

## *Liquidambar orientalis*'te Uygun Sterilizasyon ve Doku Kültürü Koşullarının Optimizasyonu

### Optimization of Proper Sterilization and Tissue Culture Conditions in *Liquidambar orientalis*

 İlker KAYA<sup>1,\*</sup>,  Senem UĞUR<sup>1</sup>,  Yeşim YALÇIN MENDİ<sup>1</sup>

#### Özet

Anadolu sığılası (*Liquidambar orientalis*), Güney Batı Anadolu'ya özgü endemik sığla türüdür. Genel olarak peyzaj bitkisi olarak kullanımının yanı sıra içeriğinde bulunan reçine sebebiyle de büyük önem taşımaktadır. Sığla bitkisinde tohum ve çelik ile üretime ek olarak, doku kültüründe de hızlı ve klonal çoğaltımda daha verimli, daha kaliteli materyal oluşturulması için çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmada, *Liquidambar orientalis* için uygun sterilizasyon yönteminin ve uygun büyüme ortamının belirlenmesi amaçlanmıştır. Sterilizasyon için HgCl<sub>2</sub> (%0.1), NaClO (%20) ve fungusit (Captan, %0.3) solusyonlarının çeşitli süre ve yoğunluk kombinasyonları denenmiş, en iyi sterilizasyon yüzdesi (%97); 48 saat fungusit (Captan, %0.3)+10 dakika HgCl<sub>2</sub> (%0.1)+20 dakika NaClO (%20) kombinasyonundan elde edilmiştir. Thidiazuron (TDZ) ve Naftalin Asetik Asit (NAA)'in bitki gelişimi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla, TDZ ve NAA'nın farklı kombinasyonları denenmiş ve en iyi gelişimin 1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ ve 0.1 mg.l<sup>-1</sup> NAA içeren WPM besi ortamında olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mikroçoğaltım, Naftalin asetik asit, Süs bitkileri, Thidiazuron

#### Abstract

Anatolian Sweetgum (*Liquidambar orientalis*) is an endemic sweetgum species native to Southwest Anatolia. In addition to its general use as a landscape plant, it holds significant importance due to the resin it contains. Beyond traditional propagation methods such as seed and cutting, research is being conducted on the use of tissue culture to produce more efficient and higher-quality material through rapid and clonal multiplication of the sweetgum plant. In this study, we aimed to determine the appropriate sterilization method and suitable growth medium for *Liquidambar orientalis*. Various combinations of HgCl<sub>2</sub> (0.1%), NaClO (20%), and fungicide (Captan, 0.3%) solutions with different durations and concentrations were tested for sterilization. The highest sterilization rate (97%) was achieved with a combination of 48 hours of fungicide (Captan, 0.3%) + 10 minutes of HgCl<sub>2</sub> (0.1%) + 20 minutes of NaClO (20%). To investigate the effects of Thidiazuron (TDZ) and Naphthalene Acetic Acid (NAA) on plant growth, different combinations of TDZ and NAA were tested, and the best growth was observed in WPM medium containing 1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ and 0.1 mg.l<sup>-1</sup> NAA.

**Keywords:** Micropropagation, Naphthaleneacetic acid, Ornamental plants, Thidiazuron

## 1. Giriş

Altingiaceae familyasında olan sığla ağacı, günümüzde doğal olarak sadece Anadolu, Amerika ve Çin’de yayılış gösteren Liquidambar cinsine ait türlerin ortak adıdır. Anadolu sığlası olarak da adlandırılan *Liquidambar orientalis* Miller (Anadolu Sığla Ağacı; Hamamelidaceae), ekolojik ve ekonomik açıdan önemli relict (Eski jeolojik dönemlerden kalma) endemik bir tür olup, Kuzey Amerika'dan Doğu Asya'ya kadar uzanan geniş bir coğrafi alana yayılmaktadır (Hoey ve Parks, 1991). Orman ağaçları arasında ender görülen bir özellik olan türün doğal olarak reçine üretmesi de *L. orientalis*'i ekonomik açıdan önemli kılmaktadır (Taşkın ve ark., 2007). *L. orientalis*'e ek olarak sığlanın dünya genelinde yaklaşık aynı enlemlerde (kuzey yarım küre) Amerika (*L. macrophylla* ve *L. styraciflua*) ve Asya (*L. edentata* ve *L. formosana*)’da 4 türü daha vardır (Ickert-Bond ve ark., 2005)

