



**T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

*Cerasus microcarpa (subsp. tortuosa) 'ın in vitro  
MİKROÇOGALTIMI*

**CİHAN PINAR**

**YÜKSEK LİSANS**

**KAHRAMANMARAŞ  
ŞUBAT 2009**



T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

*Cerasus microcarpa (subsp. tortuosa)*'ın *in vitro*  
**MİKROÇOGALTIMI**

CİHAN PINAR

YÜKSEK LİSANS

KAHRAMANMARAŞ  
ŞUBAT 2009

T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

*Cerasus microcarpa (subsp. tortuosa)*'ın *in vitro*  
**MİKROÇOĞALTIMI**

CİHAN PINAR

YÜKSEK LİSANS

Kod No:

Bu Tez 02/02/2009 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından  
Oy Birliği ile Kabul Edilmiştir.

Doç. Dr. Mehmet Nuri NAS  
DANIŞMAN

Doç. Dr. Yüksel BÖLEK  
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Mehmet SÜTYEMEZ  
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Süleyman TOLUN  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.  
Proje No: 105 O 554

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	III
ÖNSÖZ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
3. MATERYAL VE METOT.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.2. Metot.....	10
3.2.1. Aşama 0 (Eksplant Kaynağının Kültür İçin Hazırlanması).....	10
3.2.2. Aşama I ( Kültüre Başlangıç).....	11
3.2.3. Aşama II ( Kültürlerin Stabilizasyonu, Uygun BA Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Mikroçoğaltım.....	14
3.2.4. Aşama III ( Köklendirme).....	14
3.2.5. Aşama IV ( Pişkinleştirme ve Dış Ortama Aktarma).....	15
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	16
4.1. Genel Gözlemler.....	16
4.2. Genotip, Ortam ve Benzyadenine (BA) Konsantrasyonlarının Kültür Stabilizasyonu ve Gelişimi Üzerine Etkileri.....	17
4.3. Mikrosürgünlerin Köklendirilmesi ve Dış Ortama Aktarılması.....	23
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	25
KAYNAKLAR.....	26
ÖZGEÇMİŞ.....	30

T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

## YÜKSEK LİSANS

## ÖZET

*Cerasus microcarpa (subsp. tortuosa)*'ın *in vitro*  
MİKROÇOĞALTIMI

CİHAN PINAR

DANIŞMAN: Doç. Dr. Mehmet Nuri NAS

Yıl : 2009 Sayfa : 40

Jüri : Doç. Dr. Mehmet Nuri NAS

: Doç. Dr. Yüksel BÖLEK

: Yrd. Doç. Dr. Mehmet SÜTYEMEZ

Bu çalışmada, bilimsel bakımdan yeterince incelenmemiş ve yabani bir tür olan *Cerasus microcarpa (subsp. tortuosa)* için bir *in vitro* mikroçoğaltım protokolünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Dinlenme döneminde (kışın) damızlık bitkilerden alınan ve sürdürme (forsing) solüsyonuna konulan odun çeliklerinin sürmeleri sağlanmıştır. Odun çeliklerinin sürmesiyle meydana gelen yeni sürgünler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kültürlerin *in vitro*'da sürdürülebilirliğini, stabilizasyonunu ve en iyi mikroçoğaltım katsayısını sağlayacak Benzyladenin (BA) konsantrasyonu ve kültür ortamını belirlemek amacıyla, eksplantler 0.5, 1.0 ve 1.5 mg·l<sup>-1</sup> BA + 0.01 mg·l<sup>-1</sup> Indole-3- butyric acid (IBA) + 30 g·l<sup>-1</sup> sukroz içeren NRM, MS ve WPM ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır. Çalışmada bir eksplantten meydana gelen sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğu değerlendirilmiştir. Sürgün sayısı bakımından Genotip, Ortam ve Genotip x Ortam interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından Genotip, Ortam ve Genotip x BA interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur. En iyi sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu NRM ortamında 1.0 mg·l<sup>-1</sup> BA konsantrasyonunda elde edilmiştir. Olgun bitkilerden çoğaltılan mikrosürgünlerin köklenme oranı pratik bakımdan yetersiz (%5' ten az) bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: BA, *Cerasus microcarpa (subsp. tortuosa)*, *in vitro*, kültür ortamı, mikroçoğaltım.

UNIVERSITY OF KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM  
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES IN SCIENCE AND ENGINEERING  
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

MSc THESIS

ABSTRACT

*In vitro* MICROPROPAGATION of *Cerasus Microcarpa*  
(*subsp. tortuosa*)

Cihan PINAR

SUPERVISOR : Assoc. Prof. Dr. Mehmet Nuri NAS

Year : 2009    Pages : 40

Jury : Assoc. Prof. Dr. Mehmet Nuri NAS  
: Assoc. Prof. Dr. Yüksel BÖLEK  
: Assist. Prof. Dr. Mehmet SÜTYEMEZ

The objective of the current study was to develop a micropropagation protocol for *Cerasus microcarpa* (*subsp. tortuosa*), a wild and largely neglected *Prunus* species. Dormant cuttings taken from donor plants were forced to grow by using a forcing solution and newly developed shoots were used as the explant source. To determine benzyladenin (BA) concentrations that provide optimum micropropagation rate and the culture medium suitable for stabilization and sustainability of cultures, the explants were cultured on NRM, MS and WPM containing 0.5, 1.0 or 1.5 mg·l<sup>-1</sup> BA + 0.01 mg·l<sup>-1</sup> Indole-3- butyric acid (IBA) + 30 g·l<sup>-1</sup> sucrose. Mean number of shoots per cultured eksplant and mean shoot length were analyzed. In respect to mean number of shoot per cultured explants; the effects of Genotype, Culture Medium and Genotype x Culture Medium interaction were significant. In respect to mean shoot length; Genotype, Culture Medium and Genotype x BA interaction were significant. The highest shoot number and longest shoot length were obtained on NRM containing 1.0 mg·l<sup>-1</sup> BA. The rooting rate of microshoots propagated from mature plants was insufficient (less than 5%) for practical use.

Key words: BA, *Cerasus microcarpa* (*subsp. tortuosa*), *in vitro*, culture medium, micropropagation.

**ÖNSÖZ**

Henüz kültüre alınmamış bir tür olan *Cerasus microcarpa* (*subsp. tortuosa*) için *in vitro* mikroçoğaltım protokolünün geliştirilmesi amacıyla yapmış olduğum bu çalışmada bana gösterdiği yakın ilgi ve doku kültürü hakkında edindiğim bilgilere olan katkılarından dolayı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehmet Nuri NAS'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımnda benden desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım; Nevzat Sevgin, Mustafa Kaymaz ve Yakup Korkmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ailem ve nişanlım Özlem Durkal'a teşekkür ederim.

**KAHRAMANMARAŞ**  
**ŞUBAT 2009,**

**Cihan PINAR**

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<b>SAYFA</b>
<b>Çizelge 3.1. Nas ve Read [NRM, ( Nas ve Read, 2004a)], Murashige ve Skoog [MS, (Murashige ve Skoog, 1962)], ve Lloyd ve McCown [WPM, (Lloyd ve McCown, 1981)] kültür ortamlarının kimyasal bileşimi .....</b>	<b>13</b>
<b>Çizelge 4.1. Genotip, Ortam ve BA'nın sürgün sayısı üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi.....</b>	<b>17</b>
<b>Çizelge 4.2. Genotip, Ortam ve BA'nın sürgün uzunluğu üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi.....</b>	<b>18</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 1.1. Taksonların coğrafi dağılımını gösteren karelere bölünmüş Türkiye haritası .....	2
Şekil 3.1. Sürdürme solüsyonuna konulan odun çeliklerinin sürmesiyle meydana gelen yeni sürgünler (yeşil çelikler) .....	11
Şekil 3.2. Denemelerde kullanılan tek-boğum ve sürgün ucu eksplantler	12
Şekil 4.1. Kültürlerde meydana gelen eksplant kararması ve mikrobiyal bulaşmalar .....	16
Şekil 4.2. Genotiplere bağlı olarak bir eksplantten meydana gelen ortalama sürgün sayısı.....	18
Şekil 4.3. Genotiplere bağlı olarak meydana gelen sürgünlerin ortalama uzunlukları.....	19
Şekil 4.4. Kültür ortamına bağlı olarak bir eksplantten meydana gelen ortalama sürgün sayısı.....	19
Şekil 4.5. Kültür ortamına bağlı olarak meydana gelen sürgünlerin ortalama uzunlukları.....	20
Şekil 4.6. Farklı BA konsantrasyonlarında bir eksplantten meydana gelen sürgün sayısı.....	21
Şekil 4.7. Farklı BA konsantrasyonlarında meydana gelen sürgünlerin ortalama uzunlukları.....	21
Şekil 4.8. Genotip x Ortam interaksiyonunun bir eksplantten meydana gelen sürgün sayısı üzerine etkisi.....	22
Şekil 4.9. Genotip x Ortam interaksiyonunun ortalama sürgün uzunluğu üzerine etkisi.....	23
Şekil 4.10. Köklendirme işleminden yaklaşık 30 gün sonra oluşan köklenmeler.....	24

