell Tis. Org. Cult.*, 39: 231-238.
- Merkle, S.A., Wiecko, A.T., Watson-Pauley, B.A. 1991. Somatic embryogenesis in American chestnut. *Can. J. For. Res.* 21;1698-1701.
- Nadel, B.L., Altman, A., Pleban, S., Hüttermann, A. 1991a. *In vitro* development of mature (*Fagus sylvatica* L.) buds I.the effect of medium and plant growth regulators on bud growth and protein profiles. *J. Plan. Physiol.*, Vol:138, pp: 596-601.

FAGACEAE FAMILYASINDA *IN VITRO* TEKNİKLERİN KULLANIMI VE SON GELİŞMELER

- Nadel, B.L., Altman, A., Pleban, S., Kocks, R., Hüttermann, A. 1991b. *In vitro* development of mature (*Fagus sylvatica* L.) buds II. seasonal changes in the response to plant growth regulators. J. Plan. Physiol., Vol:138, pp136-141.
- Naujoks, G. 2003. Somatic embryogenesis in beech (*Fagus sylvatica*). Biologia (Bratislava), 58(1): 83-87.
- Osterc, G., Fras, M. Z., Vodenik, T., Luthar, Z. 2005. The propagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) nodal explants. Acta Agric. Slovenica., 85(2): 411-418.
- Özcan, S., Babaoğlu, M., Sancak, C., 2002. Somatik embriyogenesis. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (Ed.) Bitki Biyoteknolojisi I. Selçuk Üniv. Vakfı Yay., ss. 71-88.
- Preece, J. 2008. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis, In: Plant Propagation by Tissue Culture, Volume 1, The Background. George, F.E., Hall, M.A. and Jan De Klerk, G. (eds), Springer, pp. 403–422, Dordrecht, The Netherlands.
- Puigderrajols, P., Mir, G., Molinas, M. 2001. Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Q.suber* L.). Ann.of Bot., 87:179-189.
- San Jose, M.C., Vieitez, A.M., Vieitez, E. 1984. *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds of chestnut. J. Hort. Sci., 59(3), 359-365.
- San Jose, M.C., Ballester, A., Vieitez, A.M. 2001. Effect of thidiazuron on multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary nodes of chestnut. J. Hort. Sci. and Bio., 76(5), 588-595.
- Sanchez, M.C., San Jose M.C., Ferro, E., Ballester, A., Vieitez, A.M. 1997. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. J. Hort. Sci., 72(3), 433-443.
- Sasamoto, H., Hosoi, Y. 1992. Callus proliferation from protoplast of embryogenic cells of *Quercus serrata*. Plant Cell. Tis. Org. Cult., 29: 241-245.
- Seabra, R.C., Pais, M.S. 1998. Genetic transformation of European chestnut. Plan. Cel. Rep., 17: 177-182.
- Seabra, R.C., Pais, M.S. 1999. Genetic transformation of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) with genes of interests. Acta Hort., 494: 407-414.
- Schenk, R.U., Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany, 50, 199–204.
- Soylu, A., Ertürk, Ü. 1999. Researches on micropropagation of chestnut. Acta Hort., 494: 247-253.
- Şan, B., Sezgin, M., Dumanoglu, H., Köksal, A.İ. 2007. Somatic embryogenesis from immature cotyledons of some European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars. Turkish J. of Agric. and For., 31: 175–179.
- Teasdale, R. 1992. Formulation of plant culture media and applications therefore. International Publication No: WO 92/07460, Patent No: Europe:92902531.0, Forbio PTY Ltd., Queensland, Australia.
- Tetsumura, T., Yamashita, K. 2004. Micropropagation of Japanese chestnut (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) seedlings. HortScience., 39(7): 1684-1687.
- Tsvetkov, I., Hausman, J. F. 2005. *In vitro* regeneration from alginate-encapsulated microcuttings of *Quercus* sp.. Scientia Horti. 103(4): 503-507.
- Toribio, M., Fernandez, C., Celestino, C., Martinez., M.T. San Jose, M.C., Vieitez, A.M. 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. Pl. Cell. Tiss. Org. Cul. 76: 283-287.
- Vidal, N., Sanchez, C., Jorquera, L., Ballester, A., Vieitez, A. M. 2005. Cryopreservation of chestnut by vitrification of *in vitro*-grown shoot tips. *In vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant., 41(1): 63-68.
- Vieitez, A.M., San Jose, M.C., Vieitez, E. 1985. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Q.robur* L.. J. Hort. Sci., 60(1), 99-106.
- Vieitez, F.J., San Jose, M.C., Ballester, A., Vieitez, A.M. 1990. Somatic embriyogenesis in cultured immature zygotic embryos in chestnut. J. Plant Physiol., Vol.136. pp. 253-256.