Relikt ve endemik olmasının yanı sıra sığla ağacı, yağındaki tarçın asidi, styrojanin, stresinol, styrol ve stacin gibi maddeleri içermesiyle sabun, parfümeri, kimya ve ilaç endüstrisinde oldukça geniş yer bulmaktadır. Günümüzde eczacılıkta parazit söktürücü ve iyi bir antiseptik olarak kullanılan sığla yağının, iyileştirici, cilt yumuşatıcı ve iltihap giderici etkileri bulunmaktadır. Ayrıca bu türün yetiştiği bölgelerde yaşayan halk tarafından özellikle mide ile ilgili rahatsızlıklarda kullanılmaktadır (Arslan ve Şahin, 2016).

Günlük ağacı olarak da isimlendirilen *L. orientalis*'in, dekoratif yaprakları dikkat çekici olup, kışın yaprağını dökmesi ve yaklaşık 20 m kadar boylanması ile gerek dış mekân süs bitkileri açısından gerekse sağlık, ekonomik ve kültürel açıdan önemi çok büyüktür (Akat, 2020). *L. orientalis* bitkisinin gövdelerinden alınan balsamlar parfümeri sanayisinde kullanılmakta olup, sığla yağı denen bu balsamlar, ülkemizin dış satım ürünüdür. Bitkinin kabuklarının alınması ile oluşan bu balsamlar, güzel koku olarak kullanıldığı gibi bu kabukların yakılması ile buhur olarak, ayrıca romatizmalarda, kabızlıkta ve idrar söktürücü olarak kullanılmaktadır (Aydingöz ve Bulut, 2014).

Sığla ormanlarının 1947 yılında yapılan toplam saha çalışması ile yaklaşık 7.000 ha alanı kaplarken, 1949 yılında 6.312, 1987 yılında bu rakamın 1.337, 2016’da ise 1.417 ha alana düştüğü görülmektedir (Arslan ve Şahin, 2016). Orman Genel Müdürlüğü Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü idaresinde, deneme alanı, tohum üretim alanı ve gen koruma alanı olmak üzere, toplamda yaklaşık olarak 360 hektar Anadolu sığla tesisi bulunmaktadır. Sığla ormanları günümüzde yaşlı, yıpranmış ve ıslaha ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle türün çoğaltımının önemi günden güne artmaktadır.

Yirminci yüzyılın başından bu yana, *L. orientalis* ormanlarının toplam alanında gerilemeler dikkati çekmektedir. Bu gerilemenin nedenleri arasında yağ çıkarımı için ağaçların aşırı zarar görmesi, ormanlık alanlarda turizmin gelişimi, orman yangınları, barınma ve tarım amaçlı olarak kullanım, sulak alanların kurutulması ve yetersiz koruma stratejileri sayılabilir (Taşkın ve ark., 2007; Küçükala ve ark., 2010). *L. orientalis*'in ve genetik mirasının gelecek nesiller için korunması ve sürdürülebilirliğinin sağlanmasına yönelik çözüm önerileri büyük önem taşımaktadır.

Süs bitkisi sektörünün dünyada ve ülkemizdeki önemi gün geçtikçe artarken, süs bitkilerinin çoğaltımı ve koruma altına alınması amacıyla şüphesiz biyoteknolojik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Geleneksel üretim yöntemlerinin doku kültürü yöntemine oranla çok daha yavaş olmasından dolayı, doku kültürü ile çoğaltım günden güne önem kazanmıştır (Parlak, 2012).

Bu çalışmada, *L. orientalis* türüne ait bitkilerde uygun sterilizasyon yönteminin belirlenmesi ve doku kültüründe etkili çoğaltım ortamının optimizasyonu amaçlanmaktadır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada, bitkisel materyal olarak Çukurova Üniversitesi Balcalı kampüsünde yer alan ve dış mekân bitkisi olarak değerlendirilen *L. orientalis* genotipleri kullanılmıştır (Şekil 1 ve şekil 2).



**Şekil 1.** *L. orientalis* türü; A) Çukurova Üniversitesi kampüsünden bitkinin genel görünümü, B) Sürgün, C) Meyve kapsülü (Orijinal: Kaya, İ.).



Şekil 2. A) *L. orientalis* Sürgün, B) Örnek alımı, C) Alınan örnekler (Original: Kaya, İ.).

