T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANAÇLIK POTANSİYEL GÖSTEREN 42-01 ZERDALİ GENOTİPİNİN *IN VITRO* MİKROÇOĞALTIM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zeynep NAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Haziran-2021
KONYA

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

ANAÇLIK POTANSİYEL GÖSTEREN 42-01 ZERDALİ GENOTİPİNİN *İN VİTRO* MİKROÇOĞALTIM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zeynep NAS

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN

2021, 51 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN
Prof. Dr. Lütfi PIRLAK
Prof. Dr. Halil İbrahim OĞUZ

Meyvecilikte anaç kullanımı yüksek verim ve kalite için vazgeçilmez bir unsurdur. Kayısıda *Prunus armeniaca* türü içerisinde klon anacı geliştirmeye yönelik yapılan çalışmalardan sonuç alınamaması nedeniyle çöğür anaçları kullanılmaktadır. Kayısıda anaç olarak kullanılacak genotiplerin köklenmesinin zor olması dolayısıyla gerek çelikle çoğaltma gerekse mikroçoğaltma çalışmalarından istenen sonuçlar alınamamıştır. *In vitro* şartlarda klonal olarak çoğaltılabilecek bir *P. armeniaca* anacının geliştirilmesi bu çalışmanın en önemli amacıdır. Elde edeceğimiz zerdali klon anacı, kayısının kendi türü içerisinde ilk klon anacı olmasının yanı sıra erik, şeftali ve badem türleri için de anaç olarak kullanılabilecektir.

Bu çalışmamızda, materyal olarak Konya'da yaptığımız arazi çalışması sırasında belirlediğimiz, anaçlık özellikleri üstün olan 42-01 zerdali genotipinin *in vitro* mikro çoğaltım özellikleri araştırılmıştır. Ana bitkiden alınan çelikler laboratuvar ortamında yüzey sterilizasyona tabi tutulmuş ve eksplantlar 0,5 mg/l BA+0,01 mg/l IBA+0,5 mg/l GA içeren NRM (Nas ve Read, 2004) ortamında kültür tüplerinde kültüre alınmıştır. Eksplantlar, sürgün kültür ortamında rejenerasyon denemelerinde kullanılabilecek sayıda sürgün elde edilinceye kadar 3'er haftalık aralıklarla aynı sürgün kültür ortamında alt kültüre alınmıştır (Başlangıç safhası). Başlangıç safhasında yeterli sayıda 1-1,5 cm uzunluğunda sürgün elde edildikten sonra, kültürlerin *in vitro*' da sürdürülebilirliğini, stabilizasyonunu ve en iyi mikro çoğaltım katsayısını sağlayacak kültür ortamını belirlemek amacıyla, başlangıç aşamasından alınacak eksplantlar farklı kombinasyonlarda BA (0, 0.5, 1.0 mg l^{-1}) ve IBA (0, 0.01, 0.025 mg l^{-1}) içeren NRM ve MS ortamları üzerinde alt kültüre alınmıştır. Daha sonra tekrar bir alt kültür yapılmadan farklı konsantrasyonlarda (0.0, 1.0 ve 2.0 mg l^{-1}) IBA içeren $^{1}/_{1}$ ve ½ yoğunluktaki MS ve NRM ortamlarına köklendirmeye alınmıştır. Köklenmiş ve sağlıklı bitkicikler kademeli bir şekilde dış ortama alıştırılmıştır.

Çalışmada, ortalama bitki canlılığı oranı, 0,0 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA+ 0,5 mg/l GA içeren MS (%38,90) ve 0,0 mg/l BA + 0,025 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA içeren NRM (%30,56) dışında, diğer tüm uygulamalarda %69,44-100,00 arasında değişmiştir. Eksplant başına ortalama en yüksek sürgün sayısı 1,0 mg/l BA + 0,00 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA içeren MS ortamında kaydedilmiştir (5,97 adet/eksplant). Sürgün uzunluğu bakımından en uzun sürgünler 0,5 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA içeren MS ortamından elde edilmiştir (2,77 cm). En yüksek köklenme oranı, 2,0 mg/l IBA içeren ½ MS ortamında (%61) kaydedilmiştir. 2,0 mg/l IBA içeren ½ NRM ortamında eksplant başına 6,33 kök sayısı not edilmiştir. Kök uzunluğu bakımından en iyi sonucu 2,0 mg/l IBA içeren ½ NRM uygulamasında kaydedilmiştir (2,46 cm).

Anahtar Kelimeler: anaç, *in vitro*, kayısı, NRM

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF *IN VITRO* MICRO PROPAGATION PROPERTIES OF 42-01 ZERDALI GENOTYPE INDICATING ROOTSTOCKS POTENTIAL

Zeynep NAS

SELCUK UNİVERSİTY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLİED SCİENCES
DEPARTMENT OF HORTİCULTURE

Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN
2021, 51 Pages

Jury
Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN
Prof. Dr. Lütfi PIRLAK
Prof. Dr. Halil İbrahim OĞUZ

The use of rootstocks in fruit growing is an indispensable factor for high yield and quality. In apricot, in *Prunus armeniaca* specie, seedling rootstocks are used due to the lack of results from the studies realized to develop clone rootstocks. Due to the difficulty in rooting the genotypes to be used as rootstock in apricot, the desired results could not be obtained from either with cutting propagation or with micropropagation. Development of a *P. armeniaca* rootstock that can will be reproduced clonally in conditions in vitro is the most important aim of this study. The zerdali clone rootstock we will obtain, in addition to being the first clone rootstock in own specie of apricot, also can be used as rootstock for plum, peach and almond species.

In this our study, as a material, the *in vitro* micro-propagation properties of the 42-01 zerdali genotype, which we determined during the field study we realized in Konya, with superior rootstock features were investigated. Cuttings taken from the mother plant were subject to surface sterilize under laboratory conditions and explants were cultured in culture tubes in NRM (Nas and Read, 2004) medium containing 0,5 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA. Explants were taken subcultured in the same shoot culture medium at 3-week intervals until the number of shoots that will could be used in regeneration experiments in the shoot culture medium was obtained. After obtaining a sufficient number of shoots of 1-1,5 cm lenght in the initial stage, in order to determine the culture medium that will provide the sustainability, stabilization and the best micro propagation coefficient of the cultures on in vitro, explants will taken from the initial stage were taken to subculture on NRM and MS media containing different combinations of BA (0, 0.5, 1.0 mg/l) and IBA (0, 0.01, 0.025 mg/l). Later, it was be rooted in $^{1}/_{1}$ and ½ density MS and NRM media containing IBA at different concentrations (0.0, 1.0 and 2,0 mg/l) without subculturing again. Rooted and healthy plantlets was gradually acclimated to the external environment.

In the study, mean plant survival rate was ranged from 69,44% to 100% in all other applications, except MS (38,90%) containing 0,0 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA and NRM (30,56%) containing 0,0 mg/l BA + 0,025 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA. The average hightest number of shoots per explant was recorded in MS medium containing 1,0 mg/l BA + 0,00 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA. (5,97 number/ explant). The longest shoots in terms of shoot length were obtained from MS medium containing 0,5 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA (2.77 cm). Optimum rooting rate was recorded in MS medium containing 2.0 mg/l IBA (%61). Numbers of root per explant in ½ NRM medium containing 2.0 mg/l IBA were noted as 6.33.

Keywords: apricot, *in vitro*, NRM, rootstock

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesi aşamasında yakın ilgisi, yönlendirici katkısı ve yüksek lisans öğrenimimin her aşamasında değerli yardımları için danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet EŞİTKEN' e saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans öğrenimim boyunca derin bilgisi, değerli görüş ve düşünceleri ile beni aydınlatan saygı değer hocam Prof. Dr. Lütfi PIRLAK' a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tezimin yürütülmesi aşamasında değerli bilgisi, tecrübesi ve yardımları için Şırnak Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde görev yapan saygı değer hocam Dr. Öğr. Üyesi Nevzat SEVGİN' e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tezimin yazım aşamasında tecrübesi ve bilgisi ile bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Kevser YAZAR' a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitimim boyunca bana her konuda destek veren ve cesaretlendiren aileme gönül dolusu teşekkürlerimi, minnettarlığımı ifade etmek isterim.

Zeynep NAS
KONYA-2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **7**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **18**

3.1. Materyal 18
3.1.1. 42-01 Zerdali Tipinin Genel Özellikleri 18
3.2. Metod 19
3.2.1. Bitki Materyalinin (eksplant) Yüzey Sterilizasyonu 19
3.2.2. Besin Ortamı, Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu 19
3.2.3. Bitki Materyalinin (eksplant) Kültüre Alınması (Başlangıç Safhası) 20
3.2.4. Çoğaltma safhasında Uygun Ortamın ve BBD konsantrasyonlarının Belirlenmesi 22
3.2.5. Köklenme Üzerine Uygun Gıda Ortamı ve Yoğunluğu ile IBA Konsantrasyonunun Belirlenmesi 25
3.2.6. Köklü Bitkiciklerin Dış Koşullara Alıştırılması 26

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **28**

4.1. Sonuçlar 28
4.1.1. Uygulamaların Bitki Canlılığı, Sürgün Sayısı ve Sürgün Uzunluğu Üzerine Etkisi 28
4.1.2. Uygulamaların Köklenme Üzerine Etkisi 32
4.1.3 Köklü Bitkiciklerin Dış Koşullara Alıştırılması 34
4.2 TARTIŞMA 37

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **44**

5.1. Sonuçlar 44
5.2 Öneriler 44

KAYNAKLAR **46**

ÖZGEÇMİŞ **51**

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µ	Mikro
%	Yüzde
℃	Santigrat derece

Kısaltmalar

NRM	Nas and Read Medium
MS	Murashige and Skoog
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyici
BA	Benzyladenine
IBA	İndolbütirik Asit (Indole-3-butyric Acid)
HCl	Hidroklorikasid
NaOH	Sodyumhidroksit
mg	Miligram
l	litre
TÜİK	Türkiye İstatistikler Kurumu
BA	Benzil Adenin
cm	Santimetre
IAA	İndol-3-Asetik Asit
GA_3	Giberellik Asit
µM	Mikro Molar
m	metre
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Örgütü)
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyici

1. GİRİŞ

Kayısı *(Prunus armeniaca L.), Rosaceae* familyasının *Prunus* cinsi içerisinde yer alan dünyadaki ikinci büyük endüstriyel sert çekirdekli meyve türüdür (Mitrofanova ve ark., 2019). Eski çağlardan beri yetiştiriciliği yapılan kayısının anavatanı, Türkistan'dan Batı Çin'e kadar uzanmaktadır. Kayısı, coğrafi olarak dünyanın hemen her yerinde yetiştirilse de Asya, Avrupa, Amerika ve Afrika kıtaları gibi daha çok Akdeniz'e yakın olan ülkelerde yetiştiriciliği yapılmaktadır (Anonim, 2020).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO, 2021) verilerine göre 2019 yılında Dünya'da toplam 4 milyon ton kayısı üretilmiştir. Ülkeler arasında en fazla kayısı üretimi 847 bin ton ile Türkiye'de gerçekleşmiştir. Türkiye'yi sırasıyla Özbekistan (537 bin ton), İran (330 bin ton), İtalya (273 bin ton) ve Cezayir (209 bin ton) takip etmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Kayısı üretiminde lider ülkelere ait kayısı üretim değerleri (bin ton)

Ülkeler/Yıllar	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Türkiye	780	278	696	730	985	750	847
Özbekistan	480	547	606	569	533	494	537
İran	380	242	252	240	331	314	330
İtalya	198	223	217	237	266	229	273
Cezayir	320	217	293	257	257	242	209
DÜNYA	4.090	3.341	3.945	4.186	4.796	3.901	4.084

Kaynak: FAO, 2021.

Kayısı, çok nemli Karadeniz Bölgesi ve Anadolu'nun soğuk dağlık bölgesi hariç, Türkiye genelinde yetiştirilebilmektedir. Doğu Anadolu Bölgesinde yer alan Malatya, Türkiye'nin en önemli kayısı üretim merkezidir (Yildirim ve ark., 2011). Türkiye, kayısı üretimi bakımından dünyadaki diğer üretici ülkelerle karşılaştırıldığında 2020 yılında 833.398 ton üretim ile ilk sırada yer almaktadır (Çizelge 1.2).

Malatya'daki kayısı bahçelerinin yaklaşık %90-95'lik bölümü kurutmalık kayısı çeşitleriyle kurulmuştur. Yetiştirilen kayısı çeşitlerinin %73'ü Hacıhaliloğlu, %17'si Kabaaşı, geriye kalan kısmını ise Soğancı, Hasanbey, Çataloğlu ve Zerdali (%1'den az) ağaçları oluşturmaktadır. Ülkemizin kayısı yetiştiriciliğinde iki temel sorunun bulunduğu ifade edilmektedir. Sorunlardan ilki, kayısının erken çiçeklenmesinden kaynaklı ilkbahar geç donlarından ileri gelen ürün kayıplarıdır. Diğer önemli sorun ise, ürünün bol olduğu yıllarda pazarlamada yaşanan sıkıntılardır (Asma, 2000). Ayrıca, kayısıda kendi türünden bir klon anacının bulunmaması da önemli bir sorun oluşturmaktadır. Kayısıda kendi türünden klon anacının bulunmaması dolayısıyla yaygın olarak çöğür anacı kullanılmaktadır. Bunun için bahçelerdeki ağaçlarda mütecanis bir gelişme olmamakta ve yapılacak uygulamalarda bir standardizasyon sağlanamamaktadır. Klonal erik anaçları kullanıldığında ise gecikmiş aşı uyuşmazlığına bağlı olarak belli bir yaştan sonra ağaç ölümleri yaygın bir şekilde görülebilmektedir .

Çizelge 1.2. Türkiye'nin yıllara göre kayısı ve zerdali ağacı sayısı ve üretim değerleri

	Kayısı			Zerdali		
	Ağaç sayısı (Bin)		Üretim (Ton)	Ağaç sayısı (Bin)		Üretim (Ton)
Yıllar	Meyve veren	Meyve vermeyen		Meyve veren	Meyve Vermeyen	
2011	13 859	2 499	650 000	1 065	140	26 138
2012	14 133	2 530	760 000	1 050	141	35 483
2013	14 453	2 521	780 000	1 032	132	31 609
2014	15 005	2 384	270 000	1 003	128	8 210
2015	15 403	2 282	680 000	990	130	16 100
2016	15 586	2 284	730 000	889	106	19 050
2017	15 949	2 619	985 000	880	127	21 653
2018	16 837	2 288	750 000	862	121	19 927
2019	17 266	3 429	846 606	755	123	17 250
2020	17 650	3 644	833 398	758	132	17 005

Kaynak: TÜİK, 2021

2020 yılı TÜİK verilerine göre ülkemizde kayısı üretimi 833,398 ton olup üretimin %46'sını Malatya, %17'sini Mersin, %8'ini Kahramanmaraş, %7'sini Elâzığ, %5'ini Iğdır, %4'ünü Hatay ve %14'ünü ise diğer iller karşılamaktadır (TÜİK, 2021).

Üretimde en yüksek paya sahip Malatya, 391.801 ton kayısı üretmektedir. Malatya'yı sırasıyla Mersin (140.301 ton), Kahramanmaraş (65.454 ton), Elâzığ (56.184 ton), Iğdır (39.658 ton) ve Hatay (31.593 ton) izlemektedir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Türkiye'nin İllere Göre Kayısı Üretim Miktarı ve Alanı

	2016		2017		2018		2019	
İLLER	Alan (da)	Üretim (Ton)	Alan (da)	Üretim (Ton)	Alan (da)	Üretim (Ton)	Alan (da)	Üretim (Ton)
Malatya	810.970	380.551	808.197	672.670	798.366	401.363	841.883	391.801
Mersin	68.694	104.310	67.278	86.918	71.905	89.300	81.316	140.301
K.Maraş	89.470	33.169	88.111	25.689	89.328	29.778	89.218	65.454
Elâzığ	97.809	58.876	97.524	53.157	98.192	51.775	99.354	56.184
Iğdır	27.276	31.329	32.300	31.416	34.070	36.194	35.600	39.658
Hatay	6.708	5.962	19.706	7.612	20.761	32.766	19.637	31.593
Diğer İller	137.125	115.803	137.371	107.538	144.937	108.824	144.772	121.615
Toplam	1.238.052	730.000	1.250.487	985.000	1.257.559	750.000	1.311.780	846.606

Kaynak: TÜİK, 2021

Meyvecilikte uygun anaç kullanımı başarıyı etkileyen en önemli etmenlerden birisidir. Ayrıca, dünyada meyve üretim alanlarının her geçen gün artmasına bağlı olarak farklı iklim ve toprak şartlarına uyum sağlayan yeni anaçların geliştirilmesi temel bir ihtiyaçtır. Bunun yanı sıra, modern meyve yetiştiriciliğinde klon anacı kullanımı artık bir zorunluluk haline gelmiştir. Bununla birlikte, köklenmesinin zor olmasından dolayı mikroçoğaltma dâhil vejetatif yöntemlerle çoğaltmada yeterli başarı elde edilemediğinden kayısıda hali hazırda kendi türünden bir klon anacı bulunmamaktadır. Kayısı için diğer bazı *Prunus* türlerin klonal anaçlarından yararlanılabilmek mümkün olmakla birlikte, bu kombinasyonlarda sık sık aşı uyuşmazlığı sorunları ile karşılaşıldığından, bu klonal anaçların kayısıda yaygın kullanımı da mümkün olamamaktadır. Ayrıca, verimlilik, ağaçların uzun ömürlülüğü, bilinen tüm kayısı çeşitleriyle iyi aşı uyuşması göstermesi ve kök-ur nematoduna (*Meloidogyne* spp.) karşı bağışık olması nedeniyle kayısı için en uygun anaç kendi türüdür. Gerek ülkemizde gerekse dünyada kayısı için kendi türünden uygun anaç geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmış olmasına rağmen genellikle bunlar çöğür anacı belirlenmesine odaklanmıştır.

Ayrıca, tespit edilen bu anaçların klonal çoğaltımından istenen başarı elde edilmemiştir. Bundan dolayı, günümüzde dünyada kayısıda kendi türünden klonal bir anaç bulunmamaktadır. Kendi türünden bir klon anacı bulunmayan kayısıda, fidan üretiminde dünyada ve ülkemizde ticari ölçüde en yaygın şekilde çöğür anaçları kullanılmaktadır. Son yıllarda kayısı x erik melezi klonal anaçlar geliştirerek bunları kayısıda kullanmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Ancak bu şekildeki melez anaçlarda da gecikmiş uyuşmazlığa bağlı ağaç ölümleri sıkça görülmektedir. Ayrıca, kayısının en uygun anacı *Prunus armeniaca*'dır. Nitekim ülkemizde farklı klonal erik anaçlarının özellikle yerli kayısı çeşitlerine anaç olarak kullanılabilirliğini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda uygun erik anaçları belirlenmesine rağmen sonuçlar istenen ölçüde uygulamaya aktarılamamıştır. Bundan dolayı halen dünyada kayısıya anaç olarak büyük ölçüde kayısı yozu kullanılmaktadır. Her ne kadar anaç üretmek için kullanılan çeşitler üniform çöğür materyali verse de genetik açılımdan dolayı farklılıklar ortaya çıkabilmektedir. Çünkü kayısıda heterozigoti hâkimdir ve çoğu kayısı çeşidi kendine kısırdır. Ayrıca ülkemizde çöğür üretiminde genellikle zerdali yaygın olarak kullanıldığından genetik açılım daha fazla görülmektedir. Bu açıdan *Prunus armeniaca* türü içerisinde farklı büyüme tabiatında olan klon anaçlarının geliştirilmesi kayısı yetiştiriciliği açısından çok önemlidir. Ayrıca, modern meyve yetiştiriciliğinde bodur anaçlar kullanılarak sık dikim sistemiyle bahçe tesis etmek çok önemlidir. Ancak *P. armeniaca* tohum anaçları genellikle büyük ağaçların oluşmasına neden olmaktadır. Bu açıdan *P. armeniaca* türü içerisinde farklı büyüme tabiatında olan klon anaçlarının geliştirilmesi de kayısı yetiştiriciliği açısından çok önemlidir.

