



Tissue Culture Studies in Olive Plants on the World and Turkey[#]

Zeliha Çiftçi^{1,a,*}, Mizgin Ay^{1,b}, Ebru Sakar^{1,c}

¹Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Harran University, 63000 Şanlıurfa, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>[#]This study was presented as an oral presentation at the 1st International Congress of the Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology (Antalya, TURJAF 2019)</p> <p><i>Review Article</i></p> <p>Received : 24/11/2019 Accepted : 03/01/2020</p> <p>Keywords: Olive Micropropagation In vitro Zeatin IBA</p>	<p>Known as the world's most healthy and natural source of vegetable oil, the history of olives dates back to 10,000 years ago. The homeland of olives, a member of the Oleacea family, is Upper Mesopotamia and Southern Asia, including Southeastern Anatolia and Syria. Olives, BC It started to be cultivated on the eastern shores of the Mediterranean in the year 3000 and is one of the first fruit species cultivated in the Mediterranean region. In this respect, olive has an important place in the economy, nutrition and culture of Mediterranean countries. Currently, in most olive growing countries, olive, leafy stem or cuttings are rooted or by propagating stem shoots from seed or clonal stem. However, the so-called table olives are very difficult or completely impossible to root. The olives, which are very difficult to root, should be supported with biotechnological approaches such as micropropagation method in order to increase the product productivity. So far, many fruit species have been propagated <i>in vitro</i> using tissue culture methods and at the same time, some olive varieties have been successfully propagated by micro-propagation method. It made in tissue culture in the world and Turkey Olives have been compiled resources to work for the researchers in this study.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(3): 645-650, 2020

Dünyada ve Türkiye’de Zeytinde Yapılan Doku Kültürü Çalışmaları

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Derleme Makale</i></p> <p>Geliş : 24/11/2019 Kabul : 03/01/2020</p> <p>Anahtar Kelimeler: Zeytin Mikroçoğaltım In Vitro Zeatin IBA</p>	<p>Dünyanın en sağlıklı ve doğal bitkisel yağ kaynağı olarak bilinen zeytinin tarihi 10.000 yıl öncesine dayanmaktadır. Oleacea familyasının bir üyesi olan zeytinin anavatanı Güneydoğu Anadolu ve Suriye de içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Asya’dır. Zeytin, M.Ö. 3000 yılında Akdeniz’in doğu kıyılarında kültüre alınmaya başlamıştır ve Akdeniz bölgesinde kültüre alınan ilk meyve türlerinden biridir. Bu bakımdan zeytin, Akdeniz ülkelerinin ekonomisinde, beslenmesinde ve kültüründe önemli bir yere sahiptir. Şu anda zeytin yetiştiriciliği yapan ülkelerin çoğunda zeytin, yapraklı gövde veya çeliklerin köklendirilmesiyle veya gövde filizlerinin, tohumdan gelişen ya da klonal gövdelere aşılmasıyla çoğaltımı sağlanmaktadır. Ancak, bununla beraber, sofralık zeytin olarak adlandırılan çeşitlerin köklenmesi çok zor veya tamamen imkansızdır. Köklenmesi çok zor olan zeytinin ürün verimliliğinin artırılması amacıyla, geleneksel yöntemlerin, kısa zamanda ve kolay bir şekilde ticari olarak yüksek miktarlarda bitkinin çoğaltılmasını sağlayan mikro çoğaltım yöntemi gibi biyoteknolojik yaklaşımlarla desteklenmesi gerekmektedir. Şimdiye kadar pek çok meyve türü doku kültürü yöntemleri kullanılarak <i>in vitro</i> çoğaltılmış ve aynı zamanda bazı zeytin çeşitlerinin mikro çoğaltım yöntemi ile başarılı bir şekilde çoğaltılması sağlanmıştır. Bu çalışma, bazı zeytin çeşitlerinin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak çoğaltımı için günümüze kadar Dünyada ve Türkiye’de uygulanan farklı yöntemler son literatür çalışmaları da göz önünde bulundurularak bu alanda çalışacak araştırmacılara kaynak olması amacıyla derlenmiştir.</p>

^a zelihaciftci63@hotmail.com
^c ebru.sakar09@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-8511-5637> | mzgnyay47@gmail.com
^b <https://orcid.org/0000-0001-6622-6553>

^b <https://orcid.org/0000-0002-6561-6071>



Giriş

Zeytin *Oleaceae* familyasının *Olea* cinsine dahil bir meyve türüdür (Flahault, 1986; Moretteni, 1972). *Olea* cinsi çok sayıda tür ve alt türleri içermekte olup, bunların çoğu çalı formundadır. Ekonomik değeri en yüksek olan tür *Olea europaea*'dır (Baldoni ve ark., 2006). Zeytin, M.Ö. 3000 yıllarında Akdeniz'in doğu kıyılarında kültüre alınmaya başlamış ve Akdeniz bölgesinde kültüre alınan ilk meyve türlerindendir (Zohary ve Spiegel-Roy, 1975). Zeytin, dünyanın belirli bölgelerinde ekolojik açıdan kendine uygun yaşam alanları bulmuştur. Genel olarak Kuzey ve Güney yarım kürenin 30°-45° enlemleri arasındaki bölge zeytinin üretim kuşağı olarak nitelendirilmektedir (Rallo ve ark., 1997).

Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin bir bölümünü ve Suriye'yi de içine alan Mezopotamya'nın yukarı kısımları ile Asya'nın güneybatısında yetiştirilen zeytin (*Olea europaea* L.), dünyada kültüre alınan en eski türlerdendir. Zeytinin kültüre alınmasının 5500 yıl önce "Oleaster" olarak bilinen yabancı Akdeniz zeytininin, Güney Avrupa ve Kuzey Afrika boyunca yayılmaya başlayan insan göçlerini takip ederek başladığı düşünülmektedir (Besnard ve ark., 2001). Bu nedenle zeytin özellikle Akdeniz toplumunun beslenmesinde, ekonomisinde ve kültüründe önemli bir role sahiptir (Zamorave ark., 2001).

Zeytinin kültüre alındığı ülkelerde (başta İspanya, İtalya ve Türkiye olmak üzere) morfolojik olarak birbirine benzer (sinonim) çok sayıda zeytin çeşidi bulunması ve bu çeşitlerin belirlenmesinde karşılaşılan sorunlar, genetik kaynaklar işletmeciliği ve korunmasında birçok sorunun ortaya çıkmasına neden olmuş (Carriero ve ark., 2002), bu nedenle zeytin genetik kaynaklarının hızlı, güncel moleküler teknikler ile etkin bir biçimde karakterizasyonu ve çoğaltımı çok önemlidir. Şu anda zeytin yetiştiriciliği yapan ülkelerin çoğunda zeytin, yapraklı gövde veya çeliklerin köklendirilmesiyle veya gövde filizlerinin, tohumdan gelişen ya da klonal gövdelere aşılama ile çoğaltımı sağlanmaktadır (Fabbri ve ark., 2004). 1950 yıllarının ortalarında çelikle çoğaltım tekniği özellikle İspanya gibi aşılama yönteminin kullanılmadığı ülkelerde yaygınlaşmış olup üretim materyalinin %70'ten fazlasının kaynağı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, bununla beraber, sofralık zeytin olarak adlandırılan çeşitlerin köklenmesi çok zor veya tamamen imkânsızdır. Ayrıca, de novo olarak oluşan kökler sıklıkla işlevsel değildir. Bu sebeple genotiplerin klonal çoğaltımı amacıyla aşılama en uygulanabilir yöntem olarak görülmektedir. Günümüze kadar, morfolojik açıdan, yüksek derecede benzer olmayan binlerce zeytin genotipi kültüre alınmıştır. Bununla birlikte, bu çeşitlerin üretiminin gelecekte devamlılığını sağlamak için yapılan uygulamalar sınırlayıcı bazı problemlerinin (verimliliğin düşük, üretim maliyetinin fazla olması gibi) çözülmesi gereklidir (Rugini ve Caricato, 1995).

Zeytinde klasik ıslah çalışmaları, zeytin ağacının uzun süren olgunlaşma evresi, zor meyve tutumu ve düzensiz tohum çimlenme oranları nedeniyle önemli ölçüde başarılı olamamıştır. Zeytinde olgunlaşma evresinin uzun oluşu ve segregasyon yoluyla özellik kayıpları yaşanması nedeniyle tohumdan fidan eldesi tercih edilen bir üretim şekli değildir (Acebedo ve ark., 1997). Yaygın olarak kullanılan

çelikleme yoluyla üretimde ise genellikle tek bir bireyin klonları oluşturularak genetik çeşitlilik azalmaktadır. Bunun sonucunda genetik yapıları tamamıyla aynı olan bireyler çeşitli hastalıklar karşısında korunaksız hale getirmektedir. Bu nedenle etkili mikro çoğaltım tekniklerinin geliştirilmesi, somaklonal değişikliklerin seçilimine de olanak sağladığından zeytin çeşitlerinin sağlıklı bir biçimde çoğaltılması için önem taşımaktadır (Qrunfle ve ark., 1994). Şimdiye kadar pek çok meyve türü doku kültürü yöntemleri kullanılarak *in vitro* çoğaltılmış ve aynı zamanda bazı zeytin çeşitlerinin mikro çoğaltım yöntemi ile başarılı bir şekilde çoğaltılması sağlanmıştır (Rugini ve Fedeli, 1990).

Köklenmesi çok zor olan zeytinin ürün verimliliğinin artırılması amacıyla, geleneksel yöntemlerin, kısa zamanda ve kolay bir şekilde ticari olarak yüksek miktarlarda bitkinin çoğaltılmasını sağlayan, mikro çoğaltım yöntemi gibi biyoteknolojik yaklaşımlarla desteklenmesi gerekmektedir (Çiftçi, 2019).