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Bitkisel Materyalin Sterilizasyonu

*L. orientalis* genotiplerinden temin edilmiş taze sürgün uçlarının laboratuvar ortamında yüzey sterilizasyonu sağlanmıştır. Bu amaçla HgCl<sub>2</sub> (%0.1), NaClO (%10) ve fungusit (Captan, %0.3)'in Çizelge 1'de verilen kombinasyonları kullanılmıştır.

Çizelge 1. Yüzey sterilizasyonunda kullanılan deneme kombinasyonu.

NaClO	HgCl <sub>2</sub>	Fungusit (Captan)		
		0 saat	24 saat	48 saat
10 dk	0 dk	+	+	+
	10 dk	+	+	+
	15 dk	+	+	+
	20 dk	+	+	+
20 dk	0 dk	+	+	+
	10 dk	+	+	+
	15 dk	+	+	+
	20 dk	+	+	+
30 dk	0 dk	+	+	+
	10 dk	+	+	+
	15 dk	+	+	+
	20 dk	+	+	+

Sığla bitkisinin sürgünleri, 3 farklı fungusit (0, 24 ve 48 saat) uygulamasından sonra antibakteriyel sıvı sabunda 10 dakika yıkanarak, musluk suyu altında durulanmıştır. Daha sonra çeker ocak içine alınan örnekler, 0, 10, 15 ve 20 dakika % 0.1'lik HgCl<sub>2</sub>'de bekletildikten sonra steril saf su ile durulama işlemi yapılmıştır. Bu uygulamalardan sonra sonra laminar akımlı steril kabin içerisinde %70'lik EtOH'de 3 dakika bekletilmiştir. Steril saf su ile durulama sonrasında, birkaç damla Tween 20 eklenmiş %10'luk Sodyum Hipoklorit (NaClO) içerisinde 10, 20 ve 30 dakika bekletildikten sonra steril saf su ile 3 kez durulama yaparak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

### 2.2.2. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri Kurulması

Katı kültür mikroçoğaltım denemesinde, NAA (0, 0.1 ve 0.5 mg.l<sup>-1</sup>)'nin TDZ (0, 1 ve 2 mg.l<sup>-1</sup>) kombinasyonları ile 30 g.l<sup>-1</sup> sakkaroz, 7.5 g.l<sup>-1</sup> agar içeren WPM (Woddy Plant Medium) ortamı kullanılmıştır. Besi ortamının pH'sı 5.7'e ayarlandıktan sonra, otoklavda 121°C sıcaklıkta 1.05 atmosfer basınç altında 15 dakika süresince steril edilmiştir. Kültüre alınan bitkiler, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyot gösteren 25±2 °C sıcaklık koşullarında iklimlendirme odasında bırakılmıştır. Dört haftada bir olacak şekilde toplamda 3 kez alt kültüre alınmıştır.

### 2.2.3. Deneme Planı, İstatistik Analizleri ve İncelenen Kriterler

*L. orientalis* türü ile kurulan denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Bitkisel materyalin yüzey sterilizasyonu ve mikroçoğaltım denemeleri 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 5 sürgün kültüre alınarak gerçekleştirilmiştir. Deneme sonucunda; yüzey sterilizasyonunda steril bitki oranı (%), mikroçoğaltım denemelerinde ise kallus oranı (%), bitki boyu (cm), yaprak sayısı (kardeş/bitki) ve kök oranı (%) parametrelerine ait gözlemler alınmıştır. İstatistiksel analizler, JMP 17.2.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. Yüzey sterilizasyonu bulguları

Sıgla türünün sürgünlerine uygulanan sterilizasyon denemeleri sonucunda, 48 saat fungusitte bekletildikten sonra 20 dk. NaClO + 10 dk HgCl<sub>2</sub> uygulanan sürgünlerde %97 oranında başarı elde edilmiştir. %0 (sıfır) ile gösterilen bitkiler ölmüştür. Parantez içerisinde belirtilen değerler açı transformasyonu değerleridir (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** Yüzey sterilizasyonunda elde edilen sağlam sürgün oranları.