Kayısı, zor köklenen meyve türlerinden biridir ve şimdiye kadar heterojen çöğür anaçlarına aşılanarak çoğaltılmıştır (Murai ve ark., 1997). Kayısının aşı ile çoğaltılmasında anaç olarak kayısı ve zerdali çöğürleri, kısmen de erik, şeftali ve badem klon anaçları kullanılmaktadır (Özçağıran ve ark., 2005). Ancak en uygun anacı kendi türüdür. Çöğür anaçlar, tohumdan kaynaklanan büyüme ve diğer kalıtım farklılıkları, geç verime yatmaları ve kuvvetli büyümeleri sonucu budama, hasat ve tarımsal mücadele gibi kültürel işlemlerin uygulanmasını zorlaştırması nedeniyle zamanla terk edilmektedir. Bu nedenle verimli bir meyve bahçesi kurmak için klon anaçlar tercih edilmektedir (Murai ve ark., 1997).

Klon anaçlarla üretilen fidanlar daha sağlıklı bir yapıya sahip olmasının yanı sıra, bazı klon anaçlar, üzerine aşılanan çeşide bodur ya da yarı bodur özellik kazandırmakta, üzerine aşılanan çeşidin daha erken yaşta (2-3. yılda) meyveye

yatmasını sağlamakta, meyve kalitesini ve verimini arttırarak genellikle standart ve daha iri meyve elde edilmesini sağlamaktadır. Bodur anaçlar ağaçların gelişme kuvvetini azaltır. Böylece birim alana daha fazla dikim yapılabilir ve birim alandan elde edilen verim artar. Ayrıca bodur anaç kullanılan bahçelerde budama, tarımsal mücadele, hasat gibi kültürel işlemler daha kolay ve ekonomiktir (Balla ve Vertesy, 2000). Ayrıca, geleneksel metotlarla elde edilen anaçlarda virüs olma ihtimali de yüksektir. Virüsü yok etmek için *in vitro* mikroçoğaltım gibi biyoteknolojik yöntemlere ihtiyaç vardır (Kovalchuk ve ark., 2017).

Son yıllarda doku kültürü teknikleri kullanılarak sert çekirdekli meyve anaçlarında mikroçoğaltım yapılmaktadır (Muna ve ark., 1999; Erturk ve ark., 2007; Arıcı, 2008). Kayısıların (*Prunus armeniaca* L.) *in vitro* çoğaltılması, istenen özelliklere sahip türlerin/çeşitlerin hızlı çoğaltılması, temiz ve virüsten ari bitkilerin üretimi için çok önemlidir (Mitrofanova ve ark., 2019). Kayısının mikroçoğaltımı, büyük ölçüde sağlıklı bitki materyali talebi nedeniyle üzerinde durulan bir konu olmuştur (Balla ve Vertesy, 2000).

Mikroçoğaltım ile elde edilen bitkiler çoğunlukla hastalık etmenlerinden temizdir. Bunun dışında mikroçoğaltım en hızlı klonal çoğaltma şeklidir, mikro çoğaltım ile pazarın talepleri yıl boyu karşılanabilir, çevre şartlarından bağımsız olduğu için sürekli üretim yapmak mümkündür ve yüksek çoğaltım katsayısından dolayı kısa sürede yüksek miktarda bitki elde edilebilmektedir.

İn vitro kayısı kültürü ile ilgili çalışmalar, genellikle tüm kültür aşamalarında zorluklar olduğunu ve kültür ortamı ve koşulları için gereksinimlerin de güçlü bir şekilde genotipe bağlı olduğunu göstermektedir (Koubouris ve Vasilakakis, 2006; Pérez-Tornero ve Burgos, 2007).

Kayısı (*Prunus armeniaca* L.) yaygın olarak sürgün rejenerasyonu ve genetik dönüşüm için zor bir tür olarak kabul edilmektedir (Wang ve ark., 2013). Özellikle, çoğalma aşamasında (Pérez-Tornero ve ark., 2001) düşük veya neredeyse hiç olmayan koltuk altı sürgün oluşumu ve camlaşma (vitrifikasyon) (Hazarika, 2006); köklenme sırasında sürgünlerin apikal nekrozu ve dış ortama aktarım sırasında bitkinin hayatta kalması, (Pérez-Tornero ve Burgos, 2007) bu türün in vitro çoğalmasını olumsuz etkileyebilecek ana faktörler arasında tanımlanmıştır.

Sürgün ucu nekrozu, in vitro olarak bitkiciklerde veya sürgünlerde ortaya çıkabilen ve sürgün ucunun ölümüyle sonuçlanabilen fizyolojik bir durum ve bozukluktur. Aşağı doğru yayılabilen ve koltuk altı tomurcuklardan yan sürgünlerinin

çıkmasını etkileyebilen bu durum, apikal dormansinin kesilmesinden kaynaklanmaktadır. Sürgün ucu nekrozu hem sürgün çoğaltma hem de köklenme aşamalarında meydana gelebilir. Sürgün ucu nekrozuna neden olan en yaygın faktörlerden biri, besin eksikliği veya dengesizliğidir. Ayrıca, belirli gelişim aşamalarında bitki büyüme düzenleyicilerinin (oksinler ve sitokininler) varlığı veya yokluğu sürgün ucu nekrozunu etkileyebilir. Bir *in vitro* bitki içindeki sitokinin / oksin oranı, kültür ortamında kullanılan sitokininlerin konsantrasyonu değiştirilerek düzenlenebilir (Da Silva ve ark., 2020).

Kayısı sürgünlerinin kontaminasyonu doku kültüründe ciddi bir sorundur, çünkü ana ağaçlar için önemli olmayan patojenler in vitro olarak transfer edildiğinde ağır kayıplara ve bitki materyalinin ciddi şekilde azalmasına neden olabilir (Campbell, 1985; Cassells, 2000). Bu nedenle, sürgünlerin etkili bir şekilde dezenfeksiyonu ve antibiyotik uygulamasıyla bakterilerin in vitro baskılanması büyük önem taşır.

Çalışmamızda kullandığımız yerel zerdali genotipi kısa boğum arası, yoğun mayıs buketi oluşturması, bodur ve yayvan taç gelişimi, geç yaprak dökmesi, zayıf tepe hakimiyeti (apikal dormansi) göstermesi ve ilk yılda çiçek tomurcuğu oluşturması gibi üstün özellikler nedeniyle anaç adayı olarak belirlenmiştir. Doku kültürü ile yaptığımız ön çalışmalarda kolay çoğalıp köklendiği tespit edilmiştir. Bilindiği gibi yerel çeşitler/genotipler hastalık ve zararlılara dayanıklılık, farklı iklim ve toprak koşullarına uyum ve farklı kullanım amaçlarına uygunluk gibi kriterler açısından oldukça önemlidir. Elde edeceğimiz zerdali klon anacı, kayısının kendi türü içerisinde ilk klon anacı olmasının yanı sıra erik, şeftali ve badem türleri için de anaç olarak kullanılabilecektir.

Kayısı, önemli bir sert çekirdekli meyve türüdür. Türün önemine rağmen, kayısı için başarılı bir mikro-çoğaltma yöntemi hakkında çok az sayıda çalışma mevcuttur. Yaptığımız çalışmada anaçlık potansiyel gösteren 42-01 zerdali genotipinin koltuk altı tomurcuk kültürü ile farklı bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonu ve kombinasyonu içeren MS ve NRM gıda ortamlarında çoğalımı araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Escalettes ve Dosba (1993) yaptıkları çalışmada *Prunus* türlerinden yüksek oranda adventif sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. *Prunus* türlerinin *in vitro* rejenerasyon uygulamalarına gösterdikleri tepkiler farklı olmuştur. 'H.152' kayısı klonuna yapılan uygulamada Quoirin (Quorin ve ark., 1977) makro elementleri kullanılmış, ayrıca 'H.146' kayısı ve 'P.1869' hibrit erik klonunun rejenerasyon çalışmasında ½ MS kültür ortamı kullanılması rejenerasyonu teşvik etmiştir. Adventif sürgün oluşumuna en etkili faktör TDZ (thidiazuron)'nin tek başına veya naftalen asetik asit (NAA) ile kombinasyonları ile yapılan uygulamalar olmuş, optimum konsantrasyonlar genotipe bağlı olarak değişmiştir. Besin ortamına gümüş nitrat ($AgNO_3$) eklenmesi rejenerasyonu %10-40 oranında artırmıştır. Yine besin ortamına $AgNO_3$ eklenmesiyle, *P. marianna, P. domestica ve P. insititia* türlerine ait erik klonlarının da rejenerasyonu sağlanmıştır.

Pérez-Tornero ve ark. (1997) bitki materyalini *in vitro* olarak "meristem ucu" kültürü aracılığıyla başlatmak ve oluşturmak için bir teknik geliştirmişler. Meristemlerin gelişimini teşvik etmek için mikroçoğalabilen sürgünler için farklı konsantrasyonlarda farklı büyüme düzenleyicileri denenmiştir. Meristemleri başlatmak için en uygun mevsim, tomurcuk dinlenmesi ile ilgili olarak araştırılmıştır. Çoğalma aşamasında farklı temel tuz ortamları ve çoğalma oranını en iyi duruma getirmek için farklı büyüme düzenleyicilerini kullanmışlar.

Murai ve ark. (1997) 'Bakuoh junkyou' kayısı çeşidinin meristem kültürünü, sitokininlerle (BA, 2İP, CPPU ve zeatin) dört ortam (WP, MS, B5 ve 1/2 MS) üzerine 1 mm sürgün uçları yerleştirerek araştırmışlar. Sağkalım oranları ve sürgün uzunluğuna bakıldığında, en iyi ortam %100 sağkalım ile BA veya CPPU ile desteklenmiş WP ortamında olmuş iken, 2-İP ile desteklenmiş WP ortamı %80 sağkalım sağlamıştır. Sürgün çoğalımı için BA, test edilen 3 çeşit (BA, 2İP ve zeatin) sitokinin arasında en etkili olmuşken, zeatin ve 2-İP sürgün uzaması için daha etkili olmuştur. Optimum 2 µM IBA köklenmeyi desteklemiş olup IBA uygulanmadan köklenme meydana gelmemiştir. Sürgünlerin köklenme kabiliyeti alt kültürlerin sayısı ile artmıştır; 20. alt kültürden sonra maksimum %86,7' ye ulaşmıştır.

Marín ve Marin (1998) kök kültürünü, *Prunus* anaçları olan Adafuel ve Adarcias *(Prunus × amygdalopersica),* A843 (*P. armeniaca*), Mariana 2624 (*P. cerasifera × munsoniana*) ve Myrobalan 605AD (*P. cerasifera*) için ve elma anacı olan Jork 9

(*Malus* × *domestica*) için başarıyla kurmuşlardır. Bitkilerin köklenmesi ilk 15 gün yüksek olmuştur ve daha sonra köklenme yavaşlamıştır. Artan agar konsantrasyonları, kök büyümesini azalttığı için sıvı ortam tercih edilmiştir. Tam MS tuzları 1/2 veya 1/4 seyreltilerden daha iyi kök büyümesini sağlamıştır.

Gürel ve Gülşen (1998a) Texas ve Nonpareil badem çeşitlerinin sürgün ucu kültürü ile *in vitro* çoğaltmayı araştırmıştır. Bu amaçla farklı IBA (0.0, 0.1 ve 0.5 mg / l) ve BAP (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg / l) seviyelerinin denendiği çalışmada, birbirini izleyen üç farklı kültür aşamasında (başlangıç, şaşırtma ve çoğaltma) ayrı ayrı test edilmiştir. Sonuçlar, başlangıç aşamasında, hormonsuz ortam veya düşük IBA (0.1 mg / l) içeren ortamların, yalnızca sürgün büyümesi için elverişli olduğunu göstermiştir. Hem şaşırtma hem de çoğaltma aşamalarında, yeni sürgün üretimi ve sürgün büyüme oranı açısından 0.1 mg / l IBA ve 1.0 mg/l BAP kombinasyonunun en etkili olduğu bulunmuştur. Ancak yüksek miktarda BAP (2.0 veya 3.0 mg/l BAP) kullanıldığında sürgünlerde camlaşma, sürgünlerin canlılığında düşme ve kallus oluşumuna sebep olmuştur.

Gürel ve Gülşen (1998b) sürgün ucu kültürü ile Texas ve Nonpareil badem çeşitlerinin *in vitro* vejetatif çoğaltılmasının olanaklarını incelemişlerdir. Farklı sakaroz, agar ve pH seviyeleri test edilmiş ve sürgün çoğalımı, sürgün gelişimi ve büyümesi, birbirini izleyen üç aşamada (başlangıç, şaşırtma ve çoğaltma) incelenmiştir. Başlangıç aşamasında, çoğalmanın yalnızca %5 ve %6 sakaroz ile sağlandığı tespit edilmiştir ve en iyi eksplant gelişimi %0,5 agar ve pH 5,5 ile gerçekleşmiştir. İkinci aşamada, yine %5 ve 6 sakaroz ve pH 5.5, sürgün çoğalımı ve büyümesi açısından en iyi sonuçları vermiştir. Düşük agar konsantrasyonlu (%0.5) besiyerinin sürgün oluşumu ve büyümesi için uygun olmasına rağmen, düşük agar seviyeleri (%0.5 ve %0.6) vitrifikasyona neden olduğundan bu aşama için en uygun seviye %0.7 agar olarak belirlenmiştir. Çoğalma aşamasında, en yüksek sürgün oluşumu oranı %3 ve 4 sakaroz, %0.7 agar ve 5.5 pH ile elde edilmiş ve daha yüksek sakaroz ve agar seviyeleri, sürgünlerin dibinde kallus oluşumunun arttırdığını ortaya koymuştur.

Damiano ve Monticelli (1998) *In vitro* mikro çeliklerin *Agrobacterium rhizogenes* ile enfekte olduğunda badem (Fascinello, Ferragnes, Tuono badem çeşitleri; M49, M50, M51, M52, M53 ve M55 badem tipleri), elma (Gala ve McIntosh), erik (Ontario), *Pyrus pyraster* klonlarının üç tipi (P8, P38 ve P50) ve iki hibrit *anacın* (Citation (erik x şeftali) ve GF-677 (badem x şeftali)) köklenmesini karşılaştıran bir çalışma yapmışlardır. Hormon eklenerek ve eklenmeden yapılan çalışmada üç tepki

oluşmuştur: oksinler olmadan köklenen genotipler, sadece oksinlerle köklenen genotipler, bakteriyel enfeksiyondan sonra kök oluşturan genotipler. Birinci grupta oksinler köklenme yüzdelerini arttırmıştır. Hormonsuz ortamda enfeksiyonlu ve enfeksiyonsuz önemli farklar bulunmazken, köklenme yüzdeleri oksin/enfeksiyon kombinasyonu ile azalma eğilimi göstermiştir. İkinci grupta hormonsuz ortamdaki enfeksiyon köklenmeyi arttırmıştır; ayrıca armutta oksinler ve enfeksiyon arasında sinerjik bir etki tespit edilmiştir. Üçüncü grup sadece enfeksiyon kaynaklı köklenmeyi ifade etmektedir.

Perez-Tornero ve Burgos (1999) *in vitro* kültürlü kayısı yapraklarından adventif sürgün rejenerasyonunu incelemişlerdir. En yüksek rejenerasyon yüzdeleri tidiazuron (TDZ) (0,5 mg / l ve 2 mg / l) ve NAA (0.5 mg / l ve 0.75 mg / l) ile elde edilmiştir. Benzil-amino purin (BAP) çok düşük rejenerasyon yüzdelerini uyarmıştır. Agargel, agar veya gelrite göre daha iyi bir jelleştirici madde olarak belirlenmiştir.

Pérez-Tornero ve ark. (2000) *in vitro* kültürlü 'Helena' kayısı yapraklarından adventif sürgün rejenerasyonunu etkileyen faktörleri değerlendirmişler. En iyi sonuçlar TDZ ile elde edilmiştir. TDZ yerine BAP kullanıldığında rejenerasyon yüzdeleri çok düşük çıkmıştır. Yüksek NAA konsantrasyonu, fenolik maddelerin salgılanmasının azalması üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuştur.

Lauri ve ark. (2000) sert kabuklu meyve türlerinde sürgün ucu kültürü ile yaptıkları rejenerasyon çalışmasında, kardeşlenmeyi teşvik etmek amacıyla bir protokol geliştirmiş ve sürgün rejenerasyonunu sağlamıştır. *In vitro* sürgünlerden alınan sürgün uçları rejenerasyonu için 8.8 µM BA, 1.0 µM NAA ve 250 mg/l sefatoksin içeren bir LP ortamında, 30 gün süreyle, karanlıkta muhafaza edilmiştir. Eksplantlar oksin içermeyen bir ortama aktarılmış daha sonra 1.4 µM GA_3 eklenmiş ve 4 haftada bir yeni bir ortama aktarılmıştır. M-55 badem tipi üzerinde yapılan histolojik çalışmalar, sürgünlerin kallustan meydana geldiğini göstermiştir. Kallus, aylarca sürgün oluşturmaya devam etmiştir.

Kamali ve ark. (2001) GF-677 (*Prunus amygdalus x P. persica*) anacının doku kültürü yöntemiyle mikro çoğaltılmasının araştırıldığı çalışmada eksplantlar, nisan ayında sürgün uçlarından alınarak civa klorür ile sterilize edilmiştir. Kültür için en uygun ortam, değiştirilmiş Knop makro elementleri olduğu tespit edilmiştir. Bu ortamda, BA'nın 1 mg/l düzeyinde kullanılması çoğalma için en iyi sonucu göstermiş ve en yüksek köklenme oranı, eksplantlar, 7 günlük bir karanlık periyodu altında 0.3 mg/l NAA ve 1.6 mg/l tiamin içeren LS ortamına maruz bırakıldığında elde edilmiştir.