**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>BA</b>	<b>: Benziladenin (N-6 Benzyladenine)</b>
<b>GA3</b>	<b>: Gibberellik Asit 3 (Gibberallic Acid 3)</b>
<b>IBA</b>	<b>: İndolbütirik Asit (Indole-3-butyric Acid)</b>
<b>NRM</b>	<b>: Nas ve Read Ortamı</b>
<b>MS</b>	<b>: Murashige ve Skoog Ortamı</b>
<b>WPM</b>	<b>: Lloyd ve McCown (Woody Plant) Ortamı</b>

## 1.GİRİŞ

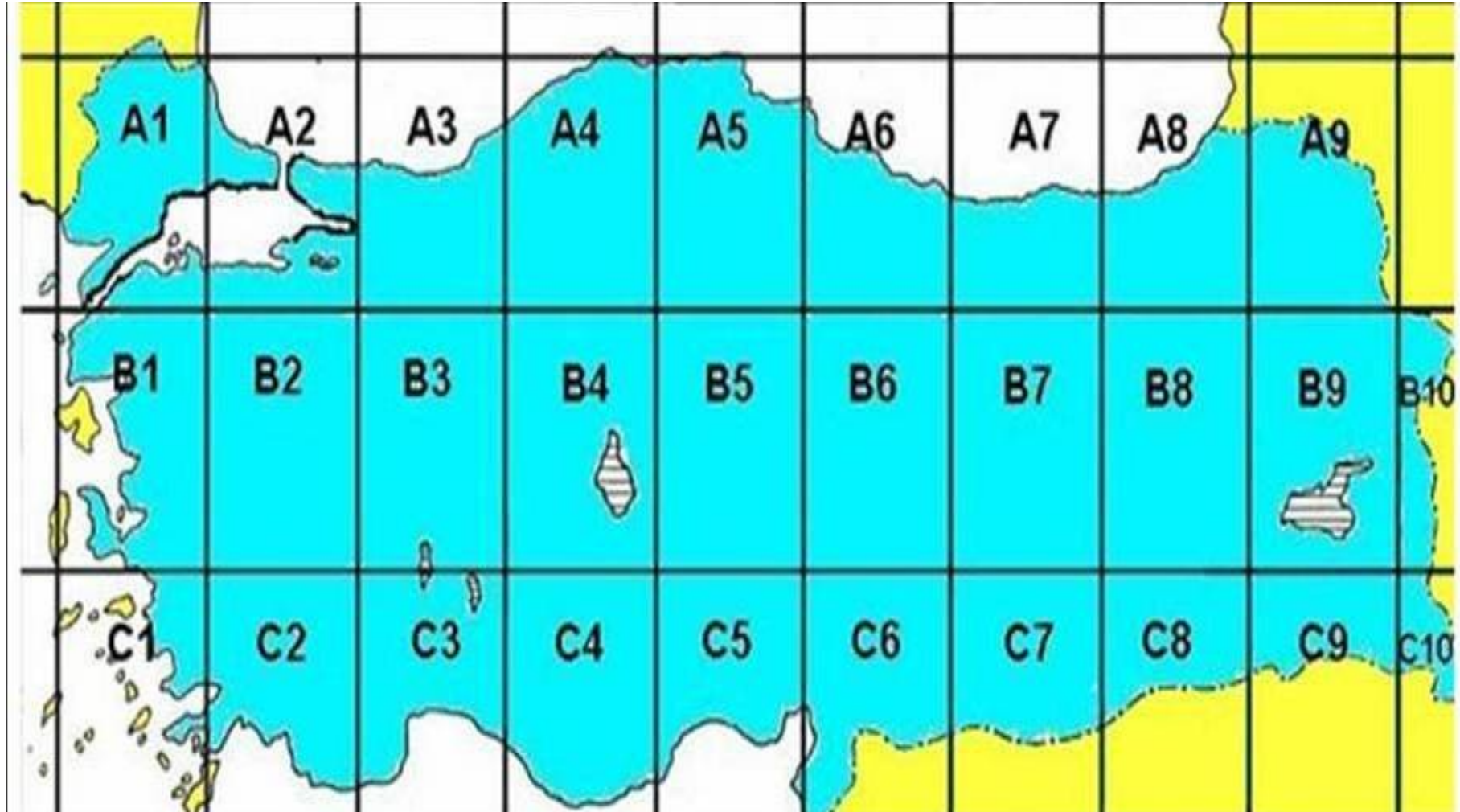
Türkiye meyve yetiştiriciliği bakımından önemli ülkeler arasında yer almaktadır. Dünya üzerinde kültüre alınan meyve türlerinin birçoğu ülkemizde doğal olarak bulunmakta ve bunlardan birçoğunun yetiştiriciliği ticari olarak yapılabilmektedir. Kültür meyvelerinin yanında doğal olarak bulunan yabancı meyve türleri de ülkemizde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Ancak yabancı meyve türlerinin potansiyelinden yeterince faydalandığımızı söylemek mümkün değildir. Yeterince değerlendirilmemiş olan bu türlerden biri *Cerasus microcarpa*’dır.

Ülkemizde; kayısı, şeftali, erik, kiraz ve badem gibi *Prunus* cinsine ait türlerin birçok çeşidi ticari olarak yetiştirilmektedir. Fakat bu çeşitlere yönelik anaç geliştirme çalışmalarına ülkemizde yeterince önem verilmemiştir. Bu nedenle *Prunus* türleri için kullanılan anaçlar bakımından büyük ölçüde yabancı ülkelere bağımlı durumdayız.

Dünyada yıllar önce başlatılmış olan meyve anaçları geliştirme (ıslah) çalışmaları günümüzde halen devam etmektedir. Çünkü her bakımdan mükemmel olan anaçlar henüz geliştirilmemiştir. Örneğin, meyve türleri için kullanılan bazı anaçların çeşitli çevre koşullarına uyum sorunu veya çeşitli hastalıklara karşı duyarlılığı çeşitli problemlere sebep olabilmektedir. Bu sorunların ortadan kaldırılması için yabancı türlerin ıslah programlarına dahil edilmesi gerekmektedir (Webster ve ark., 2000).

Türkiye yabancı meyve türleri bakımından oldukça zengindir. Bu yabancı türler arasında anaç olarak kullanılabilir üstün özelliklere sahip bireylerin bulunma ihtimali bulunmaktadır. Anaç olarak kullanılma potansiyeline sahip türlerden birisi *Cerasus microcarpa*’dır. Bugüne kadar, bu türle ilgili henüz herhangi bir ıslah çalışması yapılmamıştır. Bu yabancı türün potansiyelinden yararlanmaya yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Rosaceae familyasına ait *Cerasus microcarpa* (*subsp. tortuosa*) ülkemizin Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde doğal olarak bulunmaktadır. Bitlis, Mardin, Hakkâri, Siirt ve Şırnak illerinde 400–1800 m rakıma sahip genellikle kayalık ve kalkerli olan yamaçlar ve meşe ormanları arasında yayılış göstermektedir (Türkiye Bitkileri Veri Servisi – <http://www.tubitak.gov.tr/tubives>). *Cerasus microcarpa*’nın *subsp. microcarpa* ve *subsp. tortuosa* olmak üzere ülkemizde iki alt türü bulunmaktadır. Bu tür ülkemizin B6, B7, B8, B9, C6, C8, C9 ve C10 karelerinde bulunmaktadır (Şekil 1). Dünyada ise Güney Batı ve Orta Asya, Afganistan ve Transhazar bölgelerinde yayılış gösterir. Doğal yayılış alanlarının ekolojik koşulları düşünüldüğünde bu türün anaç geliştirme için önemli bir gen kaynağı olabileceği düşünülmektedir. *Cerasus microcarpa* (*subsp. tortuosa*) genellikle 1.5 m den daha fazla büyümektedir. Bu nedenle *Cerasus microcarpa*’nın bazı meyve türleri için bodurlaştırıcı anaç potansiyeline sahip olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 1.1. Taksonların coğrafi dağılımını gösteren karelere bölünmüş Türkiye haritası. *Cerasus microcarpa* (subsp. *tortuosa*); B6, B7, B8, B9, C6, C8, C9 ve C10 karelerinde doğal yayılış göstermektedir (<http://www.tubitak.gov.tr/tubives>).

Türkiye’de ve diğer ülkelerde *Cerasus microcarpa*’nın anaçlık potansiyeli ve çoğaltımı ile ilgili yapılmış olan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu türle ilgili sınırlı sayıda sadece taksonomik bilgilere rastlanmıştır. Bu nedenle, anaç olarak kullanılma potansiyeline sahip olan *Cerasus microcarpa (subsp. tortuosa)* için bir *in vitro* mikro çoğaltım protokolünün geliştirilmesi bu çalışmanın konusu olarak seçilmiştir.