NaClO	HgCl <sub>2</sub>	Steril Bitki Oranı (%)		
		Fungusit (Captan)		
		0 saat	24 saat	48 saat
10 dk	0 dk	53 (46.7)y	58 (49.6)w	64 (53.1)t
	10 dk	69 (56.2)r	72 (58.1)q	78 (62.0)n
	15 dk	85 (67.2)j	91 (72.5)e	94 (75.8)c
	20 dk	0 (0.0)z	0 (0.0)z	0 (0.0)z
20 dk	0 dk	55 (47.9)x	61 (51.4)v	81 (64.2)l
	10 dk	75 (60.0)o	82 (64.9)k	<b>97 (80.0)a</b>
	15 dk	86 (68.0)ı	89 (70.6)g	95 (77.1)b
	20 dk	0 (0.0)z	0 (0.0)z	0 (0.0)z
30 dk	0 dk	62 (51.9)u	67 (54.9)s	73 (58.7)p
	10 dk	79 (62.7)m	88 (69.7)h	90 (71.6)f

	15 dk	89 (70.6)g	91 (72.5)e	93 (74.7)d
	20 dk	0 (0.0)z	0 (0.0)z	0 (0.0)z
<b>Ortalama</b>		54.4 (44.3)	58.3 (47.0)	63.8 (51.4)

LSD<sub>sterilizasyon</sub>: 0.38\*\*\*

### 3.2. Kallus Oluşum Bulguları

*L. orientalis* türünde elde edilen kalluslar üzerinde, 7. haftadan itibaren sürgün oluşmaya başlamıştır. Elde edilen kallus yapıları, yeşil-mor renkli ve kompakt yapıdadır. Sürgünlerden oluşan kallus oluşum oranlarına besi yerlerinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kallus gelişim oranları, en yüksek 0.1 mg.l<sup>-1</sup> NAA+2 mg.l<sup>-1</sup> TDZ, 0.5 mg.l<sup>-1</sup> NAA+1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ ve 0.5 mg.l<sup>-1</sup> NAA+2 mg.l<sup>-1</sup> TDZ ile %100 olarak elde edilmiştir. En düşük kallus oranı ise kontrol yani bitki büyüme düzenleyici içermeyen besiyerinde %25 olarak elde edilmiştir (Çizelge 3).

**Çizelge 3.** Deneme sonucu elde edilen kallus oluşturma oranları.

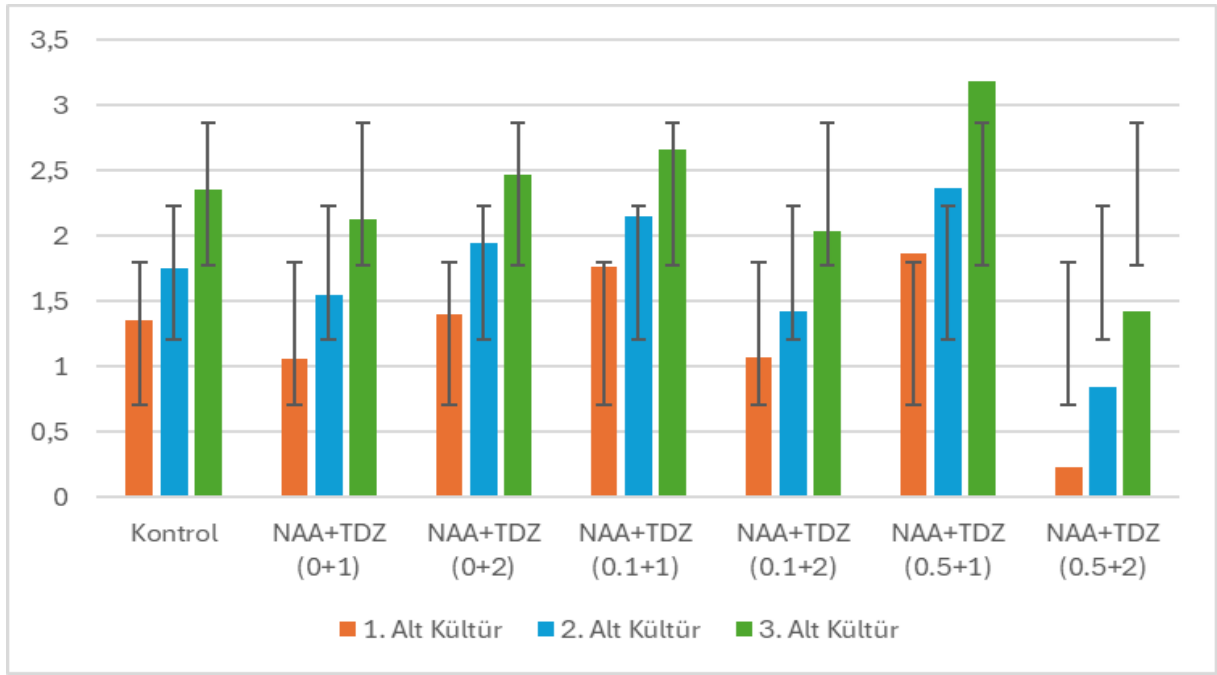
<b>BBD (mg.l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Kallus Oranı (%)</b>
Kontrol	25 (30.0)e
NAA+TDZ (0+1)	45 (42.1)d
NAA+TDZ (0+2)	85 (67.2)c
NAA+TDZ (0.1+1)	95 (77.1)b
NAA+TDZ (0.1+2)	<b>100 (90.0)a</b>
NAA+TDZ (0.5+1)	<b>100 (90.0)a</b>
NAA+TDZ (0.5+2)	<b>100 (90.0)a</b>