Cos ve ark. (2002) şeftali-badem melezi 'Mayor' un in vitro çoğalma aşamasını; çoğalma oranlarını, eksplantların uzunluğunu ve yaprak sayısını, vitrifikasyon semptomları gösteren eksplantların sayısını ve niteliksel durumlarını dört kültür ortamında (MS, WPM, DKW ve Mayor için özel olarak hazırlanan ME kültür ortamı) karşılaştırarak incelemişlerdir. Kullanılan büyüme düzenleyicinin konsantrasyonları, 1 mg/l BAP + 0.1 mg/l IBA, 30 g/l sukroz ve 7 g/l agar olarak belirlenmiştir. Bu aşama için optimal kültür ortamı belirlendikten sonra, farklı büyüme düzenleyici konsantrasyonları incelenmiştir: BAP = 0.5, 1 ve 1.5 mg/l, 0.1 mg/l IBA ile ve IBA olmadan ve daha sonra 0.2 mg/l GA_3 eklenmiştir. Elde edilen sonuçlar, en iyi kültür ortamının 5.21 eksplant çoğalma oranına sahip spesifik ME ortamı olduğunu göstermiştir; diğer üç ortama göre önemli farklılıklar teşkil etmiştir. Ayrıca, spesifik ortamdaki uzunluk, yaprak sayısı ve niteliksel durumlar daha fazla ve bu ortamda vitrifikasyon belirtileri daha az görülmüştür. Büyüme düzenleyici maddelerle yapılan çalışmada, en iyi çoğalma oranları, 1.0 mg/l ve 1.5 mg/l BAP ile 0.1 mg/l IBA içeren ortamlardan alınmıştır. 1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IBA kullanıldığında vitrifikasyon belirtileri düşük seviyelerde görülmüş ve bu nedenle optimal konsantrasyon olarak kabul edilmiştir. 0.2 mg/l GA_3 ilavesi, eksplantların uzunluğunda bir artış sağlamasına rağmen, daha düşük çoğalma sonuçları tespit edilmiştir.

Rodrigues ve ark. *(*2003*)* *Prunus* anaç adaylarının *in vitro* koşullarda çoğaltılması için yaptıkları çalışmada 1 cm uzunluğunda alınan sürgün uçlarını 16 saat fotoperiyot ve 25 ± 2 ºC sıcaklıkta muhafaza etmişlerdir. Çoğaltma ortamı olarak SH ve ¾ MS kullanılmıştır. Ayrıca ¾ MS ortamında farklı agar miktarları da (4.5, 5.5 ve 6.5 g/l) denenmiştir. Denemede, bitkilerin gelişme, enfeksiyon ve oksidasyon yüzdeleri saptanmıştır. Çoğaltma ortamında en yüksek büyüme, gelişme ve kardeşlenme oranı 5.5 g/l agar içeren ¾ MS ortamında tespit edilmiştir.

Channuntapipat ve ark. (2003) ince kabuklu iki badem çeşidi (Nonpareil 15-1, Ne Plus Ultra) ve badem/şeftali melez (Titan x Nemaguard) anacından 0.7 cm uzunluğundaki sürgün uçları kültüre alarak, başarılı bir şekilde çoğaltımı yapmışlardır. Nonpareil 15-1 genotipi için 0.049 mM IBA, 3 mM BAP, 0.058 M sakkaroz ve %0.7 agar içeren AP ortamı, Ne Plus Ultra genotipi için ise 0.049 mM IBA, 5 mM BAP, 0.088 M sakkaroz ve % 0,7 agar içeren MS ortamı uygun bulunmuştur. Titan x Nemaguard melezi için en iyi sürgün çoğaltımını 10 mM BAP, 0.088 M sakkaroz ve %0.7 agar içeren MS ortamı sağlamıştır. Yaklaşık 2 cm uzunluğundaki sürgünler, 2.4

mM IBA, 0.088 M sakkaroz %0.7 agar içeren ½ MS ortamında 1 hafta karanlıkta ve 2 hafta ışıkta bekledikten sonra % 88 oranında köklenme göstermiştir.

Fotopoulos ve Sotiropoulos (2005) MS ortamının mineral konsantrasyonunun normal değerin yarısına indirilmesinin, IBA konsantrasyonu 2.5 µM olduğunda PR 204/84 (şeftali x badem) anacının eksplantlarının köklenme yüzdesini ve IBA konsantrasyonları 2.5 ve 5 µM olduğunda ortalama kök sayısının arttığını belirlemişlerdir. Kök uzunluğu hem tam MS hem de $^1/_2$ MS ortamında tüm IBA seviyelerinde uyarılmıştır. IBA konsantrasyonunun 0'dan 10 µM'a çıkarılmasıyla, her iki ortamda (tam MS, $^1/_2$ MS) da sürgün başına ortalama kök sayısında bir artış gözlenmiştir. Ortalama kök uzunluğu IBA' dan ve kültür ortamının mineral konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilenmemiştir. Yapılan ikinci bir denemede, bitkicikler köklenmeye alındıktan sonra 12 gün karanlığa bırakılmış daha sonra 12 günlük standart büyüme koşullarında bekletilmiştir. 12 saat karanlık uygulamasından sonra 12 saat ışıkta bırakılan eksplantların 1 ve 2.5 µM IBA konsantrasyonunda, standart büyüme odası koşullarında (16/8 aydınlık/karanlık) 24 gün boyunca büyütülen sürgünlere kıyasla sürgünlerin köklenme yüzdesinin arttığı tespit edilmiştir.

Koubouris ve Vasilakakis (2006) Bebecou kayısı çeşidinin *in vitro* çoğaltılmasını incelemişlerdir. En yüksek sayıda yeni mikro sürgün / eksplant (18.7), 300 saatlik soğuklamadan sonra 2.2 µM BA + 0.57 µM IAA ile desteklenmiş kültür ortamında elde edilmiştir.

Perez-Tornero ve ark. (2006) dört kayısı çeşidinin in vitro başlangıcı ve kurulumu üzerine eksplant kaynağının (meristemler veya koltuk altı tomurcuklar) etkisini araştırmışlardır. Koltuk altı tomurcuklar kullanıldığında, kontaminasyon yüzdesi daha yüksek, eksplantların hayatta kalması daha iyi, bir mikro-çoğaltma ortamına aktarılabilen uzun sürgünlerin elde edilmesi için gereken süre daha kısa olmuştur. Meristemlerden ve koltuk altı tomurcuklardan mikro-çoğaltılan sürgünler arasında köklenme yeteneği açısından fark olmadığı görülmüştür.

Yıldırım ve ark. (2007) *in vitro* koşullarda 'Hacıhaliloğlu' kayısı çeşidi için embriyo çimlendirme protokolü geliştirmiştir. *in vitro* şartlarda izole edilen embriyoların çimlenme oranı %100 olarak bulunmuş olup *in vitro* koşullarda tam MS besi ortamı kullanılırken; bu ortam Gamborg vitaminleri, 1 mgl^{-1} BA, 30 gr l^{-1} sakaroz ve 6.3 gr l^{-1} agar ile desteklenmiştir. Çalışma sonucu gelişen bitkiler başarılı bir şekilde dış ortama alıştırıldıktan sonra toprağa aktarılmıştır. Böylece arazi koşullarındaki fidan üretimi amacıyla da bu yöntemin kullanılabileceği sonucu ortaya çıkmıştır.

Arıcı (2008) Myrobolan 29-C, MaxMa 14, MaxMa 60, GF 677 ve GN anaçlarının sürgün uçları ve yan sürgünlerini kullanarak doku kültürü ile çoğaltma olanaklarını araştırmışlardır. Eksplantlar farklı kombinasyonlarda BBD içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Ortamlar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiş olsa da en fazla sürgün oluşumu Myrobolan için 1 mg/L BAP+0,2 mg/L NAA, MaxMa 60 için 2 mg/L BAP+0.02 mg/L NAA, MaxMa 14 için 2 mg/L BAP+0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L GA_3, GF 677 için 1 mg/L BAP+0.02 mg/L NAA, GN için 1 mg/L BAP+0.02 mg/L NAA+ 0.5 mg/L GA_3 içeren ortamlarda belirlenmiştir.

Yıldırım ve ark. (2011) Hacıhaliloğlu kayısı çeşidinin *in vitro* kültüre alınmasını, çoğalımını, köklenmesini ve dış ortama alıştırma aşamasını incelemişlerdir. En iyi kültüre başlama zamanının mayıs ayı olduğu tespit edilmiştir. Sürgün çoğalımı için 1 mg L^{-1} BA'nın en iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Çoğalma bakımından test edilen şeker tipleri (glikoz, sakkaroz, fruktoz ve laktoz) arasında en iyi sonucu sakkaroz vermiştir. En iyi köklenme oranı 2,0 mg L^{-1} indol-3-bütirik asit (IBA) ilave edilmiş MS besi ortamından alınmıştır.

Yıldırım (2012) yaptığı çalışmada Hacıhaliloğlu, Kabaaşı, Çataloğlu, Tokaloğlu, Alyanak, Sakıt-I, İsmailağa, Soğancı, Hacıkız, İri bitirgen, Çekirge-52, Şalak (Aprikoz), İmrahor, Hasanbey ve Karacabey kayısı çeşitlerinden in vitro şartlarda izole edilen embriyoları 1 mg/l BAP ile desteklenmiş MS ve WPM besi ortamlarında kültüre almıştır. Zigotik embriyoların kültüre alındıktan sonra 14. günde; çimlenme oranı, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, sürgün çapı, sürgün ağırlığı ve kök ağırlığı ölçümleri yapılmıştır. Kabaaşı, Tokaloğlu ve Çekirge-52 çeşitleri MS besi ortamında; Hacıhaliloğlu ve Tokaloğlu çeşitleri ise WPM besi ortamında %100 embriyo çimlenme oranı göstermiştir. Hacıhaliloğlu çeşidi sürgün uzunluğu bakımından her iki besi ortamında da en iyi sonucu vermiş ve 11.56 mm (Zhang ve ark.) ve 11.86 mm (WPM) olarak ölçülmüştür. Kök uzunluğu değerleri bakımından her iki besi ortamında da en iyi sonucu Karacabey çeşidi vermiş ve MS besi ortamında 15.79 mm, WPM besi ortamında ise 14.48 mm olarak ölçülmüştür.

Jain ve Ishii (2012) ışık kalitesinin odunsu türlerin mikroçoğalımı üzerindeki etkilerini araştırdığı bir çalışmada mavi ışığın kırmızı ışığa göre ekspant başına sürgün sayısını ve çoğalan sürgün başına boğum sayısını önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir.

Wang ve ark. (2013) olgun kayısı kotiledonlarından etkili *in vitro* sürgün rejenerasyonunu araştırmışlardır. En yüksek rejenerasyon yüzdelerine TDZ (4 veya 8

μM) ve 0.25 μM IBA ile iki hafta karanlık inkübasyon süresinde 'Canino', 'Dorada', 'Moniquí', 'Real Fino' ve 'ansu Maxim' için sırasıyla %67,2, %56.8, %66.7, %46.3 ve %66.7' ye kadar ulaştığı görülmüştür.

Marino ve Noferini (2013) üç kayısı çeşidinin sürgünleri ile kültür şişeleri için farklı tipte kapakların [hava geçirmez (H), polivinil klorür (PVC) kapakları ve pamuk tıpaları (C)] kullanılmasının etilen (C_2H_4) ve karbondioksit (CO_2) birikimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çoğalma ortamına 1 μM aminoetoksivinilglisin (AVG) eklenmesi, hem H- hem de PVC- kapaklı şişelerde sürgün uzamasını azaltmıştır. Bununla birlikte, PVC / AVG kombinasyonundan sürgünlerde daha iyi kök gelişimi kaydedilmiştir.

Cati ve ark. (2014) **(a)** farklı kavanoz kapak tiplerinin [hava geçirmez (H), pamuk tıpaları (C) ve polivinil klorür (PVC) kapak] C_2H_4 ve CO_2 birikimi üzerindeki etkisi ve San Castrese, Boreale ve Vitillo kayısı çeşidi sürgünlerinin *in vitro* köklenmesini; **(b)** dış ortama aktarımdan sonra bitkiciklerin davranışlarını araştırmışlardır. Hava geçirmez (H) kapak, *in vitro* köklenme yüzdelerini etkilemeden kavanozların içinde C_2H_4 ve CO_2 birikimini kuvvetle arttırmış; ancak PVC'ye kıyasla kök sayısını önemli ölçüde azaltmıştır. Hava geçirmez kapak (H) ayrıca dış ortama alıştırma aşamasında bitkilerin hayatta kalma oranlarını, özellikle pamuk tıpalarına (C) kıyasla düşürmüş ve sırasıyla PVC ve C ile karşılaştırıldığında 'Boreale' ve 'Vitillo' çeşitlerinde kök büyümesinde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca, H bitkilerinin genellikle daha kısa olduğu görülmüştür.

Pérez-Tornero ve ark. (2015) bazal ortamın ve büyüme düzenleyicilerinin 'Canino' kayısı çeşidinin *in vitro* çoğalması üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Optimum çoğalmanın elde edildiği ortamlar arasında, modifiye bir WP ortamı kullanıldığında daha sağlıklı ve daha yeşil sürgünler elde edilmiştir. 0.5 ve 0.6 mg l^{-1} arasındaki bir BA konsantrasyonu ile diğer alt kültürlere aktarılacak olan iyi bir uzunlukta optimum sayıda sürgün elde edilmiştir. IBA ve NAA, benzer yüzdelerde ve sürgün başına aynı sayıda kökle köklenmeyi tetiklemiştir. En iyi köklenme yüzdeleri (%92,8 ± 2.5) 2 mg l^{-1} NAA' da teşvik edilirken, sürgün başına en fazla kök sayısı (5.3-0.5) 6 mg l^{-1} IBA ile elde edilmiştir.

Mourenets ve Dolgov (2016) iki kayısı anacı olan 'AP' ve '146-2' nin yaprak eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonunu incelemişlerdir. 'AP' anacı için en iyi rejenerasyon oranı, 2,4-dichlorofenoxi-asetik asit (2,4-D) ön işleminden sonra TDZ ile elde edilmiştir. '146-2' anacına BA uygulaması durumunda ve etkili adventif sürgün

rejenerasyonu için oksin ön işlemi gerekmediği görülmüştür. Her iki durumda da yaprak eksplantlarından sürgün rejenerasyonunu sağlamak için 2-3 haftalık karanlık dönem gerekmiştir.

Hepaksoy (2017) GF 677 klon anacının sürgün ucu tekniğiyle çoğaltılması amacıyla MS gıda ortamının kullanıldığı çalışmada sürgün uçlarının canlılık oranı %38 ile %60 arasında değişmiş ve canlılık oranının BAP konsantrasyonunun artmasıyla arttığı ortaya çıkmıştır. En iyi çoğalma 2.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA + 0.1 mg/l GA_3 içeren MS ortamından elde edilmiş, genel olarak besin ortamında GA_3 bulunmasının kardeşlenme sayısını arttırdığı tespit edilmiştir. *In vitro* bitkiciklerin köklenmesinde NAA, IBA' ya göre daha iyi sonuç vermekle birlikte, istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmamıştır. Besin ortamına 1.0 ve 1.5 mg/l NAA veya IBA ilave edilmesi en yüksek köklenme oranlarını vermiştir. Tam veya yarı kuvvette MS besin ortamının kullanılması köklenme üzerine benzer etki göstermediği tespit edilmiştir.

Palaz ve Uğur (2018) seleksiyon ıslahıyla elde edilen klonal erik anaç adayı SP-2 (*Prunus spinosa*)'nin doku kültürüyle çoğalabilme olanaklarını araştırmışlardır. Çalışmada, MS gıda ortamı ve bu ortama ilave edilen iki farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları MS-1 (0,75 mg/l TDZ, 0,5 mg/l NAA, 0,5 mg/l GA_3), MS-2 (1,5 mg/l TDZ, 1,5 mg/l NAA, 0,5 mg/l GA_3), kontrol olarak ise MS-0 (Hormonsuz normal MS) kullanılmıştır. Çalışma sonunda eksplant başına en yüksek kardeşlenme MS-1 ortamından (12,6 adet/eksplant) ve en uzun sürgün uzunluğu MS-0 ortamından (14,19 mm) elde edilmiştir. Ayrıca en yüksek kardeşlenme oranının elde edildiği ve daha az konsantrasyonda BBD kullanılan MS-1 ortamının, MS-2 ortamına kıyasla daha başarılı ve ekonomik olduğu tespit edilmiştir.

Ozdemir ve Gur (2018) eksplant olarak tepe tomurcuğu kullanılarak Çataloğlu kayısı çeşidinin *in vitro* çoğalmasını araştırmışlardır. Araştırma sonunda 1 mg / l BAP + 0,25 mg / 1 NAA içeren MS ortamında optimum sürgün rejenerasyonu kaydedilmiş; 1 mg / l IBA içeren MS ortamı üzerinde köklenme olmuştur.

Mitrofanova ve ark. (2019) 'Iskorka Tavridy', 'Magister' ve 'Bergeron' kayısı çeşitlerinin yaprak eksplantlarının morfogenetik kapasitesini incelemişlerdir. Deneme farklı kombinasyonlarda BAP (1.5 veya 2,0 mg L^{-1}) ve IAA (1.5 veya 2,0 mg L^{-1}) veya TDZ (0.6 ve 1,3 mg L-1) içeren MS, QL ve WPM ortamı üzerinde kurulmuştur. 1,5 mg L^{-1} BAP ve 1,5 mg L^{-1} IAA içeren MS ortamında yaprak kallus oluşum sıklığı, 'Iskorka Tavridy' (%80,0) çeşidinde, 'Bergeron' (%50,0) ve 'Magister' (%36,7) çeşitlerin

eksplantlarından daha yüksek olmuştur. 'Magister' için en iyi kallogenesis sonuçları 1,3 mg L^{-1} TDZ (%53,3) ile MS ortamında elde edilmiştir. 'Iskorka Tavridy' çeşidindeki aktif mikro sürgün rejenerasyonu, BAP ve IAA içeren MS ortamında ve 'Magister' çeşidinde – TDZ içeren MS ortamında görünmüştür. Kök oluşumu, 2,0 mg L^{-1} IBA içeren ½ MS ortamında elde edilmiştir.

Pakyürek ve Hepaksoy (2019) Marianna GF 8/1, Myrobolan B, Myrobolan 29-C ve St. Julien A klon anaçlarının doku kültürü ile çoğaltma olanaklarının araştırıldığı çalışmada eksplant olarak sürgün uçlarını kullanmışlardır. Sürgün çoğalması aşamasında 9 farklı BBD kombinasyonu ilave edilmiş MS ortamı denenmiştir. En iyi çoğalma 1 mg L^{-1} BAP + 0.5 mg L^{-1} IBA + 0.25 mg L^{-1} GA_3 ilave edilen ortamda elde edilmiştir. Köklendirme aşamasında farklı yoğunluktaki MS ve IBA dozunun denendiği ortamlardan en iyi köklenmeyi ise 2 mg /l IBA içeren $^1/_2$ MS gıda ortamında sağlanmıştır.

Güney (2019) Myrobolan 29C anacında, maksimum kök oluşumu için 0.5 mg/l IBA + 0.5 mg/l NAA + 10 ml/l Fe-EDDHA içeren ½ MS ortamının en iyi sonucu verdiğini bildirmiştir.