Günümüzde dünya üzerinde meydana gelen değişimlerin iklim üzerindeki olumsuz etkilerini belirgin bir şekilde görmekteyiz. Küresel ısınmadan kaynaklanan ve her geçen gün etkisini arttıran kuraklık problemiyle mücadele etmek amacıyla meyve yetiştiriciliğinde kuraklığa dayanıklı ve daha az sulama isteyen yabancı türlerin önemi her geçen gün artmaktadır. Buna paralel olarak bu yöndeki bilimsel çalışmalarda artış gözlenmektedir. *Cerasus microcarpa (subsp. tortuosa)*’nın soğuğa ve kuraklığa dayanıklılığı bu türün anaç olarak değerlendirilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Fakat bu türle ilgili olarak bu amaca yönelik yapılmış herhangi bir çalışma bulunmadığından söz konusu türün anaçlık potansiyeli bilinmemektedir. Anaç olarak kullanılma potansiyelinin ortaya konulabilmesi amacıyla bu tür için ilk önce generatif ve /veya vejetatif çoğaltma protokollerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu hedefe ulaşmanın bir ilk adımı olarak, ülkemizin doğal bir türü olan *Cerasus microcarpa (subsp. tortuosa)*’nın *in vitro* mikro çoğaltılması imkanlarının araştırılması bu çalışmanın amacını teşkil etmektedir.

**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Bu çalışmanın konusu olarak seçilen *Cerasus microcarpa* henüz kültüre alınmamış bir türdür. Bu türle ilgili olarak sadece sınırlı sayıda taksonomik çalışmaya ulaşılabilmektedir. Söz konusu türün çoğaltılması veya farklı amaçlar için kullanılma potansiyeli hakkında herhangi bir bilimsel araştırma bulunmamıştır. Bu nedenle, söz konusu türün literatürdeki yeri hakkında yapılan değerlendirme sınırlı olmuştur.

*Cerasus microcarpa* ülkemizde *subsp. microcarpa* ve *subsp. tortuosa* olmak üzere iki alt tür şeklinde doğal yayılış göstermektedir. Bunlardan *subsp. microcarpa* 1300 m'ye kadar olan rakıma sahip açık ovalar ve kalkerli yamaçlarda, *subsp. tortuosa* ise Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde 400 -1800 m rakımlı kayalık, kalkerli yamaçlar ve meşe ormanları arasında yayılış göstermektedir (<http://www.tubitak.gov.tr/tubives>).

*Cerasus microcarpa*'nın çoğaltılması veya farklı amaçlar için kullanılma potansiyeli hakkında herhangi bir bilimsel çalışmaya ulaşılamamıştır. Söz konusu türün literatürdeki yeri değerlendirilemediğinden konuyla ilgili benzer çalışmalar üzerinde durulmaya çalışılmıştır. Konunun doğası gereği, ağırlıklı olarak diğer *Prunus* türleri üzerine yapılan çalışmalar üzerinde durulmuştur.

Doku kültürü teknikleri kullanılarak bahçe bitkileri içerisinde yer alan birçok bitki türü çoğaltılabilir ve köklendirilebilir. Fakat bu çalışmaların başarısını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Doku kültürü çalışmaları yoğun çaba gerektirir ve genellikle yüksek maliyetlidir. Laboratuvar çalışmalarında kullanılan plastik veya cam malzemelerin cinsi, bitkinin kalitesi, büyüme dönemi ve yaşam süreleri çoğaltmanın başarısını etkilemektedir (Cluster, 1992).

Bir bitki parçası (explant) *in vitro* kültüre alınırken dikkat edilmesi gereken hususlar şu şekilde özetlenebilir (Debergh, 1998):

- 1) Kullanılan bitkisel materyalin özellikleri (genotip, kaynak ve tarih)
- 2) Kültür ortamı (mineraller, hormonlar ve diğer organik maddeler)
- 3) Çevresel faktörler (ışık, sıcaklık, gazlar, kaplar)
- 4) Zaman (alt kültür periyodu ve sayısı)
- 5) Yukarıdaki faktörler arasındaki etkileşimler

Escalettes ve Dosba (1993), yaptıkları çalışmada *Prunus* türlerinden yüksek miktarda adventif sürgün rejenerasyonu elde etmişlerdir. Araştırmada 'H.152' kayısı klonu için Quoirin (Quoirin ve ark., 1997) makro elementleri, 'H.146' kayısı ve 'P.1869' hibrit erik klonu için ise ½ MS (Murashige ve Skoog, 1962) kullanımı rejenerasyonu teşvik etmiştir. Ayrıca adventif sürgün oluşumuna en etkili faktör olarak TDZ (thidiazuron)'nin tek başına kullanımı veya naftalen asetik asit (NNA) ile kombinasyonları ile yapılmış olan uygulamalar olmuştur. Genotipe bağlı olarak optimum TDZ konsantrasyonu farklılık göstermiştir. Gümüş nitratın (AgNO<sub>3</sub>) besin ortamına ilave edilmesiyle rejenerasyonda %10 – 40 oranında artış sağlanmıştır. Besin ortamına AgNO<sub>3</sub> ilavesi, *P. marianna*, *P. domestica* ve *P. insititia* türlerine ait erik klonlarında da rejenerasyonu sağlanmıştır.

Besin ortamına katılan mineral madde konsantrasyonları ve tüp kapaklarının lastik ya da parafilm olması GF-677 anacının *in vitro*'da köklenmesini etkilemiştir. Mineral madde konsantrasyonunun yarım dozdan (0.5x) iki katına (2x) çıkartılması WPM ortamında köklenme üzerine önemli etkiler yapmıştır. Köklenme oranı, köklenen bitki sayısı, taze kök ağırlığı ve ortalama kök uzunluğunu artırmıştır. MS ortamında 0.5x ve 1x konsantrasyonlarda kök uzunluğu ve sayısı daha iyi olmuştur. İki ortamda da mineral madde konsantrasyonundaki artış kök taze ağırlığını artırmıştır. MS ortamı WPM' ye göre düşük konsantrasyonlarda daha iyi sonuç vermiştir. Lastik kapak kullanımı parafilm göre köklenme oranı, kök sayısı ve kök taze ağırlığı bakımından daha iyi sonuç vermiş, ancak kök uzunluğu azalmıştır (Dimassi ve Theriou, 1995).

Texas ve Nonpareil badem (*Amygdalus communis* L.) çeşitlerinin sürgün ucu kültürü metoduyla *in vitro* vejetatif çoğaltılması amaçlanan bir çalışmada farklı IBA ve BAP seviyeleri kültüre ilk alma ve çoğaltma test edilmiştir. Sürgün gelişmesi için hormon içermeyen veya sadece düşük düzeyde IBA (0,1 mg/l ) içeren ortamların daha uygun olduğu belirlenmiştir. İlk altkültüre alma ve daha sonraki çoğaltma aşamalarında 0,1 mg/l IBA ile 1,0 mg/l BAP kombinasyonunun sürgün verimi ve gelişmesi bakımından en iyi sonuçları verdiği saptanmıştır. Yüksek dozlarda (2,0 veya 3,0 mg/l) BAP kullanıldığı zaman aşırı kallus oluşumu ve hiperhidrasyon gözlenmiştir (Gürel ve Gülşen, 1998).

Muna ve ark. (1999) yapmış oldukları çalışmada 'Maxma-14' kiraz anacının *in vitro* çoğaltımı için uygulanabilir bir protokolün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Eksplant kaynağı olarak olgun (7 - 8 yaşlı) ağaçların sürgün uçları ve aksillar tomurcukları kullanılmıştır. MS besin ortamının kullanıldığı çalışmada sitokin olarak BA ve kinetin, oksin olarak IBA, NAA ve IAA kullanılmıştır. MS besin ortamına ilave edilen 4.44 µM BA ve 0.49 µM IBA sürgün çoğaltımı için en uygun sonuçları vermiştir. Sürgünleri köklendirmek amacıyla besin ortamına 0.5 veya 2.45 µM NAA veya IBA içeren MS ya da ½ MS ilave edilmiştir. En yüksek köklenme oranı 2.45 µM IBA içeren MS besin ortamında (%95) oranında elde edilmiştir. Kinetin'in köklendirme ortamına ilave edilmesiyle kök ve sürgün uzunluğunun arttığı belirlenmiştir. Kök oluşumundan sonra, sürgünlerin kısa süre içinde saksılara aktarılması dış koşullara alıştırmada kolaylık sağlamıştır. Sıvı köklendirme ortamında köklendirilen sürgünlerin kök gelişimi daha iyi olduğundan bu şekilde köklendirilen bitkiciklerin dış ortama aktarıldıktan sonraki canlı kalma yüksek olmuştur.

Mikro çoğaltmaya alınan Gisela 5 kiraz anacı; MS, 2 MS, ½ MS, ¼ MS ve 4.4 µM BA, 0.5 µM NAA ve 0.3 µM GA<sub>3</sub> bulunan ortamlara aktarılmışlardır. Aktarma işleminden sonraki ilk gün, 20. gün ve 40. günde kültürlerde ve besi ortamında meydana gelen bazı gelişmeler incelenmiştir. Kültür işlemleri boyunca aktarılan dokuların yaş ve kuru ağırlığında artma olurken, ortamın yaş ve kuru ağırlığında azalma olmuştur. Kültür işlemleri süresince ortamın pH'sı azalmış, daha sonra aktarılan ½ MS ve ¼ MS ortamlarının pH'sında az bir artış olmuştur. Gisela 5, en yüksek azot ve fosfor alımının olduğu 2 MS ve MS ortamlarında en iyi büyüme ve gelişmeyi göstermiştir (Ruzic ve ark., 2000).