LSD<sub>BBD</sub>: 1.15\*\*\*

\*Parantez içerisinde belirtilen değerler açılı transformasyonu değerleridir.

### 3.3. Mikroçoğaltım Sürgün Bulguları

*L. orientalis* türünde üç alt kültür yapılmıştır. En yüksek sürgün gelişimi NAA+TDZ (0.5+1 mg.l<sup>-1</sup>) bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunda görülürken, en düşük sürgün gelişimi NAA+TDZ (0.5+2 mg.l<sup>-1</sup>) kombinasyonunda görülmüştür (Şekil 3 ve çizelge 4).



**Şekil 3.** Alt kültürler arası sürgün gelişimleri ve bitki büyüme düzenleyicilerin sürgün gelişimleri üzerindeki etkisi

**Çizelge 4.** Deneme sonucu elde edilen sürgün boyu, yaprak sayısı ve kök oranı verileri

BBD (mg.l <sup>-1</sup> )	Bitki Boyu (cm)	Yaprak Sayısı (adet)	Kök Oranı (%)
Kontrol	2.35d	5.27a	100 (90.0)a
NAA+TDZ (0+1)	2.13e	0.6e	65 (53.7)d
NAA+TDZ (0+2)	2.47c	2.0c	68 (55.6)b
NAA+TDZ (0.1+1)	2.66b	1.3d	53 (46.7)g
NAA+TDZ (0.1+2)	2.04f	0.5e	60 (50.8)f
NAA+TDZ (0.5+1)	<b>3.18a</b>	3.83b	63 (52.5)e
NAA+TDZ (0.5+2)	1.42g	0.2e	67 (54.9)c

LSD<sub>bitki boyu</sub>: 0,01\* LSD<sub>yapraksayısı</sub>: 0,67\* LSD<sub>kök oranı</sub>: 0,66\*

\*Parantez içerisinde belirtilen değerler açış transformasyonu değerleridir.

*L. orientalis* ile yapılan direkt organogenesis çalışmalarında, BAP (0, 1, 2, 3 mg.l<sup>-1</sup>), NAA (0, 0.05, 0.10, 0.15 mg.l<sup>-1</sup>) ve IBA (0, 0.01, 0.05, 0.10 mg.l<sup>-1</sup>)'nin farklı kombinasyonlarını içeren WPM besi ortamı kullanılmış, ortalama %76.64 ile en yüksek sürgün oluşturan eksplant oranı, 0.10 mg.l<sup>-1</sup> NAA + 3.0 mg.l<sup>-1</sup> BAP içeren WPM ortamında kültüre alınan hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir. Eksplant başına, 32.20 sürgün/eksplant ile en yüksek ortalama kardeş sayısı, 0.10 mg.l<sup>-1</sup> IBA + 1.00 mg.l<sup>-1</sup> BAP ilave edilmiş WPM içeren ortamda kültüre alınan hipokotil eksplantlarında tespit edilmiştir. WPM besin ortamında kültüre alınan hipokotil eksplantları için en uygun kombinasyonun 0.05 mg.l<sup>-1</sup> NAA'in 1.0 veya 2.0 mg.l<sup>-1</sup> BAP ile kombinasyonunu içeren ortamdan elde edildiği görülmüştür (Acar ve ark., 2018).