Kamışlı ve Kargı (2020) in vitro koşullarda sürgün ucu kültürü ile üretilen anaç adayı bazı yabani erik genotiplerinin köklenmeleri üzerine iki farklı ortamın etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada materyal olarak, *Prunus spinosa, Prunus domestica, Prunus divaricata ve Prunus cerasifera*' ya ait birer adet olmak üzere toplam 4 adet seçilmiş klon anaç adayı genotip (sırasıyla KLSP-50, KLDO-42, KLDİ-47 ve KLCE-39) ile kontrol olarak standart anaçlardan Myrobolan 29C ve GF 677 kullanılmıştır. Steril bitki elde etmek için seçilmiş genotiplerin taze sürgünlerinin ekimi MS besi ortamına yapılmıştır. Yapılan çalışmalardan sonra, rejenere olmuş eksplantlardan alınan in vitro bitkiler TDZ (0.1 mg/l), BAP (0.1 mg/l) ve IBA (1 mg/l)'nın farklı kombinasyonlarıyla oluşturulan iki farklı köklendirme ortamına alınarak köklenme oranları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, köklenme oranının oldukça düşük düzeyde kaldığı tespit edilmiştir. Çalışmada yer alan genotiplerin yarısının (KLCE-39, KLDO-42 ve KLSP-50), her iki köklendirme ortamında da kök oluşturmadıkları, GF 677 genotipinin ise TDZ içeren ortamda kök oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bunun aksine Myrobolan 29C genotipinin TDZ bulunan ortamda (%18), BAP bulunan ortama göre (%4), daha fazla köklenme performansı sergilediği dikkati çekmiştir. En yüksek köklenme %20.0 oranıyla KLDİ-47 No'lu genotipin 1 numaralı ortamından elde edilmiştir. Söz konusu genotip, BAP içeren 2 numaralı ortamda, %5.0 düzeyinde bir köklenme göstermiştir.

Zenna (2020) mor yapraklı erik (*Prunus cerasifera Ehrh.)* için etkili bir *in vitro* çoğaltma protokolü oluşturmayı amaçladığı çalışmada eksplantları 10 dakika boyunca %15 (h / h) Clorox (çamaşır suyu) veya %0.1 $HgCl_2$ (civa klorür) uygulayarak sırasıyla hem dekontaminasyon (100 ve 90,2) hem de hayatta kalma (90 ve 92) yüzdeleri için en iyi sonuçları verdiğini tespit etmiştir. Üç sitokinin türünün (BAP, Kin ve 2ip) dört konsantrasyonda (0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/L) etkisi, hormon içermeyen ortamla karşılaştırılarak çoğaltma aşamasında incelemiştir. 1.5 veya 2.0 mg/L BAP ilavesi, en yüksek sürgün çoğalma oranını vermiştir (sırasıyla 2.13 ve 2.15 sürgün/eksplant). En uzun sürgünler (1.92 cm) 1.5 mg/L 2-ip ilaveli MS ortamında kaydedilmiştir. Kültür ortamına 0,4 mg/L IBA eklenmesi sürgünlerin %100 köklenmesini sağlamıştır. Turba yosunu + perlitin (1:1 v/v) bitkiciklerin ex vitro alıştırılması için bir ortam olarak kullanılması, alıştırılmış bitkiciklerin hayatta kalma, boy, sap taze ve kuru ağırlıkları için en iyi sonuçlarla sonuçlanmıştır.

Khafri ve ark. (2021) Ordubad, Shams ve Qaysi dahil olmak üzere üç İran kayısı çeşidi için etkili bir *in vitro* çoğaltma protokolü optimize etmek ve oluşturmak için yaptıkları bir çalışmada ilk eksplantların sterilizasyonunda nano gümüş (%2.5) uygulandığında mantar ve bakteriyel enfeksiyonların önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. En yüksek aktif tomurcuk sayısı yaz mevsiminde toplanan yan tomurcuk eksplantlarından elde edilmiştir. Kayısı çeşitlerinin araştırılan bazal kültür ortamına verdiği tepkiler farklı olmuş ve Ordubad, Shams ve Qaysi çeşitleri için en iyi sonuçlar, sırasıyla, Driver ve Kuniyuki (DKW), Woody Plant Medium (WPM) ve modifiye Quoirin ve Lepoivre (QL) bazal ortamdan elde edilmiştir. Ordubad çeşidinde (2.33) en yüksek uyarılmış yan sürgün sayısı BAP (4.44 μmol/L^{-1}), GA_3 (1.44 μmol/L^{-1}) ve IBA (0.098 μmol/L^{-1}) ile desteklenen bazal QL besi yerinden elde edilmiştir. Shams ve Qaysi çeşitlerinde, en yüksek sayıda uyarılmış yan sürgünler WPM bazal besi yerinden elde edilmiştir. Üç İran kayısı çeşidinde uyarılmış yan sürgünlerin sayısını artırmak için en iyi BAP ve GA_3 hormon kombinasyonları 11.56 μmol L^{-1} GA_3 ve 4.44 μmol L^{-1} BAP olmuştur. 19.68 μmol L^{-1} IBA ile desteklenen yarı kuvvetli QL besi yeri, incelenen tüm kayısı çeşitlerinde en yüksek köklenme yüzdesi ile sonuçlanmıştır.

Thakur ve ark. (2021) in vitro sürgün çoğalması sırasında gözlemlenen sürgün ucu nekrozunun (STN) kontrolünü sağlayarak ticari Frontier erik çeşidinin mikro çoğaltılması için etkili bir protokol geliştirmeyi amaçlamışlardır. Sürgün ucu nekrozunu kontrol etmek için test edilen çeşitli yöntemler arasında, Fruktoz (0.50 mM) ve

Kalsiyum klorür (1.0 mM) kombinasyonunun %100 etkili olduğu kanıtlanmıştır. En yüksek in vitro sürgün çoğalması (beş kat), 2.0 µM BA, 0.2 µM GA_3, 0.2 µM IBA, 0.50 mM Fruktoz ve 1.0 mM Kalsiyum klorür ile zenginleştirilmiş ortamda kaydedilmiştir. Köklendirme için, iki aşamalı köklendirme prosedürü izlenmiş; bu, mikro sürgünlere yarı katı $^1/_2$ MS bazal ortama aktarılmadan önce 48 saat boyunca 2.5 µM IBA ile takviye edilmiş $^1/_2$ MS sıvı besi yerine daldırılarak karanlık bir işlem uygulandığında %85.00 köklenme ile sonuçlanmıştır. Köklü bitkicikler alıştırma için in vivo transfer edildiklerinde 10 hafta sonra %70-80 sağkalım göstermiş ve bahçeye aktarıldıklarında ölmedikleri tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada materyal olarak Konya'da yaptığımız arazi çalışması sırasında belirlediğimiz anaçlık özellikleri üstün olan 42-01 zerdali genotipinden alınan çelikler üzerindeki sürmemiş koltukaltı tomurcukları kullanılmıştır.

3.1.1. 42-01 Zerdali Tipinin Genel Özellikleri

Yapılan değerlendirmeler sonucunda yaklaşık 20 yaşında olduğu tahmin edilen zerdali tipinin özellikleri aşağıdadır.

- kısa boğum arası (yaklaşık 1 cm),
- bodur ve yayvan taç gelişimi (**boy**: 3.40 m, **taç izdüşüm** 4.35 m, **gövde çapı**: 20 cm)
- geç yaprak dökmesi (Kasım ortası-Aralık ortası)
- zayıf tepe hâkimiyeti (apikal dormansi) göstermesi,
- ilk yılda çiçek tomurcuğu oluşturması ve
- yoğun mayıs buketi oluşturması gibi üstün özelliklere sahiptir.

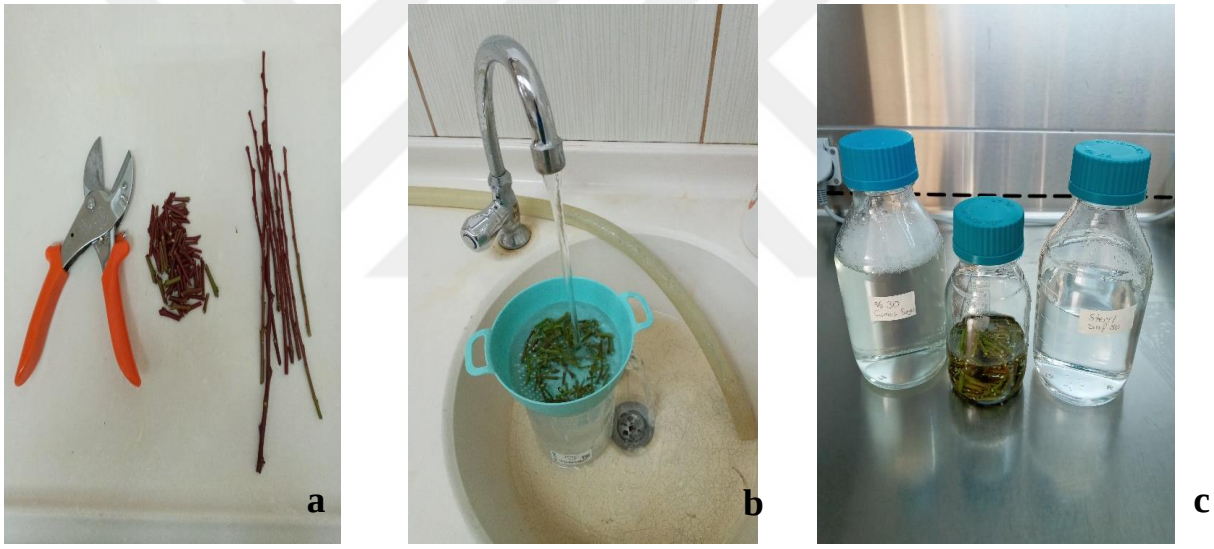


Şekil 3.1. 42-01 zerdali genotipinin farklı dönemlerde çekilmiş arazideki görünümü

3.2. Metod

3.2.1. Bitki Materyalinin (eksplant) Yüzey Sterilizasyonu

Ana bitkiden alınan çelikler budama makası yardımı ile her bir eksplantta bir tane göz olacak şekilde kesilmiştir (**a**). Daha sonra kesilen eksplantlar, akan çeşme suyu altında yarım saat boyunca durulandıktan sonra yüzey sterilizasyona tabi tutulmuştur (**b**). Sürgünlerin yüzey sterilizasyon işlemi steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir (**c**). Yüzey sterilizasyonu amacıyla eksplantlar öncelikle %70 etil alkol (EtOH) içerisinde 1 dakika kadar bekletildikten sonra steril saf su ile iki kez durulanmıştır. Daha sonra eksplantlar litreye 10 damla Tween–20 içeren %30'luk ticari çamaşır suyu solüsyonu içerisinde ara-sıra karıştırılarak 15 dakika bekletildikten sonra üç kez saf su ile durulanmıştır.



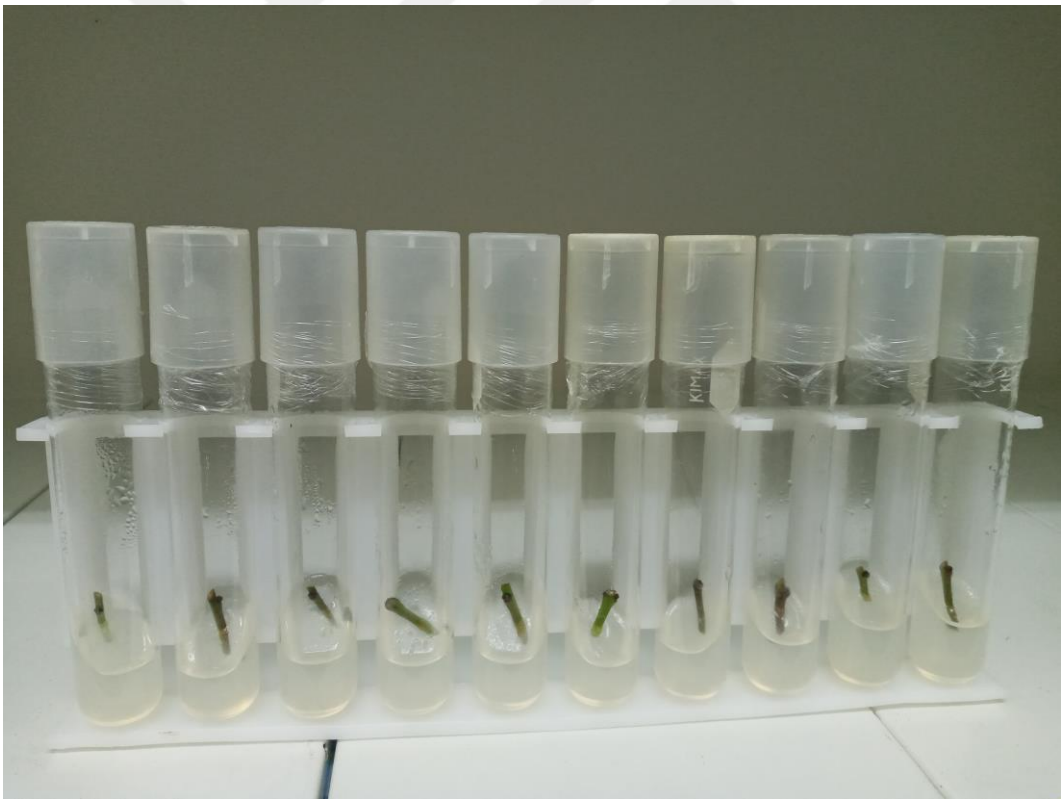
Şekil 3.2. Yeşil çeliklerin kesilmesi (**a**), yıkanması (**b**), ve sterilizasyonu (**c**)

3.2.2. Besin Ortamı, Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu

Hazırlanan besin ortamı 121 ^{0} C'de, 1 atm. basınç altında, 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılacak tüpler, pensler, bistüriler ve kurutma kâğıtları 121^{o}C' de, 1 atm. basınç altında, 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Çalışmaya başlamadan en az 30 dakika önce steril kabin çalıştırılarak ve içi %70'lik etil alkol ile temizlendikten sonra kabinde çalışmaya başlanmıştır.

3.2.3. Bitki Materyalinin (eksplant) Kültüre Alınması (Başlangıç Safhası)

Yüzey sterilizasyon ve durulama işlemlerinden sonra eksplantlar, önceden hazırlanmış ve otoklavlanarak sterilize hale getirilmiş 25 x 150 mm' lik cam tüpler içerisindeki 1,0 mg l^{-1} Benzyladenine (BA) + 0.01 mg l^{-1} Indole -3-butyric acid (IBA) + 0.5 mg l^{-1} Gibberellic acid (GA) + 30 g l^{-1} sakaroz içeren ve 7.4 g l^{-1} agar ile jelleştirilmiş NRM (Nas ve Read, 2004) besi ortamında kültüre alınmıştır. Kültür ortamının pH'sı, sterilizasyondan önce 1 N HCl veya NaOH ile 5.5'e ayarlanmıştır. Dikim işleminden sonra, tüplerin kapakları kapatılıp alt kısımları hava almayacak biçimde şeffaf streç film ile sarılarak herhangi bir enfeksiyona karşı dış ortamdaki atmosferle olan ilişki kesilmiştir. Bu çalışmada kullanılacak iklim odasının ışık yoğunluğu 2000-3000 lüx, 16 saat ışık 8 saat karanlık, ortam sıcaklığı ise 24±1 ºC' ye ayarlanmıştır.

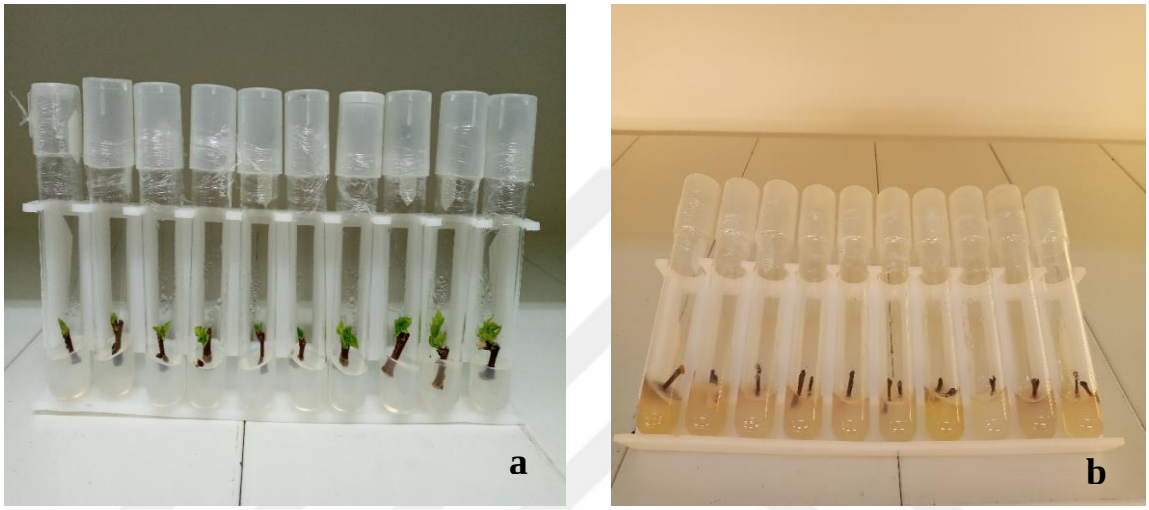


Şekil 3.3. Kültüre alma işleminden sonra kapakların alt kısımları streç film ile sarılan tüpler

Çizelge 3.1. Nas ve Read (NRM) (2004), Murashige ve Skoog (MS) (1962) Ortamlarının Kimyasal Bileşimi

Makro Elementler (mg/l)	**NRM**	**MS**
NH_4NO_3	530	1650
$Ca(NO_3)_2$ $4H_2O$	700	–
$CaCl_2$ $2H_2O$	90	440
$MgSO_4$ $7H_2O$	1600	370
KNO_3	550	1900
KH_2PO_4	1300	170
Mikro Elementler (mg/l)		
H_3BO_3	6,2	6,2
$CuSO_4$ $5H_2O$	2,5	0,025
$MnSO_4$ H_2O	20	16,9
Na_2MoO_4 $2H_2O$	2,5	0,25
$ZnSO_4$ $7H_2O$	8,8	8,6
Sequestrene 138 Fe	100	–
$FeSO_4.7H_2O$	–	27,8
Na_2EDTA	–	37,3
KI	–	0,83
$CoCl_2.6H_2O$	–	0,025
Vitaminler (mg/l)		
Thiamine (B1)	0,6	0,1
Riboflavin (B2)	0,21	–
Nicotinic acid (B3)	1,15	0,5
Pyrodoxine (B6)	0,6	0,5
Vitamin E (a-tocopherol)	20	–
Vitamin C (Ascorbic acid)	1	–
Glycine	0,85	2
Myo-inositol	200	100
Sakaroz	30 gr/l	30 gr/l
Agar	7,4	7,4

In vitro ortama alındıktan sonra, kültürler her gün kontrol edilerek meydana gelen eksplant ölümleri, kararma ve mikrobiyal bulaşmalar kontrol edilmiştir. Üç hafta sonunda, mikrobiyal bulaşmadan ari ve sağlıklı görünen eksplantlar alt kültüre alınmıştır. Mikrobiyal bulaşmadan ari yeterli sayıda eksplant elde etmek için eksplantlar her üç-haftada-bir aynı içeriğe sahip ortamda alt kültüre alınmıştır. Sürgün kültürünün devamının sağlanması için, yeni elde edilen sürgün kümecikleri bireysel sürgünler şeklinde ayrılarak taze sürgünler alt kültür ortamına aktarılmıştır.