Zeytinde Son Yıllarda Yapılan Doku Kültürü Çalışmaları

Zeytin bitkisinin mikro çoğaltımı ile ilgili ilk bilgiler 1970'li yılların ortalarına denk gelmektedir ve bu da zeytin çeşitlerinin tamamında uygulanabilecek bir mikro çoğaltım yönteminin oluşturulması amacıyla araştırma yapan kişilerin besin ortamının mineral madde bakımından içeriklerinin optimizasyonu üzerine yaptıkları çalışmalardan ibarettir. Fiorino ve Leva (1986) tarafından standart MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamının değiştirilmesiyle MSI ve Leva ve ark. (1992) tarafından belirlenen yine standart MS besi ortamının modifiye şekli olan MSM ve Rugini (1984) tarafından belirlenen OM besi yerleri, zeytin mikro çoğaltımı amacıyla kullanılan en yaygın besi ortamlarıdır. OM besi yeri, İtalya'da 50 üzerinde zeytin genotipinin *in vitro* şartlarda ticari olarak üretilmesinde kullanılmaktadır aynı zamanda yüksek kalitede üretim ve hızlı bitki gelişimi sağlamıştır (Rugini ve ark., 2006).

Zeytin mikro çoğaltımında sürgün eldesi için en yaygın kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi (BBD), çok yüksek yoğunlukta kullanılması gereken zeatindir ve günümüzde OM ortamıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Doku kültürüyle daha verimli sürgün eldesi için denenilen diğer bir büyüme düzenleyicisi de dikegulaktır. Bu düzenleyici denenilen beş çeşitten üçünde sürgün oluşumu sağlamıştır (Mendoza de-Gyves, 2008).

Temel mineral içeriğine ek olarak bitki büyüme düzenleyicileri, *in vitro* kültür ortamında bir besi ortamının en önemli bileşenlerini oluşturmaktadır. Zeytine ait farklı çeşitlerde yapılan çalışmalarda, besi ortamına ilave edilen 6-benziladenin (BA), tidiazuron (TDZ) ve kinetin gibi yapay bitki büyüme düzenleyicilerinin zeytinde kısa gövdelerin ve fazla bazal kallus oluşumunu teşvik ettiği rapor edilmiştir (Rugini, 1990). Doğal bir sitokinin olan zeatin ise Rugini'nin (1984) ilk çalışmasından bugüne kadar zeytin kültür besi ortamlarında yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Yüksek derecede çoğalma elde etmek amacıyla besi ortamında bu bitki büyüme düzenleyicisinin yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasının gerekli olduğu

rapor edilmiştir. Zeatinin pahalı oluşu zeytinin *in vitro* çoğaltımının üretim maliyetini arttırmaktadır (Rugini ve Baldoni, 2004).

Zeytin bitkisine ait *in vitro* köklenme çalışmalarında ise %85'e varan başarı elde edildiği rapor edilmiştir (Rugini, 1984). Köklenme araştırmalarında genellikle 1-4 mg/l indol-3-bütirik asit (IBA) veya α -naftalen asetik asit (NAA) kullanılmıştır. Ayrıca steril siyah renkte poli karbonat taneciklerle besî yerinin yüzeyini ya da siyah boya ile besî ortamının kabını boyamanın da köklenme oranına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Rugini ve ark., 1993; Mencucci, 2003). Zeytin bitkisine ait Dünyada ve Türkiyede yapılan bazı doku çalışmaları makalenin bir sonraki kısmında yer almaktadır.

Dünyada Yapılan Çalışmalar

García-Férriz (2002), bu çalışmada materyali *in vitro* çoğaltmak amacıyla protokol geliştirmiştir. Çoğaltma koşullarını belirleyebilmek için 2 ortam ve birkaç sitokin konsantrasyonu denenmiştir. En iyi sonuçlar ROM (Rugini Olive Medium) ortamı kullanıldığında alınmıştır. Tüm konsantrasyonlardaki tüm denemelerde; 6-benzilaminopurinin (BAP) Thidiazuron (TDZ) ile birlikte kullanılması, yalnızca BAP kullanımına göre daha iyi sonuç vermiştir. 5 uM BAP konsantrasyonu kullanımı sürgünlerin ölümüne sebep olmuştur. Sürgünler 45 mm uzunluğa ulaştığında, önce %5 sukroz, 3 mg/l indol bütirik asit (IBA) ve 2 mg/l içeren steril olmayan bir çözeltiye indol asetik asit (IAA), daha sonra bir substratta transplante edilmiş ve %100 nispi nemde tutulmuştur. Sürgünlerin transfer edildikten 25-35 gün sonra %75'inde köklenme oluşmuştur. Dış koşullara alıştırma ise 55 günde hastalık problemi olmadan gerçekleştirilmiştir. Bu protokol daha önceden seçilen *Olea europea L.* ağaçlarının mikro çoğaltma yapmaları için üreticilere uygun olduğunu göstermiştir.

Maalej ve ark. (2002), Tunus'taki zeytin çeşitlerini çalışmıştır. Mevcut çalışmada, önemli 2 çeşit olan Sfax ve Chemlali kullanılmıştır. Kalluslar birçok doku türünden kolaylıkla başlatılmıştır. Örneğin; genç veya yaşlı ağaçlardan alınan eksplantların hiçbiri somatik indüksiyon göstermemiştir. Dahası genç somatik embriyolar tam olarak çiçek açtıktan sonra 20, 30, 40 ve 120. günlerde toplanmış ve embriyonik kapasiteleri yönünden test edilmişlerdir. Embriyolar MS ortamında 6 hafta boyunca karanlıkta tutulduktan sonra 16 saatlik fotoperiyotlara geçilmiş ve 2 ay boyunca devam ettirilmiştir. Düşük sitokin konsantrasyonunu veya alpha-Naphthaleneacetic acid (NAA) ve isopentenyl adenine (2iP) hormonlarının kombinasyonunu içeren ortam bazı durumlarda %30'a ulaşan bir oran ile 70 günlük zigotik embriyolarda somatik embriyogenez oluşturduğu gözlenmiştir. Aktif kömür kullanımının, olgunlaşmamış somatik embriyoların embriyonik kapasitesini arttırdığı gözlenmiştir.