*L. styraciflua* üzerinde yapılan denemelerde ise, 6 hafta süreyle 0.1 mg.l<sup>-1</sup> NAA ve 2.5 mg.l<sup>-1</sup> BA uygulaması yapılmış ve yapraktan direkt organogenesis ile sürgün elde edildiği gözlenmiştir (Brand ve Lineberger, 1991).

*L. styraciflua*'da yapraktan direkt embriyogenesis çalışmalarında en yüksek embriyogenesisin 0.1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ ile gerçekleştiği görülmüştür (Merkle, 1998). *L. orientalis*'te en verimli mikro çoğaltma yönteminin araştırılması için yapılan çalışmalarda, aksiller tomurcuklardan izole edilen primordial sürgün eksplantları kullanılmıştır. MS ve WPM temel besi ortamı olarak; BAP (0, 0.5, 1, 2 mg.l<sup>-1</sup>) ve IBA (0, 0.5, 1, 2 mg.l<sup>-1</sup>)'nin kombinasyonları kullanılmıştır. Çalışmalar sonucunda, 1 mg.l<sup>-1</sup> BAP ve 1 mg.l<sup>-1</sup> IBA içeren WPM ortamından, eksplant başına 20 sürgün elde edilmiştir (Bayraktar ve ark. 2015). *L. orientalis*'te, direkt organogenesis ile mikroçoğaltım üzerine denemeler yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, NAA (0, 0.54 µM) ve BAP (2.2, 4.4, 11.1, 22.2 µM) hormonlarını içeren WPM ortamı kullanılmıştır. En iyi sürgün ortalaması (19.97), 0.54 µM NAA ve 11.1 µM BAP içeren kombinasyonda gözlemlenmiştir (Erdağ ve Emek, 2005).

*L. orientalis*'de direkt organogenesis yöntemi ile mikroçoğaltım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, BA (0, 0.1, 0.5, 1, 2 mg.l<sup>-1</sup>) ve NAA (0.05, 0.2, 0.5 mg.l<sup>-1</sup>)'nin farklı konsantrasyonlarını içeren WPM besi ortamı kullanılmış ve en iyi sonuç 1 mg.l<sup>-1</sup> BA ve 0.05 mg.l<sup>-1</sup> NAA içeren WPM ortamında belirlenmiştir (Sutter ve Barker, 1985). *L. styraciflua* ile yapılan çalışmalarda, direkt organogenesis yöntemi kullanılmıştır. TDZ (0.01, 0.05, 0.1 0.5, 1 mg.l<sup>-1</sup>) ve 2,4-D (0.01 mg.l<sup>-1</sup>) kombinasyonlarını içeren WPM besi ortamı denenmiş, en iyi sonuç (20 adet/eksplant), 1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ ve 0.01 mg.l<sup>-1</sup> 2,4-D içeren ortamda elde edilmiştir (Kim ve ark., 1997). *L. styraciflua*'da direkt organogenesis çalışmasında, BAP (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1 mg.l<sup>-1</sup>) ve IBA (0, 0.01 mg.l<sup>-1</sup>) kombinasyonlarını içeren WPM ortamı kullanılmıştır. Çalışmalar sonucunda, en iyi kardeşlenme ortalaması (5.9 adet/eksplant), 0.7 mg.l<sup>-1</sup> BAP ve 0.01 mg.l<sup>-1</sup> IBA içeren WPM ortamında gözlemlenmiştir (Đurkovič ve Lux, 2010). Yaptığımız çalışmada, araştırmacıların sonuçlarıyla benzer olarak TDZ+NAA kombinasyonlarının kullanımının etkileri incelenmiştir.

*L. formosana*'da somatik embriyogenesis çalışması yapılmıştır. NAA (0, 0.054, 0.27, 0.54 µM) ve TDZ (0, 0.45, 2.27, 4.54 µM)'nin kombinasyonlarını içeren WPM besi ortamında denemeler yürütülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda, 0.27 µM NAA ve 2.27 µM TDZ içeren ortamdan, %78.5 oranında yapraktan sürgün oluşumu elde edilmiştir (Xu ve ark., 2007). Bu çalışmamızda, NAA ve TDZ'nin farklı kombinasyonları (NAA + TDZ: 0+1, 0+2, 0.1+1, 0.1+2, 0.5+1, 0.5+2 mg.l<sup>-1</sup>) denenmiştir. En iyi bitki boyu gelişimi (3.18 cm), NAA + TDZ (0.5+5 mg.l<sup>-1</sup>)'nin kombinasyonundan gözlenmiştir.