Şekil 3.4. Mikrobiyal bulaşmadan ari-temiz eksplantlar (**a**) ve mikrobiyal bulaşma görülen eksplantlar (**b**)

3.2.4. Çoğaltma safhasında Uygun Ortamın ve BBD konsantrasyonlarının Belirlenmesi

NRM gıda ortamında kültüre alınan bitkilerden 1-1,5 cm üzerinden alınan sürgünler, en uygun gıda ortamını belirlemek amacıyla farklı BA (0, 0.5, 0.1 mg l^{-1}) ve IBA (0, 0.01, 0.025 mg l^{-1}) konsantrasyonları, 0.5 mg/l GA ve 7.4 g l^{-1} agar içeren NRM ve MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Eksplantlar, 70 ml besin ortamı içeren cam kavanozlara aktarıldıktan sonra kavanozların kapakları kapatılıp iklim odasına bırakılmıştır. Dikimden sonra bitkiler ara ara kontrol edilip üç haftanın sonunda 42-01 zerdali genotipinin *in vitro* mikro çoğaltımını sağlayan en iyi kültür ortamı belirlenmeye çalışılmıştır.

Uygulanan BBD kombinasyonları NRM ve MS ortamları için ayrı ayrı aşağıdaki gibi yapılmıştır:

1- 0,0 mg/l BA + 0,0 mg/l IBA
2- 0,0 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA+ 0,5 mg/l GA
3- 0,0 mg/l BA + 0,025 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA
4- 0,5 mg/l BA + 0,0 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA
5- 0,5 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA
6- 0,5 mg/l BA + 0,025 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA
7- 1,0 mg/l BA + 0,0 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA
8- 1,0 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA
9- 1,0 mg/l BA + 0,025 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA

Çalışmada en iyi gelişmeyi incelemek için bitki canlılığı, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri tespit edilmiştir. Sürgün sayısı için iki farklı değer not edilmiştir. Birincisi 0,5 cm ve üstündeki uzunluğa sahip sürgünler, ikincisi 0,5 cm altındaki uzunluğa sahip sürgünler. 0,5 cm ve üstündeki sürgünler esas aldığımız sürgün sayısıdır. Çünkü doku kültüründe rejenerasyon çalışmalarında alt kültüre alınacak eksplantın belirli bir boya ulaşması çalışmanın etkinliği için önem taşımaktadır.

3.2.4.1. Bitki Canlılığı (%)

Çoğalma ortamına alınan eksplantlarda 4 hafta sonunda canlı kalan eksplant sayısı sayılmıştır. Canlı kalan eksplant sayısının toplam eksplant sayısına oranının % hesabı (bitki canlılığı) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Demirkök, 2006).

$$\text{Bitki canlılığı (\%)} = \frac{\text{Canlı eksplant sayısı}}{\text{Toplam eksplant sayısı}} \times 100$$

3.2.4.2. Eksplant başına düşen 0,5 cm ve üstündeki sürgün sayısı (adet)

Çoğalma ortamına alınan eksplantlarda 4 hafta sonunda her eksplantta bulunan sürgünler tek tek sayılmıştır. Her eksplant başına düşen toplam sürgün sayısının toplam sürgün oluşturan eksplant sayısına oranı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Demirkök, 2006).

$$\text{Eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)} = \frac{\text{Alt kültürdeki sürgün sayısı}}{\text{Sürgün veren eksplant sayısı}}$$

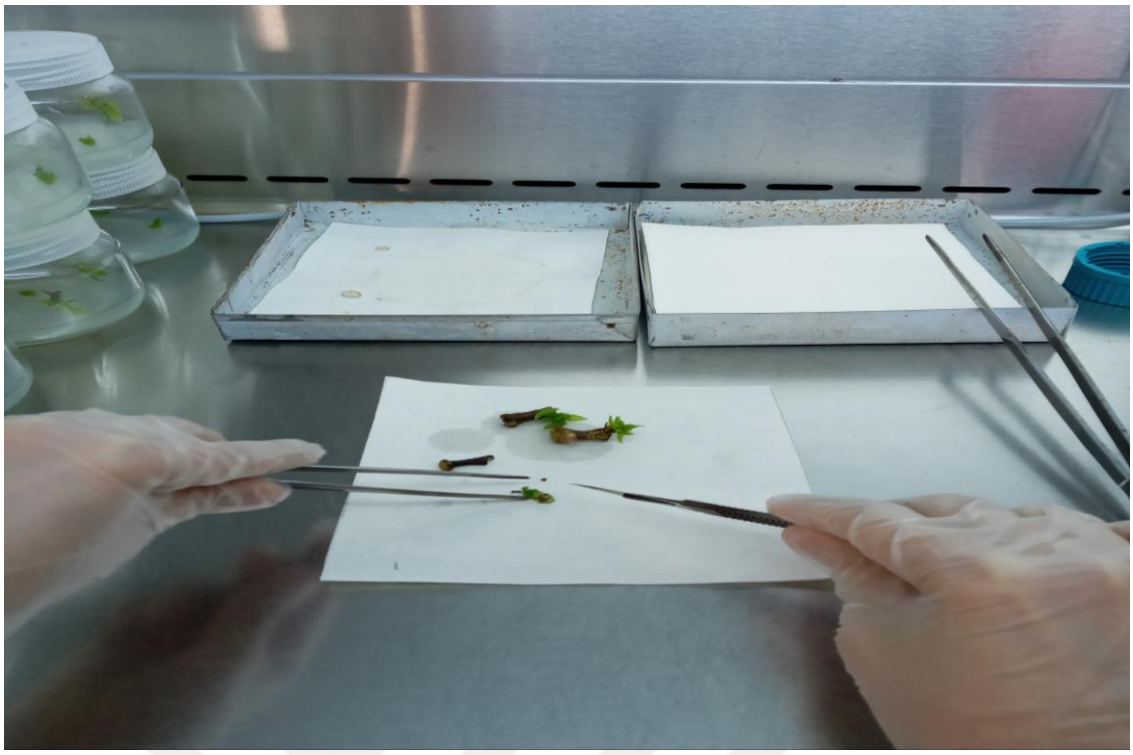
3.2.4.3. Eksplant başına düşen 0,5 cm altındaki sürgün sayısı (adet)

Çoğalma ortamına alınan eksplantlarda 4 hafta sonunda her eksplantta bulunan 0,5 cm altındaki sürgünler tek tek sayılmıştır. Her eksplant başına düşen toplam 0,5 cm altı sürgün sayısının toplam sürgün veren eksplant sayısına oranı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Demirkök, 2006).

$$\text{Eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)} = \frac{\text{Alt kültürdeki 0,5 cm altı sürgün sayısı}}{\text{0,5 cm altı sürgün veren eksplant sayısı}}$$

3.2.4.4. Ortalama sürgün uzunluğu (cm)

Çoğalma ortamına alınan eksplantlarda 4 hafta sonunda sürgün oluşturan eksplantların sürgün uzunlukları cetvel ile ölçülmüş ve toplam sürgün sayısına bölünerek ortalama sürgün uzunluğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.5. Steril kabinde kültüre alma çalışmaları

3.2.5. Köklenme Üzerine Uygun Gıda Ortamı ve Yoğunluğu ile IBA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çoğaltma ortamından alınan 1.5-2.0 cm uzunluğuna gelmiş eksplantlar, tekrar alt kültüre alınmadan, köklenme ve kök büyümesi üzerine en uygun gıda ortamı (MS ve NRM) ve yoğunluğu (1/1 ve 1/2) ile IBA konsantrasyonunu (0.0, 1.0 ve 2.0 mg/l) belirlemek amacıyla köklenme ortamına alınmıştır. Deneme 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 3 bitki olacak şekilde kurulmuştur. Alt kültür boyunca köklenme oranları, kök sayısı ve kök uzunluğu incelenmiştir.

3.2.5.1 Köklenme oranı (%)

Köklenme ortamına alınan eksplantlarda 4 hafta sonunda köklenen eksplant sayısı sayılmıştır. Köklenen eksplant sayısının toplam eksplant sayısına oranının % hesabı (köklenme oranı) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Demirkök, 2006).

$$\text{Köklenme Oranı (\%)} = \frac{\text{Köklenen eksplant sayısı}}{\text{Toplam eksplant sayısı}} \times 100$$

3.2.5.1 Eksplant başına düşen kök sayısı (adet)

Köklenen her eksplantta bulunan kök sayıları tek tek sayılmıştır. Her eksplant başına düşen toplam kök sayısının toplam köklenen eksplant sayısına oranı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Demirkök, 2006).

$$\text{Eksplant başına düşen kök sayısı} = \frac{\text{Toplam kök sayısı}}{\text{Toplam köklenen eksplant sayısı}}$$

3.2.5.1. Kök uzunluğu (cm)

Köklenen eksplantlar tüplerden pens ile çıkartılarak köklerdeki gıda ortamından temizlenmiştir. Eksplantlarda oluşan her bir kökün uzunlukları cetvel ile ölçülmüştür.

3.2.6. Köklü Bitkiciklerin Dış Koşullara Alıştırılması

İn vitro ile çoğaltılan bitkiler açıkta yetiştirilen bitkilere göre daha hassastır. Bu yüzden doğrudan dışarıya aktarıldıklarında kuruma gösterirler. Bu sorunu çözmek için köklenmiş mikro sürgünler kademeli olarak dış koşullara aktarılması gerekmektedir. Bu işlem Nas ve Read (2004)'e göre yapılmıştır. 30 günlük köklendirme denemesi sonucu köklenen mikro sürgünlerin kökleri besin ortamından temizlemek için akan çeşme suyu altında kökler zarar görmeyecek şekilde yıkanmıştır. Kök yıkama işleminden sonra köklü bitkicikler torf ve perlit karışımıyla doldurulmuş pet bardaklara aktarılmıştır. Bitkiciklerin kurumasına neden olacak ortam nispi neminin kaybolmasını engellemek için pet bardakların üzeri şeffaf pet bardağı ile kapatılmıştır. İklim odasına (24 ± 1 °C, 16 /8 (ışık/karanlık)) konulan bitkilerin pişkinleşmesi için ikinci haftadan sonra pet bardakların üzerinde delikler açılmıştır. Bu şekilde ortamdaki nispi nemin tedrici olarak düşmesi sağlanmış ve yaklaşık iki hafta sonra pet bardak tamamen kaldırılmıştır. Plastik bardaklara dikili bitkiler yaklaşık iki ay kadar bir süre laboratuvarda bekletilmiş ve 15-20 cm uzunluğa ulaştıktan sonra sağlıklı bitkiler saksılara dikilip sera ortamında büyümeye bırakılmıştır.

3.2.4.5. Verilerin İstatistik Analizi

Yapılan uygulamaların etkileri 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 3 eksplant olacak şekilde incelenmiştir.

Elde edilen veriler SPSS istatistik programı kullanılarak %5'lik Duncan testi ile değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada 42-01 zerdali genotipinin *in vitro* mikro çoğaltımı araştırılmıştır. Bu amaçla farklı gıda ortamları (NRM ve MS) ve bitki büyüme düzenleyicileri (BA, IBA, GA) kullanılmıştır. Çalışma sırasında, bitkilerin canlılık oranları, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, köklenme oranı, kök sayısı ve kök uzunluğu ölçümleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

4.1. Sonuçlar

4.1.1. Uygulamaların Bitki Canlılığı, Sürgün Sayısı ve Sürgün Uzunluğu Üzerine Etkisi

Kültürlerin *in vitro'*da stabilizasyonunu ve en iyi mikroçoğaltım katsayısını sağlayacak gıda ortamını belirlemek amacıyla, eksplantlar 0,5 mg/l BA, 0,01 mg/l IBA ve 0,5 mg/l GA içeren NRM ortamında kültüre alınmış ve iki (başlangıç dâhil üç) alt kültürün sonunda eksplantlar farklı kombinasyonlarda BA (0, 0.5, 1.0 mg l^{-1}) ve IBA (0, 0.01, 0.025 mg l^{-1}) içeren NRM ve MS ortamları üzerinde alt kültüre alınmıştır. Kültüre alındıktan 4 hafta sonra bitkilerin canlılık oranları, sürgün sayısı ve sürgün uzunlukları ölçülmüştür. İstatik analizinde, bitkilerin canlılık oranları, bir eksplanttan oluşan sürgün sayısı ve bu sürgünlerin uzunluğu değerlendirmeye alınmıştır.

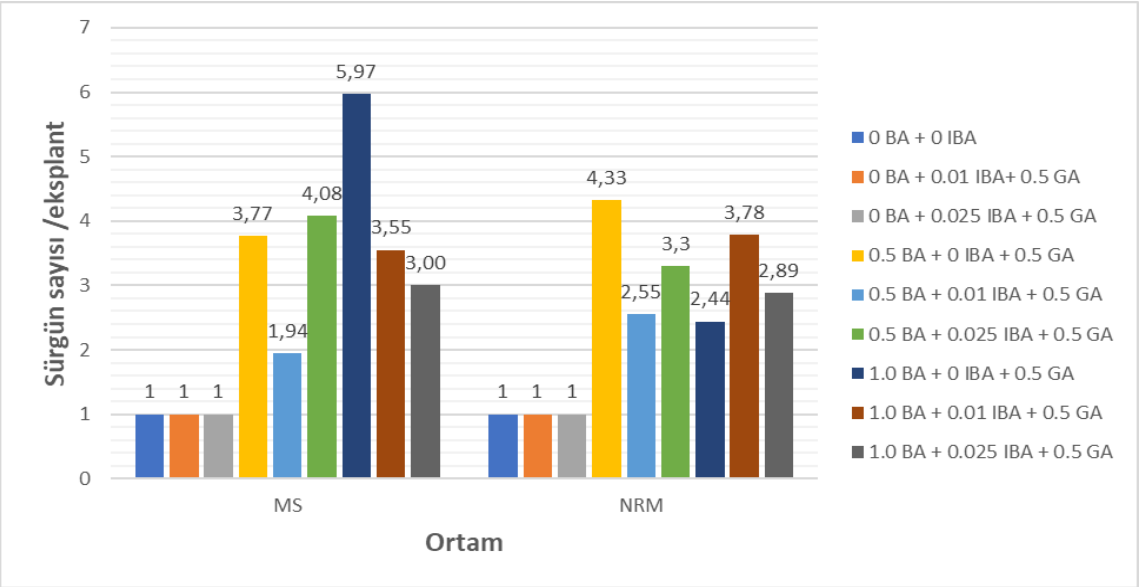
Bitkilerin canlılık oranlarına bakıldığında, 0,0 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA+ 0.5 mg/l GA içeren MS (%38,89) ve 0,0 mg/l BA + 0.025 mg/l IBA + 0.5 mg/l GA içeren NRM (%30,56) ortamı hariç, diğer tüm uygulamalarda oranlar %69,44-100,00 arasında değişmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Çoğaltma aşamasında MS ve NRM besi ortamları üzerinde 42-01 zerdali genotipinin bitki canlılığı oranları ve 0,5 cm altındaki sürgün sayıları

	MS		**NRM**	
BBD Konsantrasyon ve Kombinasyonları (mg/l)	Bitki Canlılığı (%)	Sür. Sayısı (0,5 cm altı) (adet/eksplant)	Bitki Canlılığı (%)	Sür. Sayısı (0,5 cm altı) (adet/eksplant)
0 BA + 0 IBA	69,4 c	0,0	69,4 c	0,0
0 BA + 0.01 IBA+ 0.5 GA	38,9 d	0,0	80,6 b	0,0
0 BA + 0.025 IBA + 0.5 GA	69,4 c	0,0	30,6 d	0,0
0.5 BA + 0 IBA + 0.5 GA	100,0 a	1,50	91,7 a	3,50
0.5 BA + 0.01 IBA + 0.5 GA	83,3 b	1,60	100,0 a	2,20
0.5 BA + 0.025 IBA + 0.5 GA	100,0 a	2,25	100,0 a	4,57
1.0 BA + 0 IBA + 0.5 GA	100,0 a	2,60	80,6 b	3,40
1.0 BA + 0.01 IBA + 0.5 GA	91,7 a	3,40	100,0 a	3,20
1.0 BA + 0.025 IBA + 0.5 GA	100,0 a	1,50	91,7 a	2,50

Doku kültüründe rejenerasyon çalışmalarında alt kültüre alınacak eksplantın steril kabinde kesim sırasında kolaylık sağlaması, gıda ortamında canlılığını koruması ve sağlıklı gelişim göstermesi açısından belirli bir boya ulaşmış olması önem taşımaktadır. Sürgün sayısı ölçümünde iki farklı değer elde edilmiştir. Birincisi 0,5 cm ve üstündeki uzunluğa sahip sürgünler, ikincisi 0,5 cm altındaki uzunluğa sahip sürgünler. 0,5 cm ve üstündeki sürgünler esas aldığımız sürgün sayısıdır. Çünkü doku kültüründe rejenerasyon çalışmalarında alt kültüre alınacak eksplantın belirli bir boya ulaşması çalışmanın etkinliği için önem taşımaktadır. Bu yüzden 0,5 cm ve üzerindeki eksplantlar çalışmanın etkinliği için daha önemlidir.