Chaari ve ark. (2002), Bu araştırmada Tunusa ait olan Meski zeytin çeşidini araştırmıştır. Aksiller ifadeyi geliştirmek için, nodal eksplantlar Zeatin, Benzil adenin, Kinetin ve glutamin, glisin ve Inositol gibi çeşitli büyüme maddeleri içeren olive medium (OM) kültür ortamına transfer edilmiştir. Mannitol, glukoz ve sakaroz eklenmiş; agar (8 g/l) ile katılaştırılmıştır. Ayrıca OM ve Briccol-West ortamı ile NAA (1 mg/l) ve IBA (1 mg/l) eklenmiş Lombardo ortamı ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar 1 mg/l

zeatin içeren OM ortamında 75 günde sürgünlerin 17 cm uzama sağladığını göstermiştir. İn vitro kültürdeki sürgünler IBA solüsyonuna daldırmadan önce %100 köklenme sağlamak amacıyla 3 g/l aktif kömürün ortama eklediklerini belirtmişlerdir.

El Bahri Trabelsi ve ark. (2003), 'üç zeytin çeşidinin somatik embriyogenesis aracılığıyla *in vitro* rejenerasyonu' adlı çalışmada 'Chetoui', 'Chemleli' ve 'Arbequina' çeşitlerinin kotiledon segmentlerinden somatik embriyogenesisi başlatmışlar. IBA ve 2iP içeren OM ortamı kullanılmış ve en iyi başarı sıfır veya düşük konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarla elde edilmiştir. Yüksek hormon seviyeleri (yani 0,5 mg/l IBA ve 2iP) embriyogenez engellemiştir. Bu seviyelerde sürekli olgunlaşan ikincil embriyogenez ile farklı olgunlaşma aşamalarında embriyolar gözlenmiştir. Dört hafta oksin içeren ortamda embriyogenez optimum seviyede olmuştur. Ek olarak, 30 ila 40 g/l sukroz, somatik embriyoların büyümesini ve olgunlaşmasını uyarmada glikozdan daha etkili olmuştur. Çok değişkenli nitrojen kaynakları (inorganik ve organik azot formları) kombinasyonları kullanıldığında embriyojenik verimin daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Sghir ve ark. (2005), yapılan çalışmada, Fas ve Fransız zeytin (*Olea Europea L.*) çeşitlerinin özellikleri çeşitli yönlerden *in vitro* kültür çalışarak karşılaştırılmıştır. Geçmişte Haouzia çeşidinin kültür özelliğinin daha iyi olduğu, daha kolay çoğaltılmasıyla açıkça gözlenmiştir. Özellikle kültür çalışmalarında en iyi yanıt geçen zaman (eksplant inokülasyonu ile eksplantların %50'sinin büyümesi arasındaki birincil çekim ve çarpma oranı yani gecikme fazı) göz önünde bulundurulduğunda ZR üretim ile alınmıştır. Araştırmacı BA veya BA ile NAA'nın kombine edildiği kültürlerde, aksiller tomurcuklanmayı ve internod sayısını arttırmadan büyümeyi geliştirdiğini gözlemlemiştir. Tüm çeşitler için *in vitro* edilen filizlerdeki en iyi köklenme oranı; karanlık IBA indüksiyonu ile elde edilmiştir. Bu çalışmada çoğaltmayı sağlamak için 6-benziladenin (BA), zeatin riboside (ZR) kullanılmış, köklenme ortamında ise indol-3-bütirik asit (IBA), alfa naftalen asetik asit (NAA) hormonları kullanılmıştır.

Boustany ve ark. (2009), yerel zeytin genetik kaynaklarını korumak için 2 farklı teknik kullanmıştır: Bchealehs milenyum ağaçlarının aksiller tomurcuklarının hem *in vivo* hem de *in vitro*da çoğaltımını amaçlamıştır. Ek olarak Internaional Olive Council (IOC) ticari standartlarda kayıtlı olan ve milenyum ağaçlarının üretilen ekstra saf yağların bilgileri de gözetilerek zeytinyağı parametreleri de çalışılmıştır. Yeni üretilmiş eksplantların enfeksiyonunun engellenmesi için çoğaltma teknikleri ile bir dizi aşama uygulanmıştır. En iyi canlılık oranı %56,7 ile *in vitro*da kullanılan fungusitlerden karbendazim (2 g/l) ve fosetil alüminyum (6 g/l) iken, sterilizasyon için ise NaOCI (%15) ve kloroksilenol (%2,5) ve deterjan olarak kullanılan oksitetrasiklin (1mg/l) etkili sonuç vermiştir. Daha sonra eksplantlar, BAP (2, 3 ve 4 mg/l) ile desteklenen MS, OM ve WPM üzerindeki genç yıllık sürgünlerden *in vitro* başlatılmıştır. Sonbaharda, MS ortamıyla elde edilen OM ve Woody Plant Medium (WPM) ile en yüksek proliferasyon oranı (%47), yeni geliştirilen eksplantlar (1,35) ve çoğaltma oranı (1,08) elde edilmiştir. Ayrıca eklenen MS ortamındaki (3 mg/l BAP eklenmiş) ilk alt kültürde yeni geliştirilen yaprakların