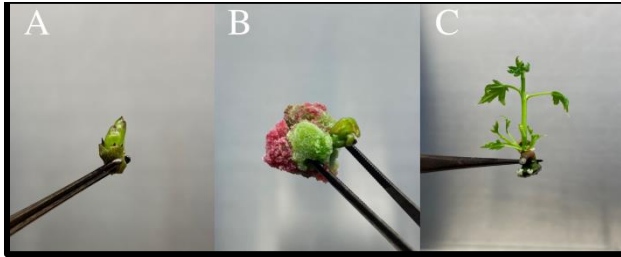


*L. orientalis* bitkisinin mikroçoğaltımında, RITA biyoreaktör sistemi ve yarı-katı kültürler denenmiştir. Yapılan çalışmada, yarı-katı ½ MS ve WPM besi ortamları kullanılmıştır. Ortamların ikisinde de kontrol ve 0.2 mg.l<sup>-1</sup> BAP + 0.05 mg.l<sup>-1</sup> NAA ilave edilmiş olarak denemeler kurulmuş, en iyi sonucun kontrol bitkilerinden elde edildiği gözlemlenmiştir. RITA Biyoreaktör sisteminde ise en iyi sürgün oluşturan ortam, 0.2 mg.l<sup>-1</sup> BAP ve 0.05 mg.l<sup>-1</sup> NAA içeren WPM ortamı olmuştur (Baran Ayaz, 2018). Yaptığımız çalışmada ise elde edilen sonuçlar benzerlik göstermiştir. Yaprak sayısı ve kök oluşum oranları, kontrol ortamında en yüksek başarıyı göstermiştir.

Relikt-endemik bir tür olan *L. orientalis* Mill'in mikroçoğaltımı üzerinde farklı bor tuzlarının etkilerini araştırılmışlar ve mikro sürgünlerin genetik stabilitesini ISSR markör tekniği ile belirlemişlerdir (Mercan ve ark., 2022).

#### 4. Sonuçlar

Endemik bir tür olan *Liquidambar orientalis*'te, sterilizasyon ve mikroçoğaltımda farklı denemeler kurularak optimum protokol oluşturulmuştur. Denemeler sonucunda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.



**Şekil 3.** *L. orientalis* bitkisine ait; A) Steril edilmiş sürgün ucu, B) Kallus yapısı, C) Elde edilen sürgün (Orijinal: Kaya, İ.).

En yüksek canlı sterilizasyon başarıları, %97 oran ile fungusit (Captan, 48 saat) + HgCl<sub>2</sub> (10 dk.) + NaClO (20 dk.) kombinasyonundan elde edilmiştir. Ancak fungusit (Captan, 48 saat) + NaClO (20 dk.) kombinasyonunda %81 oranında sterilizasyon başarıları elde edilmiştir. Daha az kimyasal kullanımı sebebiyle bu oran *Liquidambar orientalis* için yeterli bir başarı oranı olarak kabul edilebilir.

En fazla bitki kaybı, %86 oranında olup fungusit (Captan, 48 saat) + HgCl<sub>2</sub> (20 dk.) + NaClO (30 dk.) kombinasyonunda görülmüştür.

Kallus gelişimi incelendiğinde, %100 kallus gelişimi görülmüş olup, kallus gelişimi için en uygun ortam kombinasyonu olarak; NAA + TDZ (0.1 + 2 mg.l<sup>-1</sup>), NAA + TDZ (0.5 + 1 mg.l<sup>-1</sup>) ve NAA + TDZ (0,5 + 2 mg.l<sup>-1</sup>) belirlenmiştir.

Sürgün gelişimine bakıldığında, 1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 0.1 mg.l<sup>-1</sup> NAA kombinasyonunda, 1.87 cm ortalama sürgün uzunluğu elde edilmiştir.

Oluşan yaprak sayılarının ortalamasına bakıldığında 3.83 adet ile en yüksek yaprak sayısı 1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 0.1 mg.l<sup>-1</sup> NAA kombinasyonunda elde edilmiştir.

Kök gelişimi oranı en yüksek olarak kontrolde görülmüş olup, tüm eksplantlarda kök gelişimi olmuştur. Bununla birlikte kontrolden sonraki en iyi kök gelişimi NAA + TDZ (0 + 2 mg.l<sup>-1</sup>) kombinasyonunda (%68) gözlenmiştir.