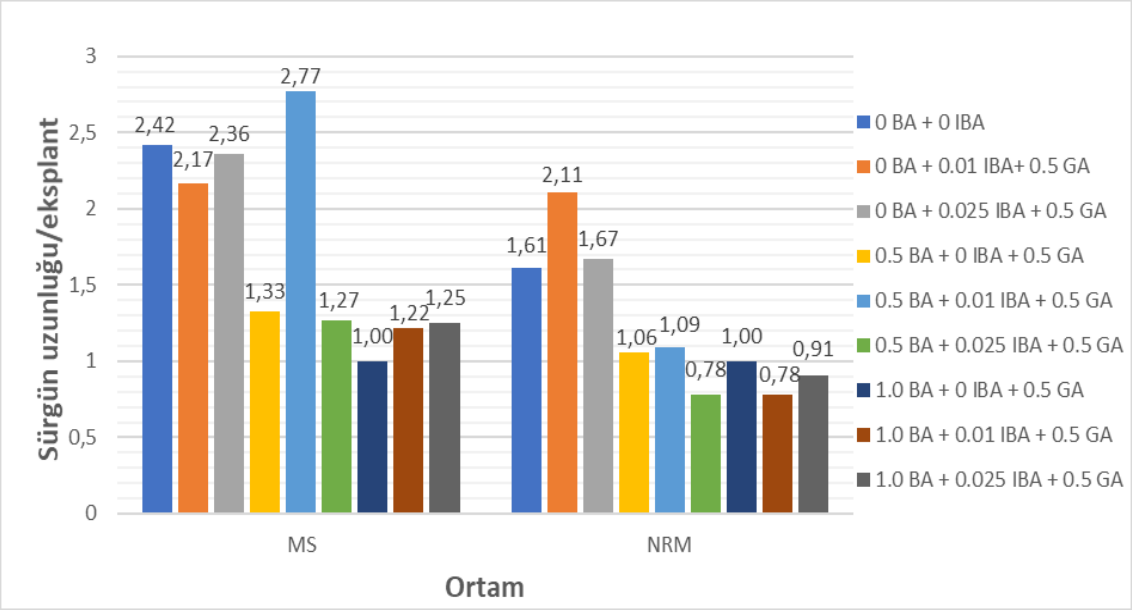
Kültür ortamının bileşimi ve BBD konsantrasyon ve kombinasyonları, eksplant başına meydana gelen **0,5 cm ve üstü** uzunluktaki sürgün sayısı bakımından etkili bulunmuştur. Bir eksplanttan oluşan en yüksek ortalama sürgün sayısı 1,0 mg/l BA+0,0 mg/l IBA+0,5 mg/l GA içeren MS (5,97 adet/eksplant) ortamında bulunmuştur. NRM ortamı için en yüksek ortalama sürgün sayısı 0,5 mg/l BA+0,0 mg/l IBA+0,5 mg/l GA uygulamasında kaydedilmiştir (4,33 adet/eksplant). BA ilavesi olmayan uygulamalarda rejenerasyon sağlanamamıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kültür ortamına ve BBD kombinasyonlarına bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen **0,5 cm ve üstü** uzunluktaki ortalama sürgün sayısı

0,5 cm altı sürgün sayıları incelendiğinde ise en iyi sonuç 0,5 mg/l BA+0,025 mg/l IBA+0,5 mg/l GA içeren NRM ortamından elde edilmiştir (4,57). NRM ortamında 0,5 mg/l BA içeren uygulamalarda elde edilen sürgün sayıları 2,2-3,5 adet/eksplant; 1,0 BA mg/l içeren uygulamalarda 2,5-3,4 adet/eksplant arasında değişmiştir. NRM ortamından elde edilen 0,5 cm altındaki sürgün sayıları, MS ortamından daha yüksek çıkmıştır. MS ortamında en yüksek sürgün sayıları sırasıyla 1.0 mg/l BA + 0.01 mg/l IBA + 0.5 mg/l GA (3,40 adet/eksplant) ve 1.0 mg/l BA + 0,0 mg/l IBA + 0.5 mg/l GA (2,60 adet/eksplant) içeren uygulamalardan elde edilmiştir. 0,5 mg/l BA içeren uygulamalarda 1,5-2,25 adet/eksplant arasında değişmştir. BA ilavesi olmayan uygulamalarda ne NRM ne de MS ortamında sürgün elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

Sürgün uzunluğu bakımından farklı uygulamalar incelendiğinde gıda ortamının ve BBD kombinasyonlarının sürgün uzunluğu üzerine etkisinin önemli olduğu bulunmuştur. En uzun sürgün oluşumu 0,5 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA + 0,5 mg/l GA içeren MS ortamından elde edilmiştir (2,77 cm). MS ortamının diğer tüm uygulamalarında sürgünler en fazla 2,42 cm' ye kadar uzamıştır. NRM ortamında ise en uzun sürgünler 2,11 cm ile 0,0 mg/l BA + 0,01 mg/l IBA+ 0,5 mg/l GA uygulamasından elde edilmiştir. NRM ortamının diğer tüm uygulamalarında eksplantlarda gelişen sürgünler 1,67 cm'den fazla uzamamıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Kültür ortamına ve BBD kombinasyonlarına bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen ortalama sürgün uzunlukları



Şekil 4.3. 42-01 zerdali genotipinin farklı gıda ortamları ve BBD kombinasyonlarındaki gelişimi

4.1.2. Uygulamaların Köklenme Üzerine Etkisi

In vitro sürgün çoğalma ortamında, kök oluşumunu desteklemek her zaman mümkün değildir. Bu nedenle sürgünler, kök oluşumunu uyaracak oksin tabiatındaki BBD içeren bir büyüme ortamına aktarılmalıdır. Bu çalışmada, kök oluşumunu uyarmak için farklı konsantrasyonlarda (0.0, 1.0 ve 2.0 mg/l) IBA içeren $^{1}/_{1}$ ve ½ yoğunluktaki MS ve NRM ortamları kullanılmıştır.

Çalışmanın sonuçları, köklenme oranının, farklı ortam ve yoğunluğu ile IBA'nın konsantrasyonlarından etkilendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, yapılan uygulamalar kök sayısını ve uzunluğunu da etkilemiştir. Sonuçlar, IBA'nın köklenme üzerindeki etkisini açık bir şekilde göstermektedir. En iyi köklenme oranı %61,11 ile 2,0 mg/l IBA içeren ½ MS ortamında kaydedilmiştir. IBA takviyesi olmayan $^{1}/_{1}$ MS ortamında köklenme tespit edilmezken, ½ MS ortamında ise çok düşük köklenme oranı (%11,11) kaydedilmiştir. NRM ortamında ise en yüksek köklenme oranı 1.0 mg/l IBA içeren ½ NRM ortamında %58,33 olarak belirlenmiştir. IBA ilavesiz uygulamalarda düşük de olsa köklenme tespit edilmiştir. IBA' sız NRM ve ½ NRM uygulamalarında sırasıyla %11,11 ve %16,67 oranında köklenme tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Eksplant başına oluşan kök uzunlukları bakımından kültür ortamının bileşimi ve IBA konsantrasyonunun etkili olduğu bulunmuştur. Yarı yoğunluktaki (½ MS ve ½ NRM) gıda ortamlarından elde edilen kök uzunlukları, tam yoğunluktaki (MS ve NRM) gıda ortamlardan elde edilen kök uzunluklarından daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2).

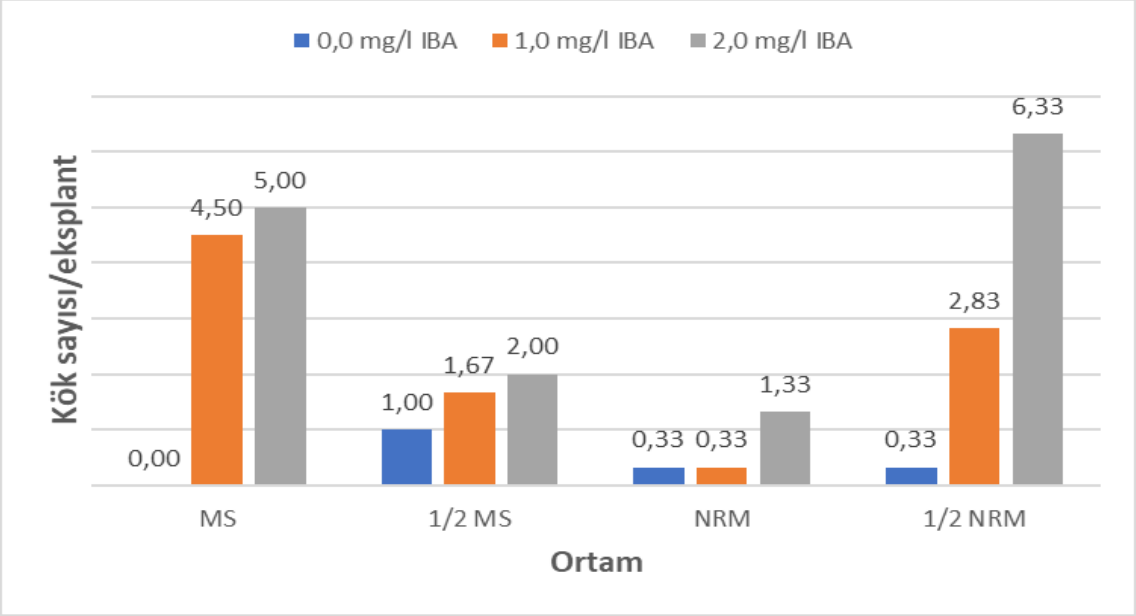
IBA takviyeli gıda ortamlarından elde edilen kök uzunlukları incelendiğinde en yüksek kök uzunluğu 2 mg/l IBA içeren ½ NRM (2.46) ortamında kaydedilmiştir. Diğer 2 mg/l IBA içeren ortamlarda kök uzunlukları 1.21-1.72 cm/eksplant arasında değişmiştir. 1 mg/l IBA içeren diğer tüm ortamlarda kök uzunlukları 1.83-2.21 cm arasında değişmiştir (Çizelge 4.2).

IBA takviyesi olmayan gıda ortamlarından elde edilen kök uzunluklarına bakıldığında ise MS ortamında sürgün kaydedilmediğinden sürgün uzunluğu değerlendirilmemiştir; NRM ortamında ise çok düşük bir değer (0.83) kaydedilmiştir. Yarı yoğunluktaki iki ortam (½ MS, ½ NRM) için aynı değerler (2.33) kaydedilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Köklenme aşamasında kullanılan farklı ortam yoğunluğu ve IBA konsantrasyonlarının köklenme oranı ve kök uzunluğu üzerine etkisi

IBA Konsantrasyonları	Köklenme Oranı (%)				Kök Uzunluğu (cm)			
	MS	½ MS	NRM	½ NRM	MS	½ MS	NRM	½ NRM
0,0 mg/l IBA	0,00 c	11,11 c	11,11 b	16,67 c	0,00 b	2,33 a	0,83 b	2,33 a
1,0 mg/l IBA	44,44 b	33,33 b	16,67 a	58,33 a	1,86 a	2,21 a	1,83 a	2,15 a
2,0 mg/l IBA	50,00 a	61,11 a	16,67 a	50,00 b	1,70 a	1,72 b	1,21 ab	2,46 a

Mikroçeliklerde köklenmeyi teşvik etmek amacıyla yapılan IBA uygulamalarının köklenme üzerine etkili olduğu buna karşılık IBA uygulanmayan mikroçeliklerde köklenmenin olmadığı veya çok düşük olduğu tespit edilmiştir. En yüksek kök sayısı 2,0 mg/l IBA içeren ½ NRM ortamında (6.33) tespit edilmiştir. Daha sonra sırasıyla 2,0 mg/l IBA içeren MS (5), 1,0 mg/l IBA içeren MS (4,5) ve 1,0 mg/l IBA içeren ½ NRM (2,83) ortamlarında kaydedilmiştir. Diğer IBA takviyeli uygulamalarda kaydedilen kök sayısı 2' yi geçememiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. Farklı ortam yoğunluğu ve IBA konsantrasyonlarına bağlı olarak bir eksplanttan meydana gelen ortalama kök sayıları



Şekil 4.5. Sağlıklı büyüyen ve kök oluşturan bitkiler

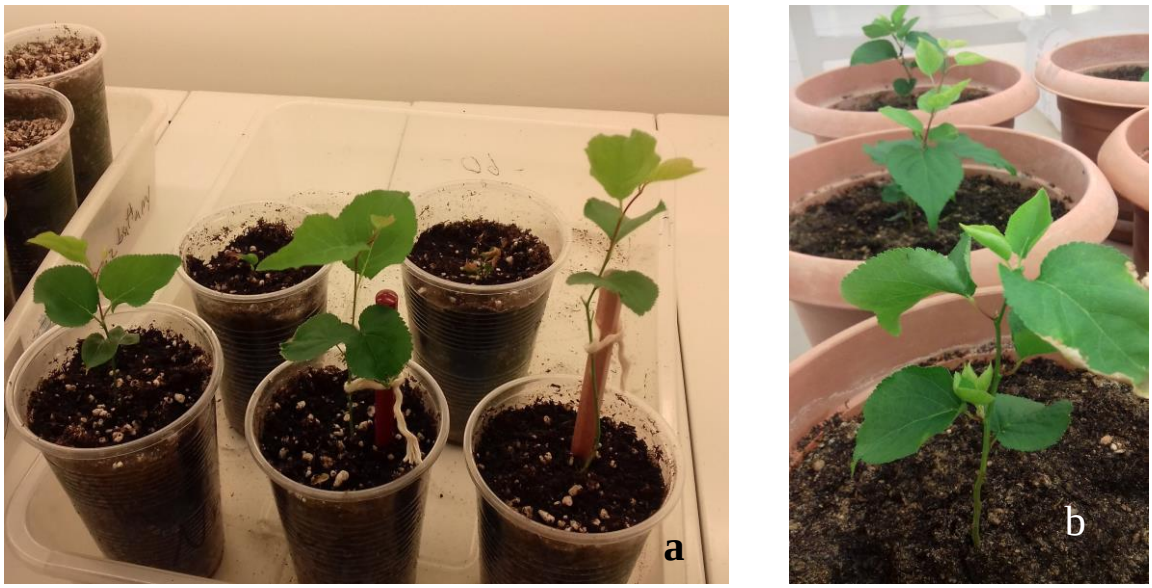
4.1.3 Köklü Bitkiciklerin Dış Koşullara Alıştırılması

Köklenmiş ve sağlıklı görünen bitkicikler öncelikle torf-perlit karışımı içeren bardaklara dikilmiş ve belirli bir süre laboratuvar şartlarında büyümeye bırakılmıştır. Bu aşamada bitkiler kök oluşturmaya devam etse de sürgünlerin büyük bir oranında görülen apikal nekroz, zamanla yaprakların sararmasına, dökülmesine ve sonunda bitkinin ölümüne neden olmuştur (Şekil 4.4). Bardaklarda sağlıklı büyüme ve gelişme gösteren bitkiler (**a**) daha sonra saksılara dikilmiş ve seraya bırakılmıştır (**b**) (Şekil 4.5).

Torf-perlit karışımı içeren bardaklara dikilen, köklenmiş ve sağlıklı 13 bitkicikten sadece 5 tanesi hayatta kalmaya devam etmiştir (Şekil 4.5).



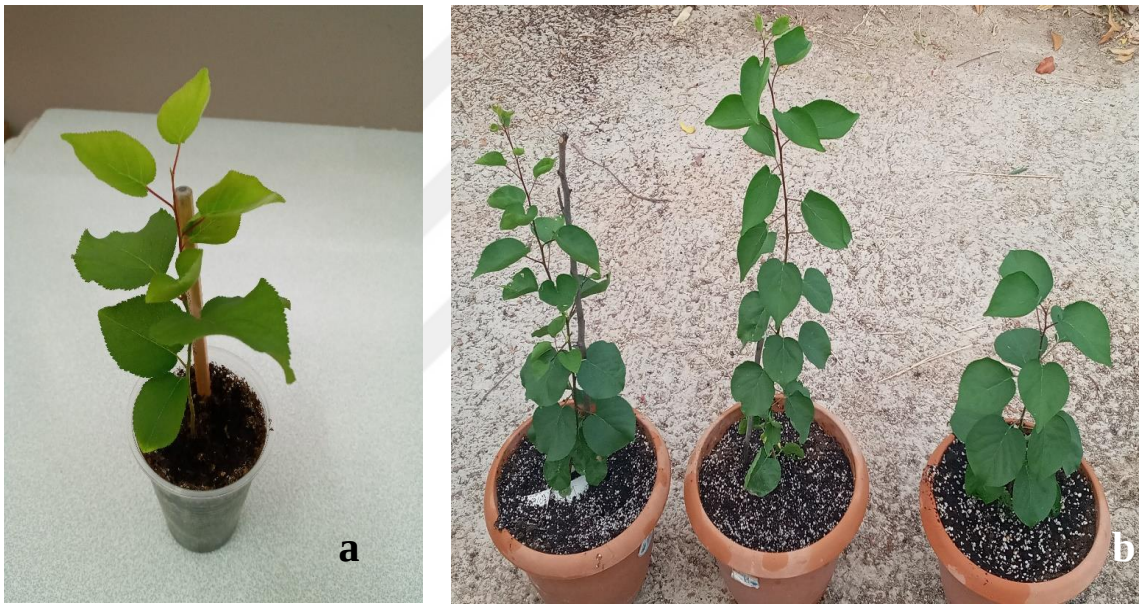
Şekil 4.6. Apikal nekroz sonucu yaprak döken ve ölen bitkiler



Şekil 4.7. Sağlıklı büyüme ve gelişme gösteren bitkilerin (**a**) saksılara dikilmesi ve seraya çıkarılması (**b**)



Şekil 4.8. Deneme sonunda hayatta kalan bitkiler



Şekil 4.9. Torf-perlit karışımı içeren bardağa dikilip laboratuvarda bekletilen bitki (**a**) ve saksılara dikilip serada büyümeye devam eden bitkiler (**b**)

4.2 TARTIŞMA

In vitro çoğaltılan bitkilerde karşılaşılan zorluklardan biri başlangıçta ve çoğaltım aşamasında karşılaşılan mikrobiyal kirliliklerden kaynaklanan kontaminasyonlardır. Bu yüzden, çalışmada yapılacak ilk ve en önemli aşama kullanılacak olan bitki materyalinin yüzey sterilizasyonunun yapılmasıdır ve bunun için en uygun yönteme karar verilmesidir. Bitkinin büyüdüğü ortam, türü, yaşı ve mikro çoğaltımda kullanılan bitki parçasının yüzey sterilizasyonunun başarısını etkilediği birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Sathyanarayana ve Verghese, 2007; Wolella, 2017).

Çalışmamızda, yüzey sterilizasyonu amacıyla eksplantlar öncelikle %70 etil alkol (EtOH) içerisinde yaklaşık 1 dakika, daha sonra litreye 10 damla Tween–20 içeren %30'luk ticari çamaşır suyu solüsyonu içerisinde 15 dakika bekletilmesi sonucunda dekontaminasyon için iyi sonuçlar vermiştir. Yapılan ön çalışmalarda dezenfektanların (etil alkol ve çamaşır suyu) daha düşük dozlarda (%20-25) kullanılması sonucunda yüksek kontaminasyon oranları ile karşılaşılmıştır. Çalışmamızın sonraki alt kültür aşamalarında mikrobiyal (bakteriyel ve fungal) bulaşmalar ara sıra görülmüştür. Bu bulaşıklıkların çalışma hatalarından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Zenna (2020), 10 dakika boyunca %15 Clorox (çamaşır suyu) veya %0.1 $HgCl_2$ (cıva klorür) uygulayarak sırasıyla hem dekontaminasyon (100 ve 90,2) hem de hayatta kalma (90 ve 92) yüzdeleri için en iyi sonuçları verdiğini ileri sürmüştür. Vujović ve ark. (2012) %10 ticari çamaşır suyu çözeltisinde 12 dakika bekletmenin, Prunus anaçları için etkili sterilizasyon faktörü olduğunu ileri sürmüştür. Ayrıca Yıldırım ve ark. (2011), Clorox konsantrasyonunun %5'ten %20'ye yükseltilmesinin kayısı (*Prunus armeniaca*) koltuk altı tomurcuklarının kontaminasyon yüzdesi ile ters orantılı olduğunu öne sürmüştür. Önceki yapılan çalışmalarda elde edilen bulgularla bizim elde ettiğimiz sonuçlar arasında bazı farklılıkların olduğu görülmektedir. Yüzey sterilizasyonunda etkinliği belirleyen en önemli hususlardan birisi eksplantın alındığı ana bitkinin bulunduğu ortamdır. Genel olarak seradaki bitkilerden alınan eksplantlarda daha düşük yoğunluklarda dezenfektanların ve kısa sürelerin kullanılması etkili sonuçlar verirken dışardaki bitkilerden alınan eksplantlarda kontaminasyon ancak daha yüksek yoğunluklar ve uzun süreler kullanılarak önlenebilmektedir. Çalışmamızda eksplant aldığımız ana bitki dışarıda olduğundan diğer çalışmalarda kullanılan dezenfektan yoğunluğu ve sürelerine göre daha fazla olması ile istenen sonuçlara ulaşılabilmiştir.