sayısı (3,58) ve en uzun eksplantlar (1,78 cm) gözlenmiştir. Alt kültür sırasında incelenen parametrelerde düşüşler gözlenmiştir. Uzama fazından sonra ise, 2mg/l NAA eklenmiş MS ortamında en yüksek köklenme (%22) gözlemlenmiştir. Sonbahar boyunca üzerinde kallus gelişen eksplantlar herhangi bir alt kültür kullanılmadan %23'lük köklenme sağlayan taze besi yerine aktarılmıştır. Bchealehs kesimlerinin *in vivo* köklenme kabiliyeti kesim büyüklüğü, toplama mevsimi ve kullanılan ortamdan etkilenmiştir. Ortaya çıkan tomurcukların en yüksek yüzdesi (%88) ilkbahar 2010'da kaydedilmiştir. Bchealeh kesimi 2010 yılında %10,67 iken bu miktar 2009'da %4'ü geçmemiştir.

Chaarı Rkhis ve ark. (2010), Oueslati çeşidini kullanarak mikro çoğaltım için etkin *in vitro* protokollerin oluşturulmasına katkıda bulunmak amacıyla yapılmıştır. Bu mikro çoğaltımda ortam bileşimi, büyüme regülatörleri, köklenme ve iklimlendirme koşullarını etkileyen faktörler incelenmiştir. Belirli koşullar altında Oueslati çeşidinin çoğalma kapasitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Çoğalma aşamasında Rugini ortamının zeatin (1 ve 2 mg/l) ile modifiye edilmesi sonucu en yüksek çoğalma oluşmuştur. Ayrıca, bazal kısım IBA çözeltisine daldırılmış ve aynı büyüme düzenleyicisi ile zenginleştirilmiş bir agar ortamına aktarılmıştır 40 gün sonunda sürgünlerin %91'inin köklendiği kayıt altına alınmıştır. *In vitro* bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması sera koşullarında gerçekleştirilmiştir ve 4 aylık *ex vitro* koşullardan sonra yaklaşık %88'lik bir başarı oranı elde edilmiştir.

Farahani ve ark. (2011), bu çalışmada, İran'daki Zard çeşidinin mikro çoğaltımı için bir protokol geliştirmek amaçlanmıştır. Çünkü bu çeşidin çelikle ve diğer yollarla çoğaltılması zor veya imkânsızdır. Üç haftalık fideler anaç olarak kullanılmıştır. Anaç bitkiden alınan yanal meristemler (1 ile 1,5 cm uzunluğunda) kesilmiş ve zeatin içeren OM besin ortamında zeytin fideleri üzerine transplante edilmiştir. Aşılardan 7 ile 10 gün sonra kallus oluşumu gözlenmiş ve greftlemeden 15 gün sonra kallusların arttığı gözlemlenmiştir. Mikrograflı bitkilerin canlılık düzeyleri özellikle mikrografların üçüncü fazından sonra yüksek olmuştur. Bu eksplantlardan rejenere edilen sürgünler çoğaltma ortamı olarak 2ip içeren OM ortamına aktarılmıştır. Altı haftada bir tomurcuklanan bitkiciklerden alınan tek tomurcuklar kesilmiş ve çoğalma ortamına aktarılmış, bunun sonucunda aktarılan bitkilerde 1:4 oranında yeniden gelişme olduğunu vurgulamışlardır.

Naija ve ark. (2011), 'Chetoui' zeytin çeşidinde somatik embriyogenezi hücre süspansiyon kültürleri kullanılarak çalışılmıştır. İşlem olgun yapraklardan elde edilen "Calli" den başlatılmıştır. Calli, karanlıkta 10 µm NAA ve 2,25 µm 2iP içeren MS ortamında başlatılmıştır. Hücre çoğalmasını belirlemek, somatik embriyogenezis indüksiyonu ve farklılaşmasını gözlemek için üç bitki büyüme düzenleyicisinin kombinasyonları (2,4-D, NAA ve zeatin) kullanılmıştır. Embriyonik süspansiyon için 2,5 µm 2,4-D ve 2,5 µm zeatin içeren OM kullanılmıştır. Olgun zeytin dokusundan pro globüler ve globüler embriyolar elde edilmiştir. En etkili büyüme ortamı ve hücre proliferasyonu; inorganik ve organik azot formları içeren ortamda elde edilmiştir.