Ainsley ve ark. (2001) *in vitro* çoğaltılan Nonpareil ve Ne Plus Ultra badem çeşitlerinin mikrosürgünlerinin köklendirilmesine yönelik bir protokol geliştirmeyi amaçlamışlardır. Köklendirme ortamının karanlıkta tutulması, besin ortamına

phloroglucinol, IBA ve NAA'nın ilave edilmesinin köklenmeye olan etkileri araştırılmışlardır. *In vitro* çoğaltılan sürgünlerden Ne Plus Ultra çeşidine ait olanlar büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamında, Nonpareil çeşidinkiler ise büyüme düzenleyici içermeyen AP (Almehdi and Parfitt, 1986) besi ortamında 24 °C'de, düşük ışık şiddeti uygulayarak, 4 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Dört hafta sonra sürgünler köklendirme için IBA ve NAA (0, 2.5, 5.0 veya 10.0 µM)'nın farklı konsantrasyonları içeren ½ MS besin ortamına aktarılmıştır. Mikrosürgünlerin 1.0 µM IBA içeren su-agar (%0.6 w/v) içerisinde 12 saat kaldıktan sonra, 100.0 µM phloroglucinol içeren ortamda iki hafta kültüre alınması köklenmeyi teşvik etmiştir. Ne Plus Ultra çeşidinin köklendirilmesinde ½ MS besin ortamı, Nonpareil çeşidinin köklendirilmesinde ise AP besin ortamı daha etkili olmuştur. Bu iki çeşit için köklenme oranı %60 olarak belirlenmiştir.

En uygun BAP konsantrasyonu ve kültür ortamının belirlenmesi meyve anaçları dahil olmak üzere özellikle odunsu türlerin yan tomurcuklardan başlatılan *in vitro* çoğaltma çalışmalarında önem kazanmaktadır. G × N22, GF-677, Mr.S 2/5, Marianna ve Myrobalan erik anaçları farklı BAP konsantrasyonu (0.1, 0.3, 0.5 ve 0.7 mg/l) içeren değişik yoğunluktaki MS (MS ve ¾ MS) besi ortamı üzerinde kültüre alındıklarında genotiplerin morfogenez tepkileri farklı olmuştur. G × N-22 ve Mr.S 2/5 anaçları için ¾ MS ortamında 0.7 mg/l BAP daha iyi sonuçlar verirken, Myrobalan anacı 0.5 mg/l BAP içeren ¾ MS ortamında daha iyi sonuçlar vermiştir ve denenen iki MS konsantrasyonunda da BAP konsantrasyonunun artmasıyla sürgün uzunluğu azalmıştır. GF-677 anacı ise mikro çoğaltmada iyi sonuçlar vermemiştir (Silveira ve ark., 2001).

Nisan ayında sürgün uçlarından alınan GF-677 anacının dokuları doku kültürü yöntemi ile mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılmıştır. Çoğaltma için en iyi sonucu 1 mg/l BA içeren ortam vermiştir. En iyi köklenme oranı 0.3 mg/l NAA ile 1.6 mg/l thiamine içeren ortamda ve 7 günlük karanlık uygulamasından elde edilmiştir (Kamali ve ark., 2001).

Gentile ve ark. (2002), P16C15, Babygold 6, 842 Standard, San Giorgio ve Yumyeong şeftali çeşitlerinin yaprak eksplantlarını kullanarak adventif sürgün oluşturma olanaklarını araştırmışlardır. Kullanılan çeşitlerin sürgün uçları BA ve NAA içeren, MS mikro elementleri ve LP (Quorin ve Lepoivre, 1997) makro elementlerinden oluşturulan besin ortamında 21 gün karanlıkta tutulduktan sonra oksin içermeyen besin ortamına aktarılmıştır. Üç haftalık bitkiciklerin üstten 4 yaprağı alınarak ana damara dik kesikler yapılmış ve üst yüzü besin ortamına temas edecek şekilde kültüre alınmış ve yaprak eksplantları da 21 gün karanlıkta tutulmuştur. Daha sonraki aşamada yaprak eksplantları oksin içermeyen besin ortamına konup, aydınlık koşullarda tutulunca kallus üzerinde adventif sürgün oluşumu gözlenmiş ve kallusların birkaç ay sürgün oluşturma yeteneğini koruduğu belirtilmiştir. P16C15, Babygold 6, 842 Standard, San Giorgio ve Yumyeong çeşitlerindeki rejenerasyon oranı sırasıyla %17, %13, %13, %17 ve %23 olmuştur.

Caboni ve Lauri (2002), GF-677, M-51 klon anaç genotipleri ve Babygold şeftali çeşidinin sürgün eksplantları *in vitro*'da kültüre almışlardır. Fe-EDTA, ½ Fe-EDTA veya ¼ Fe-EDTA MS besin ortamına ilave edilmiş, ayrıca 1 µM KHCO<sub>3</sub> eklenmesiyle eşit molarlarda FeSO<sub>4</sub> ile yer değiştirilmiş MS besin ortamı kullanılmıştır. Çoğaltma hızları hesap edilmiş ve klorofil içeriği belirlenmiştir. Fe eksikliği septomları genotipe bağlı olarak,

bikarbonat eklenen FeSO<sub>4</sub> bulunan ortamda daha net görülmüştür. En açık semptomlar Babygold şeftali çeşidinde, orta dereceli semptomlar GF-677 ve M-51 klon anaç genotiplerinde ve en az olan semptomlar ise badem genotiplerinde görülmüştür. *In vitro* ve *in vivo* gelişme arasında bir korelasyonun olduğu ileri sürülmüştür. Badem ve benzer sert çekirdekli meyve türlerinde kloroza toleransın kısa sürede belirlenmesinde doku kültürünün etkin bir şekilde kullanılabilceği belirtilmiştir (Caboni ve Lauri, 2002).

Fidancı ve ark., (2002) Kiraz-Vişne klon anaçlarından Gisela 5, Maxma 14 ve Tabel/Edabriz'in *in vitro* çoğaltılma olanaklarını belirlemeye çalışmışlardır. Eksplant kaynağı olarak sürgün ucu ve yan tomurcukların kullanıldığı çalışmada uygun yüzeysel sterilizasyon metodu, kültür oluşturma, çoğaltma, köklendirme ve dış ortama alıştırma safhaları için uygun ortam ve çevre koşulları araştırılmıştır. Yarım yoğunlukta ( $\frac{1}{2}$  MS) ve tam yoğunlukta MS ortamı kültür oluşturma ve çoğaltma aşamalarında kullanılmıştır. Kültür başlangıç aşamasında enfeksiyon dışında önemli her hangi bir problem yaşanmazken, kardeşlenme aşamasında alt kültürlerde vitrifikasyon (camlaşma) çok önemli bir problem olarak tespit edilmiştir. Köklendirme için  $\frac{1}{2}$  MS ve MS ortamlarına ilave edilen 0.5-1 mg/L IBA ile ortamlarda 3 haftalık sürede %95-100 köklenme başarıları elde edilmiştir. *In vitro*'da köklendirilen bitkicikler peat most/perlit (1:1) doldurulmuş viyol veya küçük saksılara dikilmiş ve dış ortama aktarıldıktan sonra canlı kalan bitkilerin oranının yüksek olduğu bildirilmiştir.

Rodrigues ve ark., (2003) *Prunuslar* için anaç olabilecek çeşitlerin *in vitro* şartlarda çoğaltılması için uygun besi ortamını araştırmışlardır. Sürgün uçları 1 cm uzunluğunda alınmış, 16 saat fotoperiyot ve  $25 \pm 2$  °C sıcaklıkta tutulmuştur. Denemede MS,  $\frac{3}{4}$  MS, SH ve Villegas ortamları kullanılmış, Ayrıca  $\frac{3}{4}$  MS ortamında farklı agar miktarları da (4.5, 5.5 ve 6.5 g/l ) denenmiştir. Bitkilerin gelişme, enfeksiyon ve oksidasyon yüzdeleri denemede saptanmıştır. En yüksek büyüme, gelişme ve kardeşlenme oranı 5.5 g/l agar içeren  $\frac{3}{4}$  MS ortamı kullanıldığı zaman elde edilmiştir.

Nonpareil 15-1, Ne Plus Ultra ve Titan x Nemaguard (badem x şeftali melezi) anaçlarının 0.7 cm uzunluğundaki sürgün uçları *in vitro*'da başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Nonpareil 15-1 genotipi 0.049 mM IBA, 3 mM BAP, 0.058 M sukroz 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 gelişimi 10 mM BAP, 0.088 M sukroz ve % 0.7 agar içeren MS ortamı üzerinde gözlenmiştir. Sürgünler yaklaşık 2 cm uzunluğundayken, 2.4 mM IBA, 0.088 M sakkaroz ve %0.7 agar içeren MS ortamında belirli periyotlarda (1 hafta karanlıkta ve 2 hafta ışıktaki) bekletildikten sonra %88 oranında köklenmiş ve her kök yaklaşık 2cm uzunluğunda olmuştur (Channuntapitat ve ark., 2003).