Tüm bu veriler incelendiğinde, *Liquidambar orientalis* için en uygun büyüme ortamının “1 mg.l<sup>-1</sup> TDZ + 0.1 mg.l<sup>-1</sup> NAA” içeren WPM ortamı olduğu belirlenmiştir.

### **Teşekkür**

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

## Kaynakça

- Acar, Y. S., Ayaz, Ö., ve Bürün, B. (2018). Adventitious shoot formation from hypocotyl and cotyledon explants of relict endemic *Liquidambar orientalis* Miller. *Mugla Journal of Science and Technology*, 4(2), 137-142.
- Akat, H. (2020). Su Tutucu Polimer (SAP) Uygulamalarının Anadolu Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis* MILL.) ve Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Türlerinde Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(3), 721-727.
- Arslan, M., ve Şahin, H. (2016). Unutulan Bir Orman Ürünü Kaynağı: Anadolu Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis* Miller). *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 18(1), 103-117.
- Aydınöz, M., ve Bulut, S. (2014). Egenin Gizli Kalmış Şifa İksiri: Sığla (012201)(1-6). *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 14(1), 1-6.
- Baran Ayaz, Ö. (2018). *Türkiyedeki endemik sığla ağacının (Liquidambar orientalis Mill.) geçici daldırma sistemi ile mikroçoğaltımının araştırılması*. (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Bayraktar, M., Hayta, S., Parlak, S., ve Gurel, A. (2015). Micropropagation of centennial tertiary relict trees of *Liquidambar orientalis* Miller through meristematic nodules produced by cultures of primordial shoots. *Trees*, 29(4), 999-1009.
- Brand, M. H., ve Lineberger, R. D. (1991). The effect of leaf source and developmental stage on shoot organogenic potential of sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.) leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24(1), 1-7.
- Đurkovič, J., ve Lux, A. (2010). Micropropagation with a novel pattern of adventitious rooting in American sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.). *Trees*, 24, 491-497.
- Erdağ, B., ve Emek, Y. (2005). In vitro adventitious shoot regeneration of *Liquidambar orientalis* Miller. *Journal of Biological Sciences*, 5(6), 805-808.
- Göçmen Taşkın, B., Taşkın, V., Küçükakyüz, K., ve Varol, K. (2007). Esterase polymorphisms in relict endemic *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis* and *L. orientalis* Mill. var. *integriloba* Fiori populations in Turkey. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6, 137-146.
- Hoey, M. T., ve Parks, C. R. (1991). Isozyme divergence between Eastern Asian, north American, and Turkish species of *Liquidambar* (Hamamelidaceae). *American Journal of Botany*, 78(7), 938-947.
- Ickert-Bond, S., K., P., ve Wen, J. (2005). Comparative infructescence morphology in *Liquidambar* (Altingiaceae) and its evolutionary significance. *American Journal of Botany*, 92(8): 1234-1255.
- Kim, M. K., Sommer, H. E., Bongarten, B. C., ve Merkle, S. A. (1997). High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. *Plant Cell Reports*, 16, 536-540.
- Küçükala, A., Durmuşkahya, C., ve Koray, Z. (2010). Sığla Ağacının Korunmasına Yönelik Eğitim Çalışmaları Projesi Sonuç Raporu. *ÖÇ KK Başkanlığı, Ankara*.

- Mercan, T., Galatalı, S., Özkaya, D. E., Celik, O., ve Kaya, E. (2022). Effects of different boron salt treatments on micropropagation and genetic stability in in vitro cultures of *Liquidambar orientalis* Miller. *Journal of Boron*, 7(4), 521-527.
- Merkle, S. A., Neu, K. A., Battle, P. J., ve Bailey, R. L. (1998). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature and mature tissues of sweetgum (*Liquidambar styraciflua*). *Plant Science*, 132(2), 169-178.
- Parlak, S. (2012). Sığla (*Liquidambar orientalis* Miller)'da alternatif vejetatif üretim yöntemi. *Orman Mühendisliği*, 49(10-1 1-1 2): 20-23.
- Sutter, E. G., ve Barker, P. B. (1985). In vitro propagation of mature *Liquidambar styraciflua*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, 13-21.
- Xu, L., Liu, G. F., ve Bao, M. Z. (2007). Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of formosan sweetgum (*Liquidambar formosana* L.). *HortScience*, 42(3), 721-723.