Mangal ve ark. (2013), Frontio çeşidi için nodal segmentlerden bitki rejenerasyonu amacıyla protokol

geliştirmiştir. Protokolde fenoliklerin oluşumuna bağlı esmerleşme meydana geldiği için 100 mg/l askorbik asit içeren ortam kullanılmıştır. Eksplantların en iyi oluşumu, 1/2 MS ortamında gözlemlenmiştir. Ortalama 2 mg/l düzeyinde eklenen 6-benzilaminopürin (BAP) %56'lık bir kısımda tomurcuk kopmasına, %96'lık bir kısmın ise hayatta kalmasını sağlamıştır. Protokolde 3-indol-butirik asit (IBA) ve kinetinin 1,0 mg/l kombinasyonunu içeren MS ortamı kullanılmıştır. Bu işlemlerde en iyi sürgün sayısı (3,6 eksplant) ve sürgün uzunluğu (2,2 cm) elde edilmiştir. *In vitro* sürgünler 0,2 mg/l IBA ve 0,2 mg/l NAA içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Çalışma sonunda araştırmacı optimum köklendirme (%60), ortalama 2-3 kök/sürgün, yaklaşık 2,4 cm destekli 1,5 g/l aktif kömür içeren dört haftalık kültürde gözlemlenmiştir.

Chalak ve ark. (2014), yerel zeytin genetik kaynaklarını korumak ve çoğaltmak için MS ve OM ortamlarında boğum eksplantları kullanılmıştır. Araştırmacılar sukroz veya mannitol ve 4 mg/l zeatin eklenerek alt kültürler oluşturulduğunda canlılık oranları sırasıyla %43 ve %62 olarak belirlemişlerdir. Kurulan eksplantlar, eksplant başına ortalama 1,0 ile 1,5 katı oranında yeni sürgünlerin rejenerasyonu olduğu kaydedilmiştir. Dört alt kültür sonunda çoğalma oranı 1,5 ile 3,2 katı kadar değişecek şekilde aynı kültür ortamında yürütülmüştür. Köklenme aşaması ise, 2 mg/l NAA ile takviye edilmiş, MS ortamında %62'lik oranda başarıyla sağlanmıştır. Bu sonuçlar hem doku kültürünün etkinliğini hem de tarihi zeytin ağaçlarının çoğaltımı için önemli sonuçlar vermiştir.

Oulbi ve ark. (2018), Fas'ta bulunan "Fas Picholine" zeytin çeşidinin mikro çoğaltımı için somatik embriyogenesisten protokol oluşturmayı amaçlamıştır. *In vitro* eksplantlar, *in vitro*da katı ortam dört ortam üzerinde, 6 hafta boyunca alt kültüre alınan yaprak ve yaprak saplarıyla başlatılmıştır. Bu süreçte OM ortamı bitki büyüme düzenleyicileri; TDZ ile IBA, TDZ ile NAA, ZR ile IBA ve ZR ile NAA kombinasyonları kullanılmıştır. İndüklenen kalluslar, OM ortamında 4 hafta boyunca IBA ile desteklen çoğalma ortamına transfer edilmiştir. Daha sonra kalluslar, zeytinin embriyogeneze ortamı olan siklik embriyogeneze kültür ortamına 4 haftada bir ortamın yenilenmesi koşuluyla aktarılmışlardır. Bu çalışmada ilk defa Fas Picholine' in somatik embriyo oluşumlarını; sapı IBA ve ZR ile takviye edilmiş, ayrıca kültür ortamı NAA ile desteklenmiş durumda embriyogeneze ekspresyon oranı %6,93, yaprak sapı %11,93 ve ara yaprak arası %7,66 olmak üzere gözlemlenmiş. Aynı zamanda, TDZ ve NAA ile desteklenmiş indüksiyon ortamında adventif tomurcukların oluşumu gözlenmiştir.

Türkiye'de Yapılan Çalışmalar

Özden ve ark. (2010), tarafından yapılan bir çalışmada ise "Edremit" yağlık genotipine ait yaşlı ağaçlardan alınan nodal tomurcukları *in vitro* çoğaltım amacıyla farklı karbon kaynakları (sukroz, mannitol, glukoz) ve bitki büyüme düzenleyicileri (zeatin ve dikegulak) ilave edilerek hem yarı katı hem de geçici daldırma biyoreaktör TIS sisteminde çoğaltılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mannitol içeren sıvı OM besin ortamında TIS sistemi ile gövdelerde apikal dominansın kırılıp yanal gövdelerin gelişme gösterdiğini ve çoklu gövde oluşumunun gerçekleştirdiğini göstermiştir. Yine TIS sisteminde besi yerine zeatine ilave olarak, dikegulak eklenmesinin çoklu gövde oluşumu üzerine

olumlu etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada, zeytin bitkisine ait nodal eksplantlardan en fazla gövde rejenerasyonu ve çoklu gövde oluşumu mannitol, zeatin ve dikegulak içeren sıvı besi ortamında TIS sistemi kullanılarak elde edildiği rapor edilmiştir.