Gerçek ve Şahin (2003), yabancı kiraz ( *Prunus avium* L.)'ın *in vitro* koşullarda çoğaltılmasını araştırmışlardır. Eksplant olarak sürgün ucu ve tomurcuklar, kültür ortamı olarak MS kullanılmıştır. Araştırmada sürgün oluşumu ve çoğalması için, BA'nın 0.25 mg/l, 0.5 mg/l, 1 mg/l dozları kullanılmıştır. En iyi sürgün gelişimi ve çoğalma 1 mg/l içeren ortam üzerinde gözlenmiştir. Köklenme için  $\frac{1}{2}$  yoğunlukta MS ortamına IBA'nın 0.01 mg/l, 0.2 mg/l, 0.5 mg/l dozları kullanılmıştır. En iyi kök gelişimi 0.5 mg/l IBA içeren  $\frac{1}{2}$  MS ortamında meydana gelmiştir.

Molassiotis ve ark., (2003), GF-677 anacının *in vitro* köklendirilmesi üzerine kültür ortamına ilave edilen organik (Fe-EDTA ve Fe-EDDHA) ve inorganik (FeCl<sub>3</sub>) demirin etkilerini incelemişlerdir. Fe-EDDHA eklenen eksplantlarda % 100 köklenme elde edilmiş, demir noksanlığında veya FeCl<sub>3</sub> kullanıldığında köklenme oranı daha az olmuştur. Fe-EDTA ilave edilen ortamda kök elde edilememiş ve Fe-EDTA uygulaması sonucunda bitkicikler oldukça düşük klorofil ve yüksek Fe içeriği göstermiştir.

*In vitro* koşullarda GF-677 şeftali anacının çoğaltılmasında, BA'nın farklı konsantrasyonları (0.3, 0.6, 0.9 mg/l), MS ve Anderson ortamları kullanılmıştır. Sürgün çoğalması, uzaması ve gelişimi için en uygun ortam MS olarak belirlenmiştir. Anderson besin ortamında kültürlerde nekrotik lekeler ve camlaşma meydana gelmiştir. BAP'ın yüksek konsantrasyonu (0.9 mg/l) kallus oluşumuna ve sürgünlerde tepe nekrozuna sebep olmuştur. En iyi kök oluşumu 0.3 mg/l IBA içeren ½ MS besin ortamında alınmıştır (Ahmad ve ark., 2003).

Cos ve ark., (2004) şeftali × badem melezi olan Mayor için MS, WPM, DKW kültür ortamları ve bu melez için özel olarak geliştirilen ME kültür ortamını kullanmışlardır. Bu kültür ortamlarının Mayor'un çoğalması üzerine etkisini araştırmışlardır. Ayrıca elde edilen bitkilerin, vitrifikasyon gösteren eksplantların oranı, yaprak sayısı ve boyu da incelenmiştir. Kültür ortamına 1.0 mg/l BAP, 0.1 mg/l IBA, 30 g/l sukroz ve 7 g/l Bacto Difco Agar ilave edilmiştir. Sonuçlar, 5.21 çoğalma katsayısı ile 'Mayor' için geliştirilen ME'nin en iyi kültür ortamı olduğunu göstermiştir. ME ortamında eksplant uzunluğu ve yaprak sayısı daha yüksek olmuş, ayrıca vitrifikasyon semptomları daha az görülmüştür. En iyi çoğalma oranı 1 mg/l ve 1.5 mg/l BAP ile 0.1 mg/l IBA içeren kültür ortamlarından elde edilmiştir. Optimum büyüme düzenleyici konsantrasyonu olarak; 1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IBA bildirilmiş ve bu konsantrasyonlarda vitrifikasyon semptomlarının daha az görüldüğü belirtilmiştir. Kültür 2 mg/l GA<sub>3</sub> eklendiğinde çoğalma miktarı azalmış ancak eksplantlerin boyunda artış olduğu tespit edilmiştir.

Molassiotis ve ark., (2004) GF-677 klon anacının Fe-EDTA uygulanan mikro çeliklerinde *in vitro* köklenme sırasında oluşan peroksidaz ve katalaz aktivitesindeki değişimleri araştırmışlardır. Köklendirme muamelesinden 12 gün sonra ilk kökler görülmüştür. En yüksek peroksidaz aktivitesi, köklenmemiş mikro çeliklerin aksine, köklenmiş çeliklerde 9. günde görülmüştür. Peroksidaz yoğun bir şekilde 6. ve 12. günlerde iyonik olarak hücre duvarına geçmiş, 6. ve 15. günlerde ise katalaz enzimi maksimum aktivite göstermiştir. Çözünür peroksidaz izoenzimlerinin zamanla değişimi sadece köklenmiş mikro çeliklerde gözlenmiştir.

Andreu ve Marin (2005), Prunus cinsine ait türler için anaç olarak kullanılan 'Adesoto 101' (*P. insititia*)'dan alınan farklı eksplant kaynaklarının değişik kültür ortamlarında rejenerasyon olanaklarını araştırmışlardır. Mikroçoğaltım ve çelikle çoğaltılarak elde edilen bitkilerden alınan eksplantlar değişik besin ortamlarında (MS, WPM ve QL) kültüre alınmıştır. Mikroçoğaltılan bitkilerden alınan eksplantlar daha iyi sonuç vermiştir. Kültür ortamının kimyasal bileşimi çoğaltma oranını etkilemiştir. Dokuz altkültürden sonra QL besin ortamında elde edilen sürgün sayısının MS ve WPM besin ortamlarına göre düşük olduğu belirlenmiştir.

Matt ve Jehle (2005)'nin yürüttükleri bir çalışmada ekonomik öneme sahip bazı kiraz çeşitlerinin ('Schneiders', 'Sweetheart', 'Starking Hardy Giant', 'Kordia' ve 'Regina') yaprak ve boğum arası eksplantları kullanılmıştır. Çalışmada *in vitro*'da adventif sürgün oluşumu üzerine besi ortamı (MS, WPM, QL, DKW), karbon kaynağı, bitki büyüme düzenleyici konsantrasyon ve kombinasyonları, karanlık uygulaması ve etilen inhibitörü olarak kullanılan gümüş thiosülfatın etkileri araştırılmıştır. Ekplantların karanlık uygulamasına tabi tutulması rejenerasyon oranının düşük olmasına neden olmuştur. TDZ ve IBA'nın birlikte kullanılmasının rejenerasyon üzerine en etkili büyüme düzenleyici kombinasyonu olduğu, ayrıca ortama gümüş thiosülfat eklemesinin rejenerasyon üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Yaprak eksplantlarından %11, boğum arası eksplantlarından %50 adventif sürgün elde edildiğinden rejenerasyon için boğum arası eksplant kullanımı önerilmiştir.

Antonopoulou ve ark. (2005)'nin yaptığı çalışmada, 1mg/l IBA içeren MS besin ortamına 0, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/l riboflavin (B2) ilave edilerek 'GF-677' badem x şeftali mikro sürgünlerinin köklenmesine olan etkisi araştırılmıştır. Kültür başlangıcından itibaren 4 hafta sonunda yapılan gözlemlerde riboflavin konsantrasyonunun artırılmasıyla sürgünlerde köklenme oranının azaldığı belirlenmiştir. Riboflavin içermeyen MS besin ortamında kültüre alınan kontrol gurubundaki mikro sürgünlerde köklenme oranı %100 olurken, 2.0 mg/l riboflavin ilave edilen ortamdaki sürgünlerde hiç köklenme görülmemiş, yapraklarda kloroz ve sürgün uçlarında da nekrozlar görülmüştür.

Fotopoulos ve Sotiropoulos (2005), yaptıkları çalışmada GF-677'ye alternatif olarak kullanılan şeftali x badem melezi PR204/84 anacının mikro sürgünlerin köklendirilmesine IBA konsantrasyonlarının, farklı MS düzeylerinin (MS veya ½ MS ) ve farklı periyotlarda karanlık uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. MS ve ½ MS besin ortamlarına 0, 1, 2.5, 5 ve 10 µM IBA ilave edilmiş ve kültüre alınan bitkiciklerin yarısı 12 gün karanlıkta tutulduktan sonra aydınlık ortama aktarılmış, diğer yarısı ise aydınlık ortamda köklenmeye bırakılmıştır. En yüksek köklenme oranı 2.5 µM IBA ile desteklenmiş ½ MS besin ortamında kültüre alınan mikro sürgünlerden elde edilmiştir.

Durkovic (2006) *Prunus avium*'un olgun ağaçlarından alınan boğum eksplantlarının rejenerasyonu üzerine bitki büyüme düzenleyici konsantrasyon ve kombinasyonlarının etkilerini araştırmıştır. Agar ile jelleştirilmiş WPM kültür ortamına değişik konsantrasyonlarda BAP, BAP + NAA, BAP + IBA, TDZ, ve TDZ + BAP kombinasyonları ilave edilmiştir. Sürgün kardeşlenmesini besin ortamına ilave edilen 0.5 mg/dm<sup>3</sup> BAP + 0.05 mg/dm<sup>3</sup> TDZ kombinasyonunun eklenmesi teşvik etmiştir. BAP'ın IBA ve NAA ile birlikte ya da tek başına eklenmesi sürgün kardeşlenmesinde çok etkili olmamıştır. Besin ortamına ilave edilen düşük konsantrasyonlardaki (0.2 ve 0.4 mg/dm<sup>3</sup> ) BAP + IBA (0.01 mg/dm<sup>3</sup> ) veya NAA (0.01 mg/dm<sup>3</sup> ) kombinasyonları sürgün uzamasını teşvik etmiştir. Mikrosürgünlerin köklendirilmesi amacıyla ½ WPM kültür ortamına IBA veya IBA + 2,4-D ilave edilmiştir. En iyi köklenme oranı (%73.3) 0.3 mg/dm<sup>3</sup> IBA bulunan köklenme ortamında elde edilmiştir.