Çalışmada, ilkbahar mevsiminde (mart ayı) zerdali tipinin yeni büyüyen sürgünlerinin koltuk altı tomurcukları kullanılmıştır. İlk kültüre alma işlemi sonucunda düşük kontaminasyonla karşılaşılmış, buna karşın eksplantların sürme oranı düşük çıkmıştır. Elde edilen sonuçlar dönemden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ön çalışmalarımızda mayıs-haziran aylarında alınan eksplantlarda tam tersi sonuçlar alınmıştır. Bu dönemlerde alınan eksplantların sürme oranları yüksek çıkmış, ancak kontaminasyon oranları da yüksek çıkmıştır. Khafri ve ark. (2021), kayısıda en yüksek aktif tomurcuk sayısının yaz mevsiminde toplanan yan tomurcuk eksplantlarından elde edildiğini tespit etmiştir. Yıldırım ve ark. (2011) kayısıda yaptığı çalışmada en iyi kültüre başlama zamanının mayıs ayı olduğunu tespit etmiştir. Bununla birlikte, Pérez-Tornero ve ark. (1997) kayısıda meristemleri başlatmak için en uygun mevsimin tomurcuk dinlenmesi dönemi olduğunu ileri sürmüştür.

Yapılan ön çalışmalardan kültür oluşturma ve sürgün çoğalımı üzerine eksplantın alındığı dönemin etkisi çok büyük görülmüştür. Yaz döneminde (mayıs-haziran) alınan eksplantların hem sürme oranı hem de çoğalma katsayıları daha yüksek çıkmış ve koltuk altında bulunan tomurcukların hepsi sürgün oluşturmuştur. Bu da o dönemde aldığımız tomurcukların farklılaşmadığını; yani çiçek tomurcuğuna dönüşümün gerçekleşmediğini göstermektedir. Özellikle çelikle çoğaltmada çelik üzerinde çiçek tomurcuklarının bulunması çoğaltma başarısını olumsuz etkilediği bilinen bir durumdur. Benzer bir şekilde in vitro çoğaltmada da eksplantlarda çiçek tomurcuklarının varlığı gerek tomurcuk sürmesini gerekse rejenerasyon katsayısını olumsuz etkiliyor olabilir. Mart ayında hazırladığımız eksplantların üzerinde çiçek tomurcuklarının bulunması buna karşılık mayıs-haziran aylarında hazırlanan eksplantlarda çiçek tomurcuklarının henüz oluşmamış olması bu sonucu destekler nitelikte görünmektedir. Çiçek tomurcuğu farklılaşması ve gelişimi çeşit ve iklim koşullarına göre farklılık göstermektedir. Ülkemizin batı bölgelerinde, sert çekirdekli meyve türlerinde farklılaşmanın, genel olarak, haziran-eylül döneminde olduğu bildirilmektedir (Engin ve ark., 2014). Acarsoy Bilgin ve Mısırlı (2015) çiçek tomurcuğu gelişimini inceledikleri çalışmada Kabaaşı, Hacıhaliloğlu, Precoce de Tyrinthe, Şekerpare ve Tokaloğlu kayısı çeşitlerinde İzmir; buna karşılık, Iğdır çeşidinde ise İzmir ve Malatya lokasyonlarından alınan örneklerde mikroskobik gözlemler yapmıştır. Araştırma sonucunda Kabaaşı çeşidinde, morfolojik ayrımın başlangıcı Temmuz ayının son günlerine rastlamış, Hacıhaliloğlu çeşidinin morfolojik ayrım zamanı 18 Temmuz, Precoce de Tyrinthe çeşidinin 10 Temmuz, Şekerpare

çeşidinin 16 Temmuz ve Tokaloğlu çeşidinin 15 Temmuz olarak gözlenmiştir. Iğdır çeşidinde ise morfolojik ayrım başlangıcı Malatya ve İzmir ekolojilerinde sırasıyla 12 ve 20 Temmuz tarihinde gözlenmiştir. Genel olarak, kayısı çeşitlerinde yapılan incelemeler sonucunda, çiçek tomurcuğu farklılaşması ve gelişiminin temmuz ayında başladığı ve çiçeklenmenin mart ayında gerçekleştiği görülmüştür.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, BA ilavesi olmayan ortamlarda sürme oranları çok düşük olmuştur, IBA dozunun ise canlılık üzerine etkisi önemsiz görülmüştür. Hepaksoy (2017) GF 677 klon anacının sürgün ucu yöntemiyle çoğaltılması amacıyla MS gıda ortamını kullandığı çalışmada sürgün uçlarının canlılık oranının %38 ile %60 arasında değiştiğini ve BAP konsantrasyonu arttıkça canlılık oranının da artmış olduğunu tespit etmiştir. Çalışmamızda kullandığımız eksplant koltukaltı tomurcuklarıdır ve bunlar alındıkları döneme göre tepe hakimiyeti veya tepe denetiminin etkisi altındadırlar. Bu durum özellikle oksinlerin yönetiminde olup yan tomurcukların sürmesi oksinlerce engellenmektedir. Buna karşılık sitokininler yan tomurcukların sürmesini doğrudan uyardığı bilinen bitki hormonlarıdır. Bu açıdan gıda ortamına sitokinin tabiatındaki BA ilavesinin sürme oranını artırması aksine oksin tabiatındaki IBA'nın olumsuz veya etkisiz olması beklenen bir durumdur.

In vitro çalışmalarda, gıda ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileri, sürgün rejenerasyonunu en çok etkileyen faktörlerin başında gelmekte ve gıda ortamındaki oksin-sitokinin dengesinin iyi ayarlanması sonucunda yüksek oranda sürgün rejenerasyonunun elde edilebileceği değişik araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Özcan ve ark., 1993; Özcan ve ark., 1996; Uranbey ve ark., 2003; Erdoğan ve ark., 2004).

Yapılan çalışmalar dikkate alındığında sürgün çoğalımında kullanılan sitokinin tip ve dozlarının bitki türleri arasında farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Sürgün çoğalımı, BA konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilenmiştir. Ayrıca çoğalma üzerine gıda ortamları da etkili olmuştur. 1,0 mg/l BA içeren MS ortamı en iyi sonucu verirken (5,97 adet/eksplant), NRM ortamında ise 0,5 mg/l BA en iyi sonucu vermiştir (4,33 adet/eksplant). BA ilavesi olmayan ortamlardan rejenerasyon sağlanamamıştır. Yıldırım ve ark. (2011) Hacıhaliloğlu kayısı çeşidinin sürgün çoğalımında en iyi sonucu 1 mg L^{-1} BA' dan elde etmişlerdir. Zenna (2020), erikte yaptığı çalışmada 1.5 veya 2 mg/L BAP'ın, 2-ip ve Kin. ile karşılaştırdığında sürgün oluşumunu uyarmak için güçlü olduğunu ileri sürmüştür. Bu sonuçlar, Ružić ve Vujović (2008)'in *Prunus* üzerinde ve Ghareeb ve Taha (2018)'nın *Antigonon leptopus* üzerinde elde ettiği sonuçlar ile uyumlu

olmuştur: BAP 'ın TDZ, 2-ip ve kinetin'den daha belirgin etki gösterdiğini öne sürmüşlerdir. Benzer şekilde Murai ve ark. (1997) 'Bakuoh junkyou' kayısı çeşidinde sürgün çoğalımı için test ettikleri 3 çeşit sitokinin arasından (BA, zeatin ve 2-İP) en etkili BA olduğunu ileri sürmüştür . Bu konuda George (1993), BAP' ın tomurcuk dinlenmesini ortadan kaldırdığını ve yan tomurcuklardan sürgün oluşumunu uyardığını belirtmiştir. Fakat yüksek miktarda BAP (2.0 veya 3.0 mg/l BAP) kullanıldığı zaman Texas ve Nonpareil (*Amygdalus communis* L.) badem çeşitlerinin sürgünlerinde camlaşma, sürgünlerin canlılığında düşme ve kallus oluşumuna sebep olmuştur (Gürel ve Gülşen, 1998a). Pérez-Tornero ve ark. (2000) 'Helena' kayısı yapraklarından adventif sürgün rejenerasyonunu amaçladığı çalışmada TDZ yerine 6-benzilamino-purin (BAP) kullanıldığında rejenerasyon yüzdeleri çok düşük çıktığını ileri sürmüştür. Wang ve ark. (2013) olgun kayısı kotiledonlarından en yüksek rejenerasyon yüzdelerini TDZ (4 veya 8 µM) ile elde etmişler. Pakyürek ve Hepaksoy (2019) Marianna GF 8/1, Myrobolan B, Myrobolan 29-C ve St. Julien A klon anaçlarının doku kültürü ile çoğaltma olanaklarını araştırdıkları çalışmada, en iyi çoğalmayı 1 mg L^{-1} BAP ilave edilen MS ortamından elde etmişlerdir. Gürel ve Gülşen (1998a) Texas ve Nonpareil (*Amygdalus communis* L.) badem çeşitlerinin 1 mg/l BA'nın en iyi çoğalma sonucu gösterdiğini ifade etmişlerdir. Hepaksoy (2017) GF 677 klon anacının sürgün ucu tekniğiyle çoğaltılması amacıyla MS gıda ortamını kullandığı çalışmada en iyi çoğalmayı 2.0 mg/l BAP içeren MS ortamından elde ederek elde ettiğimiz sonuçtan farklı bir sonuç elde etmiştir.

Çalışmamızda kullanılan çeşitli konsantrasyonlardaki BA, sürgün uzunluğu üzerinde önemli bir etki göstermiştir. 0,5 mg/L BA kullanılması, hücre genişlemesi ve dolayısıyla sürgün uzaması ile sonuçlanmıştır. En yüksek sürgün uzunluğu (2,77 cm) 0.5 mg/L BA içeren MS ortamında bulunmuştur. Murai ve ark. (1997) zeatin ve 2-İP'nin kayısı sürgün uzaması için BA' dan daha etkili olduğunu tespit etmiştir. Zenna (2020), erikte en uzun sürgünleri (1.92 cm) 1.5 mg/L 2-ip ilaveli MS ortamında kaydetmiştir. Yıldırım (2012) 1 mg/l BAP ile desteklenmiş MS ve WPM besi ortamlarında, Hacıhaliloğlu çeşidinin sürgün uzunluğunu sırasıyla 11.56 mm (MS) ve 11.86 mm (WPM) olarak ölçmüştür.

In vitro köklendirme, mikroçoğaltılmada başarıya ulaşmada en önemli aşamadır. Meyve ağaçları gibi odunsu bitkilerde mikroçoğaltma başarısını en fazla olumsuz etkileyen safha köklenmenin ya hiç olmaması ya da yetersiz olmasıdır. Köklenme yeteneği, gıda ortamının tuz kuvvetine ve IBA yoğunluğuna göre önemli ölçüde

değişmiştir. Önceki çalışmalar, gıda ortamında makro ve mikro tuzların yarı yarıya azaltılmasının genellikle bazı bitki türlerinin köklenmesini iyileştirdiğini ileri sürmüştür (Trejgell ve ark., 2009). ½ MS ve ½ NRM ortamındaki sürgünlerde, tam MS ve tam NRM ortamında kültürlenenlere kıyasla daha yüksek köklenme yüzdeleri belirlenmiştir. In vitro sürgün çoğalma ortamında, kök oluşumunu desteklemek her zaman mümkün değildir. Bu nedenle sürgünler, kök oluşumunu uyaracak oksin tabiatındaki BBD içeren bir büyüme ortamına aktarılmalıdır. IBA'nın mikro çoğaltılmış sürgünler üzerindeki etkisi Asghar ve ark. (2011) tarafından araştırılmış ve in vitro çoğaltılmış mikro sürgünlere oksin eklenmesinin, enzimlerin endojen içeriklerinin aktivasyonu ile oluşan köklerin sayısını arttırdığını belirtmişlerdir. Başka bir çalışma, IBA'nın IAA' ya dönüşümünü, kök başlatma için gerekli olan peroksizomal nitrik oksidi izlediğini ileri sürülmüştür (Schlicht ve ark., 2013). Mikroçeliklerde köklenmeyi teşvik etmek amacıyla yapılan IBA uygulamalarının köklenme üzerine etkili olduğu buna karşılık IBA uygulanmayan mikroçeliklerde köklenmenin olmadığı veya çok düşük olduğu tespit edilmiştir. ½ MS kültür ortamına 2,0 mg/l IBA eklenmesi ve ½ NRM kültür ortamına 1,0 mg/l IBA eklenmesi sürgünlerin sırasıyla %61,11 ve %58,33 köklenmesini sağlamıştır. En yüksek kök sayısı sırasıyla 2,0 mg/l IBA içeren ½ NRM (6.33 kök/bitki) ortamında ve 2,0 mg/l IBA içeren MS (5,0 kök/bitki) ortamında tespit edilmiştir. En yüksek kök uzunluğu 2,0 mg/l IBA içeren $^1/_2$ NRM (2,46 cm) ortamında tespit edilmiştir. Yıldırım ve ark. (2011) Hacıhaliloğlu kayısı çeşidinde en iyi köklenme oranını 2,0 mg L^{-1} indol-3-bütirik asit (IBA) ilave edilmiş MS besi ortamından elde etmişler. Pérez-Tornero ve ark. (2015) 'Canino' kayısı çeşidinde ise en iyi köklenme yüzdelerini (%92,8 ± 2.5) 2 mg l^{-1} NAA içeren ortamdan elde ederken, sürgün başına en fazla kök sayısını (5.3± 0.5) 6 mg l^{-1} IBA içerikli ortamdan elde etmiştir. Pakyürek ve Hepaksoy (2019) Marianna GF 8/1, Myrobolan B, Myrobolan 29-C ve St. Julien A klon anaçlarının doku kültürü ile çoğaltma olanaklarını araştırdıkları çalışmada köklendirme aşamasında 8 farklı MS ortamının denendiği ortamlardan en iyi köklenmeyi 2 mg /l IBA içeren $^1/_2$ MS gıda ortamından sağlamıştır.

Alt kültür sayısının arttırılması ile özellikle zor köklenen türlerde farklı BBD ve ortam koşullarının iyileştirilmesinin yanında iyi bir köklenmenin sağlanabileceği çeşitli araştırmalarda kaydedilmiştir. Örneğin Nas ve Read (2004) zor köklenen fındık mikro sürgünleri için uygun gıda ortamı belirledikten sonra alt kültür sayısını arttırarak mikro sürgünlerde %95'in üzerinde bir köklenme elde etmişlerdir. Aynı şekilde Welander (1985) alt kültür sayısını arttırarak elma mikro sürgünlerinde köklenme oranını

arttırmıştır. 42-01 zerdali genotipinin mikro sürgünlerinde daha iyi bir köklenmenin sağlanması için farklı dönemlerde kültüre başlamanın, farklı BBD ve konsantrasyonları ile denemelerin devam ettirilmesi gerekmektedir.

In vitro kayısı kültürü ile ilgili çalışmalar, genellikle tüm kültür aşamalarında zorluklar olduğunu göstermektedir (Koubouris ve Vasilakakis, 2006; Pérez-Tornero ve Burgos, 2007). Çalışmamızda özellikle köklenme ve dış ortama aktarım sırasında sürgünlerin apikal nekrozu bu türün *in vitro* çoğalmasını olumsuz etkileyebilecek ana faktörler arasında tanımlanmıştır. Pérez-Tornero ve Burgos (2007)'un yine kayısıda yaptıkları bir çalışmada benzer olumsuzluklar bildirilmiştir.

Sürgün ucu nekrozu, *in vitro* olarak bitkiciklerde veya sürgünlerde ortaya çıkabilen ve sürgün ucunun ölümüyle sonuçlanabilen fizyolojik bir durum ve bozukluktur. Çok çeşitli türlerde *in vitro* bitki sürgün kültürlerinin büyümesini ve gelişmesini olumsuz etkiler. Çeşitli türlerin (De Block, 1990; Sita ve Swamy, 1993; Amo-Marco ve Lledo, 1996) sürgün kültürlerinde gözlenmiş ve *in vitro* çoğalmalarını engellemiştir. Çalışmamızda, uç yaprakların tepe kısmında kloroz görülmesi, çoğalan sürgünlerde görülen ilk belirtilerdir. Kloroz, alt yapraklara doğru kademeli olarak artmakta ve 3-4 haftalık kültürden sonra sürgünlerin gelişimini durdurmakta veya tam ölümüne yol açmaktadır. Sürgün ucu nekrozunun benzer belirtileri antepfıstığı, muz ve Parwal (sivri kabak)'da tanımlanmıştır (Abousalim ve Mantell, 1994; Martin ve ark., 2007; Kishore ve ark., 2015). Fruktoz ve kalsiyum klorür kombinasyonunun (0.50 + 1.0 mM) sürgün ucu nekrozu problemini kontrol etmek için iyi yöntem olduğu bulunmuştur (Thakur ve ark., 2021). Sürgün ucu nekrozu, hem sürgün çoğaltma hem de köklenme aşamalarında meydana gelebilir, nekroza neden olan en yaygın faktörlerden biri, besin eksikliği veya dengesizliğidir. Ayrıca, belirli gelişim aşamalarında bitki büyüme düzenleyicilerinin (oksinler ve sitokininler) varlığı veya yokluğu da nekrozu etkileyebilir (Da Silva ve ark., 2020).

Bairu ve ark. (2009) sürgün ucu nekrozuna neden olan faktörleri araştırdıkları çalışmada in vitro kültürlerdeki sürgün ucu nekrozunun çok çeşitli faktörlerden etkilendiğini ve farklı türlerin farklı faktörlerden etkilenebildiğini belirtmiştir. En çok belirtilen nedenlerden biri kalsiyum (Ca) eksikliğidir. Ca eksikliği aynı zamanda çilek (*Fragaria × ananassa Duchesne*) ve sebzeler (Mason ve Guttridge, 1975; Saure, 1998) gibi tarlada yetişen ürünlerin yapraklarında ve saplarında görülen uç yanık bozukluğunun bir nedenidir ve sürgün ucu nekrozu belirtileri bunlara çok benzemektedir (Da Silva ve ark., 2020). De Block (1990), sürgün ucu nekrozunun Ca

eksikliği ile bağlantılı olduğunu ve Woody Plant Medium (WPM) kullanımıyla ilişkili olduğunu bulmuştur. De Block (1990) ayrıca sürgün ucu nekrozu oluşumunun, WPM ortamında sürgünler tarafından amonyum (NH^{+4}) alımının bir sonucu olarak, orta pH' daki bir düşüşten kaynaklanmış olabileceğini belirtmiştir.