Çiftçi ve ark. (2019), Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetiştirilen Gulleki, Nizip Halhallı, Gemlik, Hursuki ve Arbequina zeytin çeşitlerinin *in vitro* mikro çoğaltımı amaçlanmıştır. Bu çeşitlerden Gulleki ve Nizip Halhallı için uygun *in vitro* mikro çoğaltım protokolü oluşturulmuştur. Boğum ve sürgün ucu eksplantları 1 mg/l zeatin içeren OM (olive medium) besin ortamında kültüre alınmışlardır. 1 mg/l zeatin içeren OM besin ortamında kültüre alınan Gulleki ve Nizip Halhallı çeşitlerine ait sürgün ucu eksplantlarında yüksek oranda sürgün oluşumu ve kardeşlenme sağlanmıştır. Arbequina, Hursuki ve Gemlik çeşitlerinde çok düşük düzeyde sürgün oluşumu ve kardeşlenme olduğu gözlemlenmiştir. Bu çeşitlerden Hursuki çeşidinde yüksek düzeyde kontaminasyon oluşmuştur. Mikro sürgünleri köklendirmek amacıyla 4 mg/l IBA içeren OM besin ortamında kültüre alınmışlardır. En iyi köklenme %89,74 ile Gulleki ve %89,06 ile Nizip Halhallı çeşidinde olurken diğer çeşitlerde köklenme gerçekleşmemiştir. Köklü bitkiciklerin yalnızca %50'si dış koşullara alıştırılabilmektedir.

Sonuçlar

Zeytin bitkisi heterozigot olması nedeniyle genetik açılım göstermektedir ve bundan dolayı melezleme yoluyla ıslah edilmesi çok güçtür. Melezleme ıslahı için gen aktarım/düzenleme teknikleri gerekmektedir. Gen aktarım tekniklerinin başarılı bir şekilde yapılabilmesi için de bitki doku kültürü tekniklerinin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma, zeytin çeşitlerinin biyoteknolojik yöntemlerle çoğaltımı için günümüze kadar dünyada ve Türkiye'de uygulanan farklı yöntemler göz önünde bulundurularak derlenmiştir. Zeytin bitkisi sahip olduğu uzun juvenil periyot ve geleneksel yöntemlerle üretilmesinde karşılaşılan köklenme sorunları nedeniyle genetik ıslahının yapılması henüz tam olarak başarılamamıştır. Pek çok çalışma, bu problemi ortadan kaldırmak için alternatif bir çözüm üretme üzerine yapılmaktadır. Son zamanlarda yaygınlaşan genetik çeşitliliğinin korunmasına yönelik çalışmalarda, zeytin bitkisine ait tür altı taksonların ve akrabalık derecelerinin belirlenmesinde moleküler belirteçlerin kullanımı ve biyoteknolojik yöntemler kullanılarak çoğaltımı önem kazanmaktadır.