**3. MATERYAL VE METOT**

Bu araştırma, 2007 – 2008 yılları arasında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada *Cerasus microcarpa subsp. tortuosa*'ın in vitro mikro çoğaltımı araştırılmıştır.

**3.1. Materyal**

Çalışmada eksplant kaynağı olarak *Cerasus microcarpa (subsp. tortuosa)* türünden yedi genotipin yeşil çelikleri kullanılmıştır. Kullanılan genotipler KR, O-14, O-21, O-24, M-2, M-7, M-10 olarak isimlendirilmiştir. Kullanılan O-14, O-21, O-24, M-2, M-7, M-10 genotipler Şırnak ve Mardin kırsalında doğal olarak yetişen *Cerasus microcarpa subsp. tortuosa* populasyonundaki yetişkin ağaçlar arasından seçilmiştir. KR genotipi ise *Cerasus microcarpa subsp. tortuosa*'nın in vitro çimlendirilen bir tohumundan rejenerasyonla çoğaltılan bir klonu temsil etmektedir. Eksplant kaynağı olarak kullanılan bu genotiplerden O-14, O-21, O-24 çoğaltım aşamasında bulaşmadan dolayı değerlendirmeye alınmamıştır.

**3.2. Metot**

Bilindiği gibi herhangi bir mikroçoğaltım çalışmasında gerçekleştirilmesi gereken genel kabul gören beş aşama (Aşama 0, I, II, III, ve IV) bulunmaktadır (Nas ver ark., 2008). Araştırma kapsamında, mikroçoğaltım aşamaları (Aşama 0 – IV) özetle aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

**3.2.1. Aşama 0 (Eksplant Kaynağının Kültür İçin Hazırlanması)**

Yukarıda belirtildiği gibi, denemede kullanılan genotiplerin meyve veren ağaçları doğadaki ağaçlar arasından seçilmiş ve daha önce herhangi bir kültürel muameleye tabi tutulmamıştır. Damızlık bitkilerin yaşlı olmalarından kaynaklanan in vitro'da karşılaşılan problemleri hafifletmek ve eksplantların morfogjenik potansiyellerini arttırmak amacıyla, damızlık bitkiler yerine, damızlık ağaçlardan alınan odun çelikleri kültür öncesi muameleye tabi tutulmuşlardır. Şubat (2008) ayının ilk haftasında ana bitkilerden kesilen durgun haldeki çelikler (O-14, O-21, O24, M-2, M-7, M-10 ) ilk önce akan çeşme suyu altında yıkanmış ve daha sonra yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuştur.

Yüzeysel sterilizasyon amacıyla çelikler; litreye 10 damla Tween–20 ilave edilerek hazırlanan %20' lik ticari çamaşır suyunda (orijinal ambalajda %5 aktif klorin) 10 dakika bekletildikten sonra akan çeşme suyu altında durulanmıştır. Yüzeysel sterilizasyon ve durulama işlemlerinden sonra odun çeliklerinin alt ve üst kısımları 0.5 – 1.0 cm kadar kesilmiş ve daha sonra tomurcuk dormansisini kırmak amacıyla çeliklerin dip kısımları cam kavanozlardaki sürdürme solüsyonuna (Read ve Yang, 1987) konulmuştur.

Her kavanoza (200 ml sürdürme solüsyonu) 25 – 35 cm uzunlukta 10 – 15 adet çelik konulmuştur. Çeliklerin sürdürülmesinde kullanılan sürdürme, solüsyonu litreye 200 mg 8-Hydroxyquinoline citrate, 20 g sukroz ve 10 mg gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) içermektedir. Bu sürdürme solüsyonunun kullanılmasıyla normal vejetasyon mevsiminin dışında aktif büyüyen, taze sürgünler oluşmakta ve böylece morfogjenik potansiyeli daha yüksek eksplantlar elde edilebilmektedir.

Sürdürme solüsyonuna konulan çelikler iklim odasında ( $23 \pm 2$  °C, 16/8 ışık/karanlık) sürmeye bırakılmıştır. Sürdürme solüsyonu dört-günde-bir yenilenmiş ve çeliklerin solüsyona batan alt kısımları yıkandıktan sonra 0.5 cm kadar kesilip tekrar solüsyona konulmuştur. Solüsyon yenileme işlemi 4 – 5 kez tekrarlanmıştır. Durgun gözlerden çıkan yeni sürgünler aşağıda belirtildiği gibi eksplant olarak kullanılmıştır.

### 3.2.2. Aşama I (Kültüre Başlangıç)

Sürdürme solüsyonuna konulan odun çeliklerinin sürmesiyle meydana gelen yeni sürgünler (Şekil 3.1.) eksplant olarak kullanılmıştır. Meydana gelen yeni sürgünler çeliklerin solüsyona konulmasından yaklaşık üç hafta sonra (tomurcuk patlamasından 10 – 15 gün sonra) 22 Şubat 2008 tarihinde odun çeliklerinden kesilmişlerdir. Yeni çeliklerin alınma zamanının belirlenmesinde aktif büyümenin yavaşlaması fakat yeni sürgünlerin henüz solmaya başlamamış olması kriter olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Sürdürme solüsyonuna konulan odun çeliklerinin sürmesiyle meydana gelen ve eksplant olarak kullanılan yeni sürgünler (yeşil çelikler).

Sürdürme solüsyonu kullanılarak elde edilen M-2, M-7, M-10 ve KR genotiplerine ait yeni sürgünlerin yaprakları kesildikten sonra (Şekil 3.2a.) sürgünler yüzeysel sterilizasyona (disinfestasyona) tabi tutulmuşlardır. Yaprak kesiminden sonra yapılan bütün işlemler steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Yüzeysel sterilizasyon amacıyla yaprakları kesilmiş yeşil çelikler ilk önce %70 etil alkol (EtOH) içerisinde yaklaşık 20 saniye süreyle bekletildikten sonra steril saf su ile iki kez durulanmışlardır. Daha sonra yeşil çelikler litreye 10 damla Tween-20 içeren %20' lik ticari çamaşır suyu solüsyonu içerisinde ara-sıra karıştırılarak 15 dakika bekletildikten sonra üç kez saf su ile durulanmışlardır.

Yüzeysel sterilizasyon işleminden sonra yeşil çelikler boğum aralarından kesilmiştir. Tek-boğum veya sürgün-ucundan oluşan eksplantlar (Şekil 3.2.) 25 x 150 mm'lik cam tüpler içerisinde  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Benzyladenine (BA) +  $0.01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Indole-3-butyrac acid +  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  sukroz içeren ve  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  agar ile jelleştirilmiş NRM (Nas ve Read, 2004a) ortamı (Şekil 3.2.) üzerinde kültüre alınmışlardır. Tüplere aktarılan eksplantlar (kültürler)  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklığa sahip iklim odasında 16/8 ışık/karanlık fotoperiyot altında büyümeye bırakılmışlardır.



Şekil 3.2. Yüzeysel sterilizasyon işleminden sonra yeşil çeliklerin boğum aralarından kesilmesiyle meydana gelen tek-boğum ve sürgün-ucu eksplantlar 25 x 150 mm'lik cam tüpler içerisinde  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Benzyladenine (BA) +  $0.01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  Indole-3-butyrac acid +  $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  sukroz içeren Nas ve Read (NRM) ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır.

Çizelge 3.1. Bu çalışmada kullanılan Nas ve Read (NRM) (Nas ve Read, 2004a), Murashige ve Skoog (MS) (Murashige ve Skoog, 1962) ve Lloyd ve McCown (WPM) (Lloyd ve McCown, 1981) ortamlarının kimyasal bileşimleri.

<b>Mineraller</b>	<b>Miktarı (mg l)</b>		
	<u>NRM</u>	<u>MS</u>	<u>WPM</u>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	530	1650	400
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	700	-	556
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	90	440	96
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1600	370	370
KNO <sub>3</sub>	550	1900	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1300	170	170
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	990
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	6.2
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	2.5	0.025	0.25
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	20	16.9	22.3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.5	0.25	0.25
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.8	8.6	8.6
Sequestrene 330 Fe	50	50	50
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	-	27.8	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	-	37.3	37.3

<b>Organikler</b>	<b>Miktarı (mg l)</b>		
Thiamine (B1)	0.6	0.1	1
Riboflavin (B2)	0.21	-	-
Nicotinic acid (B3)	1.15	0.5	0.5
Pyrodoxine (B6)	0.6	0.5	0.5
Vitamin E (a-tocopherol)	20	-	-
Vitamin C (Ascorbic acid)	1	-	-
Glycine	0.85	2	2
Myo-inositol	200	200	200

*In vitro*'ya alındıktan sonra, kültürler her gün kontrol edilerek meydana gelen eksplant ölümleri, kararma ve mikrobiyal bulaşmalar belirlenmiştir. Üç hafta sonunda, mikrobiyal bulaşmadan ari ve sağlıklı görünen eksplantlar alt kültüre alınmışlardır. Aşama II için mikrobiyal bulaşmadan ari yeterli sayıda ekplant elde etmek için eksplantlar her dört-haftada-bir alt kültüre alınmışlardır. Bu işlem yedi kez tekrarlanmış ve daha sonra Aşama II'ye geçilmiştir.