Sürgün ucu nekrozunun, en sık *Rosaceae*' de (% 20.5), ardından *Anacardiaceae*'de (% 12.3) görüldüğü ifade edilmektedir (Da Silva ve ark., 2020).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

In vitro çoğaltılan bitkilerde karşılaşılan zorluklardan biri başlangıçta ve çoğaltım aşamasında karşılaşılan mikrobiyal kirliliklerden kaynaklanan kontaminasyonlar olmasına rağmen çalışmamızın başlangıç aşamasında %60-70 oranında temiz materyal elde edilmiştir. Daha sonraki alt kültür aşamalarında ise yok denecek kadar az kontaminasyonla karşılaşılmıştır. Bu açıdan kullandığımız yüzey sterilizasyonu uygulamalarının oldukça etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmada incelediğimiz bitki canlılığı, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, köklenme oranı, kök sayısı ve kök uzunluğunun kültür ortamına ve BBD konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. BA ilavesi olmayan çoğalma ortamlarında rejenerasyon sağlanamamıştır. IBA ilavesi olmayan köklendirme ortamlarında ise kök oluşumu hiç kaydedilmemiş veya çok düşük köklenme kaydedilmiştir. Bundan dolayı gerek rejenerasyon gerekse köklendirme aşamasında istenen sonuçların alınabilmesi için mutlaka gıda ortamına gerekli BBD ilavesinin yapılmasına ihtiyaç olduğu görülmektedir.

42-01 zerdali genotipi için *in vitro* mikroçoğaltım protokolünün geliştirilmesi amacıyla yapılan bu çalışmada karşılaşılan en ciddi problem, özellikle köklenme ve dış ortama aktarım sırasında sürgünlerin apikal nekrozu sonucu bitkinin ölmesidir. Bu aşamada laboratuvar şartlarından dış ortama alıştırmada kullanılacak kontrollü bir seramızın bulunmamasının önemli etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, kayısının doku kültürü çoğaltmasında karşılaşılan bu sorun bizim kullandığımız anaç adayında da ortaya çıkmıştır.

5.2 Öneriler

Bu çalışma, sürgün rejenerasyonu ile ilgili gelecekteki çalışmalar için daha etkili BBD konsantrasyonları ve kombinasyonları için bir referans görevi görebilir. Çalışma sterilizasyon, kültüre başlama, sürgün rejenerasyonu, köklenme ve dış ortama alıştırmayı içeren 42-01 zerdali genotipinin *in vitro* mikro çoğaltılması prosedürünü bildirmektedir.

Kültüre başlamak için eksplantın alındığı dönem önemli görülmüştür. Çalışmamıza mart ayında başlanmış ve ilk kültüre başlangıç aşamasında eksplantların

sürme oranları düşük olmuştur. Ancak yaptığımız ön çalışmalarda mayıs-haziran aylarında aldığımız eksplantların sürme oranları çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca bu dönemde tomurcuk farklılaşması gerçekleşmediğinden koltukaltındaki tomurcukların hepsinden sürgün oluşumunun meydana geldiği belirlenmiştir. Bu yüzden bu aylarda kültüre başlamayı, daha hızlı ve yüksek çoğalma sağlayacağı için önerebiliriz.

Sürgün uçları, bitki doku kültüründe önemli bir eksplanttır. Sürgünlerin apikal nekrozu, protokolün başarısını sınırladığından bu problemin ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

Daha yüksek oranlarda köklenmenin sağlanabilmesi için zor köklenen türlerde ortam koşullarının iyileştirilmesi, alt kültür sayısının arttırılması ve sıvı kültürün kullanılması etkili olabilir.

Ayrıca laboratuvar şartlarından dış ortama alıştırmada kullanılacak kontrollü bir seranın varlığı da elde edilen bitkilerin saksılara dikildikten sonra hayatta kalmalarında önem taşıyacaktır.

KAYNAKLAR

Uncategorized References

Abousalim, A. ve Mantell, S., 1994, A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in in vitro shoot cultures of Pistacia vera cv. Mateur, *Journal of horticultural science*, 69 (2), 357-365.

Acarsoy Bilgin, N. ve Mısırlı, A., 2015, Bazı Kayısı Çeşitlerinin Çiçek Tomurcuğu Gelişiminin İncelenmesi.

Amo-Marco, J. ve Lledo, M., 1996, In vitro propagation ofSalix tarraconensis Pau ex Font Quer, an endemic and threatened plant, *In Vitro–Plant*, 32 (1), 42-46.

Anonim, 2020, https://www.tarimorman.gov.tr/.

Arıcı, Ş. E., 2008, Bazı Sert Çekirdekli Meyve Anaçlarının Doku Kültürü İle Çoğaltılması, *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3 (1), 19-23.

Asghar, S., Ahmad, T., Hafiz, I. A. ve Yaseen, M., 2011, In vitro propagation of orchid (Dendrobium nobile) var. Emma white, *African Journal of Biotechnology*, 10 (16), 3097-3103.

Asma, B., 2000, Kayısı Yetistiriciligi, Evin Ofset, Malatya.

Bairu, M. W., Stirk, W. A. ve Van Staden, J., 2009, Factors contributing to in vitro shoot-tip necrosis and their physiological interactions, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 98 (3), 239-248.

Balla, I. ve Vertesy, J., 2000, In vitro culture of Hungarian apricot (Prunus armeniaca L.) varieties, *IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560*, 395-398.

Campbell, R., 1985, Plant microbiology, Edward Arnold Ltd, p.

Cassells, A., 2000, Contamination and its impact in tissue culture, *IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560*, 353-359.

Cati, M., Gennari, F. ve Marino, G., 2014, Effect of culture jar seal on in vitro rooting and subsequent acclimatization of three Italian apricot varieties, *Scientia Horticulturae*, 168, 120-123.

Channuntapipat, C., Sedgley, M. ve Collins, G., 2003, Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock Titan× Nemaguard, *Scientia Horticulturae*, 98 (4), 473-484.

Cos, J., Frutos, D., Sÿnchez, M., Rodriguez, J. ve Carrillo, A., 2002, Determination of the optimal culture medium and growth regulator concentration for the in vitro proliferation stage of the peach-almond hybrid Mayor®, *I International Symposium on Rootstocks for Deciduous Fruit Tree Species 658*, 617-622.

Da Silva, J. A. T., Nezami-Alanagh, E., Barreal, M. E., Kher, M. M., Wicaksono, A., Gulyás, A., Hidvégi, N., Magyar-Tábori, K., Mendler-Drienyovszki, N. ve Márton, L., 2020, Shoot tip necrosis of in vitro plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions, *Planta*, 252 (3), 1-35.

Damiano, C. ve Monticelli, S., 1998, In vitro fruit trees rooting by Agrobacterium rhizogenes wild type infection, *Electronic Journal of Biotechnology*, 1 (3), 12-13.

De Block, M., 1990, Factors influencing the tissue culture and the Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones, *Plant Physiology*, 93 (3), 1110-1116.

Demirkök, Ş. G., 2006, GF-677, AK-1 ve AK-2 Badem x Şeftalİ melez anaçlarinin sürgün ucu yöntemİyle in vitro klonal mİkroçoğaltimi

Yüksek Lisans, *Çukurova Üniversitesi*, Adana, 47.

Engin, H., Gökbayrak, Z., Akçal, A., Gür, E. ve Sch, L. V., 2014, Gibberellic acid inhibits floral formation and delays flower differentiation in '0900 Ziraat'sweet cherry cultivar, *Eur. J. Hort. Sci*, 79, 260-266.

Erdoğan, Y., ÇÖÇÜ, S., PARMAKSIZ, İ., SANCAK, C. ve ARSLAN, O., 2004, Burçak (Vicia ervilia (L.) Wild.) Bitkisinin Olgunlaşmamış Embriyo Eksplantlarından Adventif Sürgün Rejenerasyonu ve Hızlı Çoğaltım.

Erturk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor, M., Ozdemir, F. ve Turkan, I., 2007, Responses of the cherry rootstock to salinity in vitro, *Biologia Plantarum*, 51 (3), 597-600.

Escalettes, V. ve Dosba, F., 1993, In vitro adventitious shoot regeneration from leaves of Prunus spp, *Plant Science*, 90 (2), 201-209.

FAO, 2021, Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://www.fao.org. Erişim Tarihi: 23.05.2021.

Fotopoulos, S. ve Sotiropoulos, T., 2005, In vitro rooting of PR 204/84 rootstock(Prunus persica x P. amygdalus) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period, *Agronomy research*, 3 (1), 3-8.

George, E. F., 1993, Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology, Ed. 2, Exegetics limited, p.

Ghareeb, Z. F. ve Taha, L. S., 2018, Micropropagation protocol for Antigonon leptopus an important ornamental and medicinal plant, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16 (2), 669-675.

Güney, M., 2019, Development of an in vitro micropropagation protocol for Myrobalan 29C rootstock, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43 (6), 569-575.

Gürel, S. ve Gülşen, Y., 1998a, The effects of IBA and BAP on in vitro shoot production of almond (Amygdalus communis L.), *Turkish Journal of Botany*, 22 (6), 375-380.

Gürel, S. ve Gülşen, Y., 1998b, The effects of different sucrose, agar and pH levels on in vitro shoot production of almond (Amygdalus communis L.), *Turkish Journal of Botany*, 22 (6), 363-374.

Hazarika, B., 2006, Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants, *Scientia Horticulturae*, 108 (2), 105-120.

Hepaksoy, S., 2017, GF 677 (P. amygdalus x P. persica) Klon Anacının Doku Kültüründe Sürgünucu Tekniği ile Çoğaltılması, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 54 (4), 447-451.

Jain, S. M. ve Ishii, K., 2012, Micropropagation of woody trees and fruits, Springer Science & Business Media, p.

Kamali, K., Majidi, E. ve Zarghami, R., 2001, Micropropagation of GF-677 rootstocks (Prunus amygdalus x P. persica), *Seed and Plant*, 17, 175-177.

Kamışlı, N. ve Kargı, S. P., 2020, The Effects Of Two Different Media On The Rooting Of Wild Plum Genotypes Reproduced In Vitro By Shoot Tip Culture.

Khafri, A. Z., Solouki, M., Zarghami, R., Fakheri, B., Mahdinezhad, N. ve Naderpour, M., 2021, In vitro propagation of three Iranian apricot cultivars, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57 (1), 102-117.

Kishore, K., Patnaik, S. ve Shukla, A., 2015, Optimization of method to alleviate in vitro shoot tip necrosis in Trichosanthes dioica Roxb.

Koubouris, G. ve Vasilakakis, M., 2006, Improvement of in vitro propagation of apricot cultivar 'Bebecou', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85 (2), 173-180.

Kovalchuk, I. Y., Mukhitdinova, Z. R., Turdiyev, T. T., Madiyeva, G. A. ve Reed, B. M., 2017, Optimization of in vitro growth medium for a wild Kazakhstan apricot, Prunus armeniaca, *Acta Horticulturae* (1155), 193-200.

Lauri, P., Caboni, E. ve Damiano, C., 2000, In vitro adventitious shoot regeneration from vegetative apices of almond and other Prunus species, *IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560*, 403-406.

Marín, M. L. ve Marin, J., 1998, Excised rootstock roots cultured in vitro, *Plant cell reports*, 18 (3-4), 350-355.

Marino, G. ve Noferini, M., 2013, Effect of the type of closure for culture bottles on micropropagation efficiency of apricot, *Scientia Horticulturae*, 161, 306-313.

Martin, K. P., Zhang, C.-L., Slater, A. ve Madassery, J., 2007, Control of shoot necrosis and plant death during micro-propagation of banana and plantains (Musa spp.), *Plant cell, tissue and organ culture*, 88 (1), 51-59.

Mason, G. ve Guttridge, C., 1975, The influence of relative humidity and nutrition on leaf tipburn of strawberry, *Scientia Horticulturae*, 3 (4), 339-349.

Mitrofanova, O. V., Mitrofanova, I. V., Kuzmina, T. N., Lesnikova-Sedoshenko, N. P. ve Dolgov, S. V., 2019, In vitro adventitious shoot regeneration from leaf explants of some apricot cultivars, *Ciência e Agrotecnologia*, 43.

Mourenets, L. Y. ve Dolgov, S. V., 2016, Adventitious shoot regeneration from leaf explants of two apricot rootstocks, *Acta Horticulturae* (1139), 285-290.

Muna, A.-S., Ahmad, A.-K., Mahmoud, K. ve Abdul-Rahman, K., 1999, In vitro propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59 (3), 203-208.

Murai, Y., Harada, H. ve Yamashita, H., 1997, In vitro propagation of apricot (Prunus armeniaca L.) cv.'Bakuoh junkyou', *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 66 (3-4), 475-480.

Nas, M. N. ve Read, P. E., 2004, Improved rooting and acclimatization of micropropagated hazelnut shoots, *Hortscience*, 39 (7), 1688-1690.

Ozdemir, F. A. ve Gur, N., 2018, In vitro propagation of cataloglu apricot (Prunus armeniaca L.) cultivar using apical node as explant, *Prog Nutr*, 20 (1-S), 176-181.

Özcan, S., Barghchi, M., Firek, S. ve Draper, J., 1993, Efficient adventitious shoot regeneration and somatic embryogenesis in pea, *Plant cell, tissue and organ culture*, 34 (3), 271-277.

Özcan, S., Sevimay, C. S., Yildiz, M., Sancak, C. ve Özgen, M., 1996, Prolific shoot regeneration from immature embryo explants of sainfoin (Onobrychis viciifolia Scop.), *Plant cell reports*, 16 (3-4), 200-203.

Özçağıran, R., Ünal, A., Özeker, E. ve İsfendiyaroğlu, M., 2005, Ilıman İklim Meyve Türleri Sert Çekirdekli Meyveler, *İzmir*, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, p.

Pakyürek, M. ve Hepaksoy, S., 2019, A Study on In Vitro Propagation Possibilities of Some Clone Rootstocks of Prunus Species, *International Journal of Scientific and Technological Research*, 5 (9), 65-84.

Perez-Tornero, O. ve Burgos, L., 1999, Adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot, *Eucarpia symposium on Fruit Breeding and Genetics 538*, 659-662.

Perez-Tornero, O., Burgos, L. ve Lopez, J., 2006, Influence of explant type (meristem vs. axillary shoots) on the introduction and establishment in vitro of four apricot cultivars, *Acta Horticulturae*.

Pérez-Tornero, O., Burgos, L., Egea, J. ve Lopez, J., 1997, Apricot meristem tip culture, *XI International Symposium on Apricot Culture 488*, 411-416.

Pérez-Tornero, O., Egea, J., Vanoostende, A. ve Burgos, L., 2000, Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot, *Plant Science*, 158 (1-2), 61-70.

Pérez-Tornero, O., Egea, J., Olmos, E. ve Burgos, L., 2001, Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37 (2), 250-254.

Pérez-Tornero, O. ve Burgos, L., 2007, Apricot micropropagation, In: Protocols for micropropagation of woody trees and fruits, Eds: Springer, p. 267-278.

Pérez-Tornero, O., López, J. M., Egea, J. ve Burgos, L., 2015, Effect of basal media and growth regulators on thein vitropropagation of apricot (Prunus armenicaL.) cv. Canino, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75 (3), 283-286.

Rodrigues, A., Silveira, C., Fortes, G. d. L., Fachinello, J. ve da Silva, J., 2003, Establishment and multiplication in vitro of Prunus sp. in different culture media, *Revista Brasileira de Fruticultura (Brazil)*.

Ružić, D. V. ve Vujović, T., 2008, The effects of cytokinin types and their concentration on in vitro multiplication of sweet cherry cv. Lapins (Prunus avium L.), *Horticultural Science*, 35 (1), 12-21.

Sathyanarayana, B. ve Verghese, D. B., 2007, Plant tissue culture: practices and new experimental protocols, IK International Pvt Ltd, p.

Saure, M., 1998, Causes of the tipburn disorder in leaves of vegetables, *Scientia Horticulturae*, 76 (3-4), 131-147.

Schlicht, M., Ludwig-Müller, J., Burbach, C., Volkmann, D. ve Baluska, F., 2013, Indole-3-butyric acid induces lateral root formation via peroxisome-derived indole-3-acetic acid and nitric oxide, *New Phytologist*, 200 (2), 473-482.

Sita, G. L. ve Swamy, B. R., 1993, Regeneration of plantlets from leaf disc cultures of rosewood: control of leaf abscission and shoot tip necrosis, *Plant science*, 88 (1), 107-112.

Thakur, M., Sharma, V. ve Luharch, R., 2021, Propagation of plum (Prunus salicina L.) cultivar Frontier in vitro through control of shoot tip necrosis (STN) and validation of genetic integrity using ISSR markers, *Plant Physiology Reports*, 1-9.

Trejgell, A., Dąbrowska, G. ve Tretyn, A., 2009, In vitro regeneration of Carlina acaulis subsp. simplex from seedling explants, *Acta Physiologiae Plantarum*, 31 (3), 445-453.

TÜİK, 2021, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). https://www.tuik.gov.t. Erişim Tarihi: 23.05.2021.

Uranbey, S., Çöçü, S., Sancak, C., Parmaksız, İ., Khawar, K., Mirici, S. ve Özcan, S., 2003, Efficient adventitious shoot regeneration in cicer milkvetch, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17 (1), 33-37.

Vujović, T., Ružić, D. ve Cerović, R., 2012, In vitro shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks, *Horticultural Science*, 39 (3), 101-107.

Wang, H., Petri, C., Burgos, L. ve Alburquerque, N., 2013, Efficient in vitro shoot regeneration from mature apricot (Prunus armeniaca L.) cotyledons, *Scientia Horticulturae*, 160, 300-305.

Welander, M., 1985, In vitro shoot and root formation in the apple cultivar Åkerö, *Annals of botany*, 55 (2), 249-261.

Wolella, E. K., 2017, Surface sterilization and in vitro propagation of Prunus domestica L. cv. Stanley using axillary buds as explants, *Journal of Biotech Research*, 8, 18.

Yildirim, H., Onay, A., Tilkat, E. ve Aktürk, Z., 2011, Micropropagation of the apricot (Prunus armeniaca L.) cv. Hacıhaliloğlu by means of single node culture, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35 (1), 55-64.

Yıldırım, H., Tilkat, E., Onay, A. ve Ozen, H. Ç., 2007, In vitro embryo culture of apricot, Prunus armeniaca L. cv. Hacıhaliloğlu, *International Journal of Science & Technology*, 2 (2), 99-104.

Yıldırım, H., 2012, Bazı Yerli Kayısı Çeşitlerinin İn Vitro Embriyo Kültürleri Üzerine Besi Ortamı ve Genotipin Etkisi, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2 (2), 9-16.

Zenna, F. G., 2020, An efficient protocol for in vitro propagation of purple-leaf plum (Prunus cerasifera), *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 98 (3), 435-451.

Zhang, Q. C., Shamsi, I. H., Xu, D. T., Wang, G. H., Lin, X. Y., Jilani, G., Hussain, N. ve Chaudhry, A. N., 2012, Chemical fertilizer and organic manure inputs in soil exhibit a vice versa pattern of microbial community structure, *Applied Soil Ecology*, 57, 1-8.