Kaynaklar

- Acebedo MM, Lavee S, Linan J, Troncoso A. 1997. *In vitro* Germination of embryos for speeding up seedling development in olive Breeding programmes. *Scientia horticulture*, 69: 207-215.
- Baldoni L, Tosti N, Ricciolini C, Belaj A, Arcioni S, Panelli G, Germana MA, Mulas M, Porceddu A. 2006. Genetic structure of Wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. *Annals of Botany (Lond)*, 98: 935-942.
- Besnard G, Breton C, Baradat P, Khadari B, Berville A. 2001. Cultivar identification in olive based on RAPD markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126(6):668-675.
- Boustany N. 2009. The Millenium Olives (*Olea europea L.*) in Lebanon: Rejuvenation, Micropropagation and Olive Oil Variation during Maturation And Conservation. Scuola di Dottorato in Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali e delle Produzioni Alimentari. Università Degli Studi Di Sassari.
- Carriero F, Fontanazza G, Cellini F, Giorio G. 2002. Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea L.*) Theoretical and Applied Genetics, February 2002, vol. 104, no. 2-3, p. 301-307.
- Chaari A, Chaabouni C, Maalej M, Drira N. 2002. Meski Olive Variety Propagated by Tissue Culture. *Proc. 4th IS on Olive Growing Eds.* C. Vitagliano & G.P. Martelli Acta Hort. 586, ISHS
- Chaari-Rkhis A, Trigui A, Maalej M, Drira N. 2002. Preliminary Results of Somatic Embryogenesis from Young Zygotic Embryos Of Olive Tree. *Proc. 4th IS on Olive Growing Eds.* C. Vitagliano & G.P. Martelli Acta Hort. 586, ISHS 2002.
- Chalak L, Elkhawand H, Elbitar A. 2014. *In Vitro* Regeneration of Centennial Olive Trees (*Olea europaea L.*). *Proc. VIIth IS on Olive Growing Eds.*: F. Vita Serman et al. Acta Hort. 1057, ISHS.
- Çiftçi Z. 2019. Bazı Zeytin Çeşitlerinin Mikro Çoğaltımı Üzerine Bir Araştırma. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 49s.
- Çiftçi Z, Sakar E, Ak BE. 2019. Bazı Zeytin Çeşitlerinin Mikro Çoğaltımı Üzerine Bir Araştırma. Uluslararası Gıda, Tarım ve Hayvancılık Kongresi, 19-22 Eylül, 1-9.
- Fabbri A, Bartolini G, Lambardi M, Kailis S. 2004. Olive Propagation Manuel. *Csiro Publ., Australia*, pp.130.
- Farahani F, Peyvandi M, Ataii S, Hosseini Mazinani M. 2011. *In Vitro* micrografting: a technique to improve multiplication and rooting plantlets. *Proc. "2nd Int. Seminar Olive-Biotech 2006"*, Vol I. Marsala-Mazara del Vallo, Italy, pp.307-309.
- Flahault R. 1986. L' Olivier, *Ann. Ecole Nat. Agric. t. II.* Montpellier.
- García Ferriz L, Ghorbel R, Ybarra M, Mari A, Belaj A, Trujillo I. 2002. Micropropagation from adult olive trees. *Acta Hort.* 586: 879-882.
- Leva AR, Petrucci R, Goretti R, Panicucci M. 1992. Ruolo di Alcuni Microelementi e Carboidrati Nella Proliferazione *in vitro* di cv. di olivo (*Olea Europaea L.*). *Atti Conv. "Olive oil quality"* Firenze 1992, 333-334.
- Maalej M, Drira N, Chaari-Rkhis A, Trigui A. 2002. Preliminary Results of Somatic Embryogenesis from Young Zygotic Embryos Of Olive Tree. *Proc. 4th IS on Olive Growing Eds.* C. Vitagliano & G.P. Martelli Acta Hort. 586, ISHS 2002.
- Mangal M, Sharma D, Kumar S. 2013. *In vitro* regeneration in olive cv. Frontio' from nodal segments. *Indian Journal of Experimental Biology* Vol. 52, September 2014, pp. 912-916.
- Mencuccini M. 2003. Effect of Medium Darkening on *in vitro* Rooting Capability and Rooting Seasonality of Olive (*Olea Europaea L.*) cultivars. *Sci. Hort.*, 97:129-139.
- Mendoza-de Gyves E, Mira FR, Rui F, Rugini E. 2008. Stimulation of Node and Lateral shoot Formation in micropropagation of olive (*Olea europaea L.*) by using Dikegulac. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92: 233-238.
- Moretteni A. 1972. *Olivi coltura*. Rama Editoriale Delgi Agricoltori.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Naija S, Elloumi N, Belfeleh Z, Mselem M, Ghezal R, Bouzid S. 2011. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive 'Chetoui'. *Acta Physiol Plant* (2011) 33:319-324.
- Oulbil S, Belkoura I, Loutfi K. 2018. Somatic embryogenesis from somatic explants of a Moroccan olive (*Olea europaea L.*) cultivar, 'Moroccan Picholine' *Acta Hort.* Proc. VIII Int. Olive Symposium Eds.:S
- Özden Y, Özdoğan EA, Kaya E, Akdemir H. 2010. Zeytin (*Olea Europaea L.*) Bitkisinin Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemleri (TIS) ile *in vitro* Sürgün Çoğaltımının İyileştirilmesi. *Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1-1:1-6

- Qrunfleh Mm, Rushdi Y, Musmar T, Rushdi L. 1994. Root Formation in cuttings of 'Nabali' olives with uniconazole and Indolebutyric acid. *Dirasat*, 21:71-79.
- Rallo L, Barranco D, Escobar F. 1997. El cultivo del olivo. Ediciones mundi prensa. pp. 701.
- Rugini E. 1984. *In vitro* Propagation of Some Olive (*Olea europaea sativa*L.) Cultivars With Different Root-Ability, and Medium Development Using Analytical data from Developing Shoots and Embryos. *Sci. Hort.*, 24:123-134.
- Rugini E, Fedeli E. 1990. Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. In: Bajaj, Y.B.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 10. Legumes and Oil seed crops I. Springer, Heidelberg, pp. 593-641.
- Rugini E, Jacoboni A, Luppino M. 1993. Role of Basal Darkening and Exogenous Putrescine Treatment on *in vitro* Rooting and on Endogenous Polyamine Changes in Difficult-To-Root Woody Species. *Sci. Hort.* 53: 63- 72.
- Rugini E, Caricato G. 1995. Somatic Embryogenesis and Plant Recovery From Mature Tissues of Olive Cultivars (*Olea europaea* L.) "Canino" and "Moraiolo". *Pl. Cell Rep.*, 14: 257-260.
- Sghir S, Chatelet P, Ouazzani N, Dosba F, Belkoura I. 2005. Micropropagation of eight moroccan and french olive cultivars. *Hort science*, 40(1): 193-196.
- Rugini E, Baldoni L. 2004 *Olea europea* Olive. In: Litz RE (ed) *Biotechnology of Fruit and Nut crops*. Chap 15 CABI Publishing, Noworty Way, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE, UK, pp 404-428.
- Rugini E, Gutierrez-Pesce P. 2006. Genetic Improvement of Olive. *Pomologia Croatica* 12: 43-74.
- Trabelsi Eb, Naija S, Elloumi N, Belfeleh Z, Msellem M, Ghezal R, Bouzid S. 2011. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *olea europea* 'chetoui'. *Acta physiologia plantarum*, 33: 319-324.
- Zamora R, Alaiz M, Hidalgo FJ. 2001. Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition, and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem*, 49 (9): 4267-4270.
- Zohary D, Hopf M. 1993, *Domestication of plants in the old world*. Oxford clarendon press, 137-143.