**3.2.3. Aşama II (Uygun Ortam ve BA Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Mikroçoğaltım)**

Kültürlerin *in vitro*'da sürdürülebilirliğini, stabilizasyonunu ve en iyi mikroçoğaltım katsayısını sağlayacak sitokinin (BA) konsantrasyonu ve kültür ortamını belirlemek amacıyla, Aşama I'den alınan eksplantlar 0.5, 1.0 ve 1.5 mg·l<sup>-1</sup> BA + 0.01 mg·l<sup>-1</sup> IBA + 5 g·l<sup>-1</sup> agar (Merck 1.016.13) içeren NRM, MS ve WPM ortamları üzerinde alt-kültüre alınmışlardır. Böylece 3 ortam x 3 BA olmak üzere 9 muamele kombinasyonu elde edilmiştir. Dört hafta süren alt kültür süresinin sonunda eksplantlar aynı konsantrasyonda BA içeren yeni hazırlanmış ortamlar üzerine aktarılmışlardır. En uygun BA konsantrasyonu ve kültür ortamının belirlenmesinde çoğalma katsayısı (kardeşlenme) ve mikrosürgünlerin kalitesi (uzunluk, kalınlık, renk, kallus durumu, nekroz, uç kuruması ve eksplant canlılığı) temel ölçütler olarak değerlendirilmiştir. Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre düzenlenmiş ve her alt kültürde her muamele için 4 tekerrür (her tekerrür 4 tüp ve her tüpte bir bitki) kullanılmıştır. Bütün deneme iki kez tekrarlanmıştır (üç kez yürütülmüştür).

**3.2.4. Aşama III (Köklendirme)**

Yukarıda sözü edilen kriterlere göre en iyi mikroçoğaltımın olduğu BA konsantrasyonunun belirlenmesinden sonra ( bkz. Bulgular ve Tartışma), eksplantlar sadece 1.0 mg·l<sup>-1</sup> BA + 0.01 mg·l<sup>-1</sup> IBA içeren NRM besin ortamı üzerinde altkültüre alınmıştır. Bu işleme 2 altkültür devam edilmiştir.

Altkültür periyodunun sonunda sürgün uzunluğu mikrosürgünlerin köklendirilmesi için yetersiz bulunmuştur. Mikrosürgünlerin uzunluklarını arttırmak amacıyla kültür tüplerine 1.0 mg l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> içeren solüsyondan 2 ml ilave edilmiştir. Ortama GA<sub>3</sub> ilave edildikten 4 - 5 gün sonra sürgünlerin boylarında hızlı bir artış gözlenmiş ve 1.5 cm veya daha fazla uzunluğa ulaşan sürgünler köklendirme için kullanılmıştır. Köklendirme ortamı olarak 0.1 mg l<sup>-1</sup> IBA içeren NRM ortamı kullanılmıştır. Köklendirme ortamı içeren her tüpe bir mikrosürgün dikilmiş ve 23 ± 2 °C sıcaklığa sahip iklim odasında 16/8 ışık/karanlık fotoperiyot altında köklenmeye bırakılmıştır. Köklendirme denemesi üç kez tekrarlanmış ve her genotipten en az 8 tekerrür (her tekerrürde dört tüp) kullanılmıştır.

**3.2.5 Aşama IV ( Pişkinleştirme ve Dış Ortama Aktarma)**

Mikrosürgünlerin köklenme oranı ve kök gelişimi yetersiz olduğundan ( bkz. Bulgular ve Tartışma) bu çalışma kapsamında pişkinleştirme ve dış ortama aktarma işlemlerine başlanmamıştır.

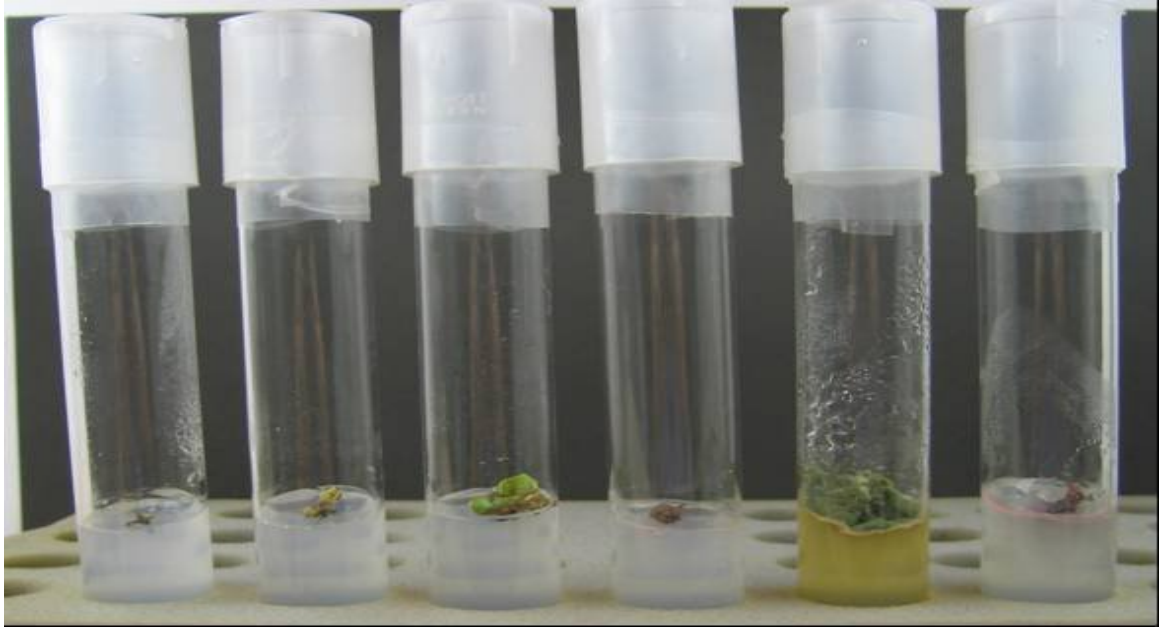
Bütün aşamalardaki (Aşama II – Aşama III) veriler SAS istatistik programı kullanılarak General Linear Model (GLM) ile ( $p=0.05$ ) varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farkların belirlenmesinde DUNCAN testi kullanılmıştır.

**4. BULGULAR VE TARTIŞMA****4.1. Genel Gözlemler**

Bir hafta sonunda sürdürme solüsyonunda bulunan odun çelikleri üzerindeki tomurcuklar sürmeye başlamıştır. İki hafta sonra ise tomurcuklardan süren yeni sürgünlerin büyümeleri yavaşlamaya başlamıştır. Bu nedenle yeni sürgünlerin kültüre alınması için en uygun zamanın tomurcuk patlamasından yaklaşık iki hafta sonra olduğu kararlaştırılmıştır. Tomurcuk patlamasından iki hafta sonra alınan yeni sürgünler canlı bir görünüme sahip olmaktadır (Şekil 3.1.). Bu aşamada sürgünlerin büyümeleri hala devam ettiğinden kültüre alındıklarında eksplantların canlı kalmaları ve daha iyi bir reaksiyon göstermeleri beklenmektedir.

Eksplantlar kültüre ilk alındıktan bir kaç gün sonra mikrobiyal bulaşma (kontaminasyon) görülmeye başlamıştır. Bu durum bazı genotiplerin tamamen ölmesine sebep olmuştur. Daha sonraki altkültürlerde mikrobiyal (bakteriyel ve fungal) bulaşmalar devam etmiş ve bu bulaşıklıkların çalışma hatalarından kaynaklanabileceği gibi bu genotiplerde endogen (içsel) mikroorganizmaların bulunulabileceği sonucuna varılmıştır.

Yüksek oranda gözlenen kararma (oksidasyon) ve mikrobiyal bulaşmalar, çalışmada kullanılan O grubu (O-14, O-21, O-24) ve M-2 genotiplerini öldürdüğü için bu genotipler değerlendirmeye alınmamıştır (Şekil 4.1.).



**Şekil 4.1.** (Soldan sağa), *in vitro* kültürlerde meydana gelen eksplant kararması (1. ve 4. tüp), fungal (5. tüp) ve bakteriyel (6. tüp) bulaşmalar.

Eksplantların kültüre alınma aşamasında karşılaşılan kontaminasyon, eksplant kararması ve tomurcukların sürmemesi gibi problemler odunsu türlerin mikroçoğaltımında karşılaşılan sorunlardan bazılarıdır. Bu çalışmada eksplant elde etmek amacıyla O-14, O-21, O-24, M-2, M-7 ve M-10 genotiplerinin odun çeliklerinin sürdürülmesinde kullanılan forsing solüsyonu bu problemlerin hafifletilmesinde etkili olabilmektedir. Bu çeşitlerin genotiplerinin kültürlerinin sürdürülebilir hale gelmesinde, kullanılan sürdürme solüsyonunun etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle normal vejetasyon dönemlerinin dışında eksplant elde etmek amacıyla sürdürme solüsyonunun kullanımı tavsiye edilmektedir.

#### **4.2. Genotip, Ortam ve Benzyladenine (BA) Konsantrasyonlarının Kültürlerin Stabilizasyonu ve Gelişimi Üzerine Etkisi**

Kültürlerin *in vitro*'da stabilizasyonunu ve en iyi mikroçoğaltım katsayısını sağlayacak BA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, çeşitler 1 mg/l BA içeren NRM ortamında kültüre alınmış ve altı (başlangıç dahil yedi) altkültürün sonunda eksplantlar 0.5, 1.0 ve 1.5 mg/l<sup>-1</sup> BA + 0.01 mg/l<sup>-1</sup> IBA + 5 g/l<sup>-1</sup> agar (Merck 1.016.13) içeren NRM, MS ve WPM ortamları üzerinde üç kez altkültüre alınmışlardır.

Genotip, Ortam ve BA konsantrasyonlarının kültürlerin gelişimi üzerine etkilerinin istatistiksel analizi için veriler sekizinci ve dokuzuncu altkültür sonunda toplanmıştır. İstatistiksel analizde, bir eksplantan oluşan sürgün sayısı ve bu sürgünlerin uzunluğu değerlendirilmeye alınmıştır.

Sürgün sayısı incelendiğinde; Genotip, Ortam ve Genotip x Ortam interaksyonu önemli bulunmuştur. BA, Genotip x BA ve Genotip x Ortam x BA interaksyonu etkilerinin sürgün sayısı üzerine etkileri önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Genotip ortam ve BA'nın sürgün sayısı üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi

<b>Varyasyon Kaynağı</b>	<b>SD</b>	<b>KT</b>	<b>KO</b>	<b>F</b>
Genotip	2	65,28	32,64	11,02****
Ortam	2	112,87	56,43	19,06****
BA	2	9,69	4,84	1,64
Genotip x Ortam	4	51,09	12,77	4,31***
Genotip x BA	4	23,91	5,98	2,02
Genotip x Ortam x BA	11	17,13	1,56	0,53

**Ö.D.:** Ortalamalar arasındaki fark p=0.05 seviyesinde önemli değil; \*\*, \*\*\*: ortalamalar arasındaki fark, sırasıyla, p=0.05 ve p=0.005 seviyesinde önemli.

Sürgün uzunluğu incelendiğinde; Genotip, Ortam ve Genotip x BA interaksyonu önemli bulunmuştur. BA, Genotip x Ortam ve Genotip x Ortam x BA interaksyonu etkilerinin sürgün uzunluğu üzerine etkileri önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2.).

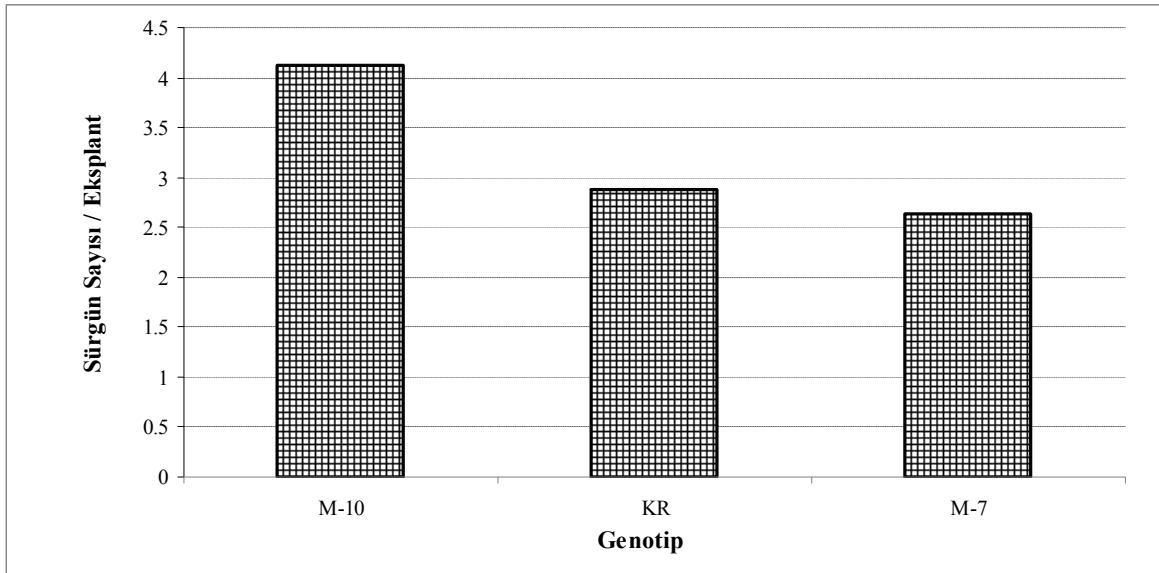
Çizelge 4.2. Genotip ortam ve BA'nın sürgün uzunluğu üzerine etkisinin varyans (GLM) analizi

Varyasyon Kaynağı	SD	KT	KO	F
Genotip	2	1,80	0,90	9,63 ****
Ortam	2	4,89	2,44	26,13 ****
BA	2	0,14	0,07	0,79
Genotip x Ortam	4	0,24	0,06	0,66
Genotip x BA	4	1,03	0,25	2,78 **
Genotip x Ortam x BA	11	1,27	0,11	1,24

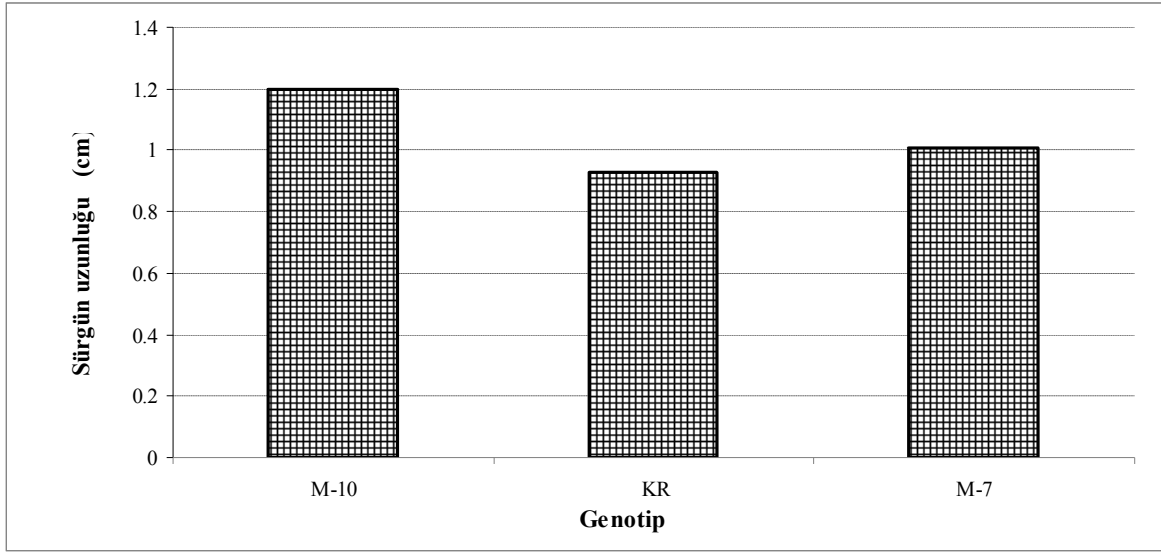
**Ö.D.:** Ortalamalar arasındaki fark  $p=0.05$  seviyesinde önemli değil; \*\*, \*\*\*: ortalamalar arasındaki fark, sırasıyla,  $p=0.05$  ve  $p=0.005$  seviyesinde önemli.

Eksplant başına oluşan sürgün sayısı bakımından M-10 ile KR ve M-7 arasındaki fark önemli bulunmuş, KR ile M-7 arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından M-10, KR ve M-7 arasındaki fark önemli bulunmuş, KR ile M-7 arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. Bir eksplanttan meydana gelen ortalama sürgün sayısı M-10 genotipi için 4.1, KR genotipi için 2.8 ve M-7 genotipi için 2.6 bulunmuştur (Şekil 4.2.). Bir eksplantten meydana gelen ortalama sürgün uzunluğu M-10 için 1.2 cm, KR için 0.93 cm ve M-7 için 1.01 cm (Şekil 4.3.) olmuştur.

*In vitro* çalışmalarda kullanılan bitkinin türü ve genetik yapısı (genotipi) eksplantlerin morfojenik reaksiyonlarını en çok etkileyen faktörlerden birisi olarak bilinmektedir. Bu çalışmada ise kullanılan genotiplerin sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu üzerine etkileri önemli bulunmuştur. Bu durumun eksplantlerin genetik yapı bakımından farklı olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

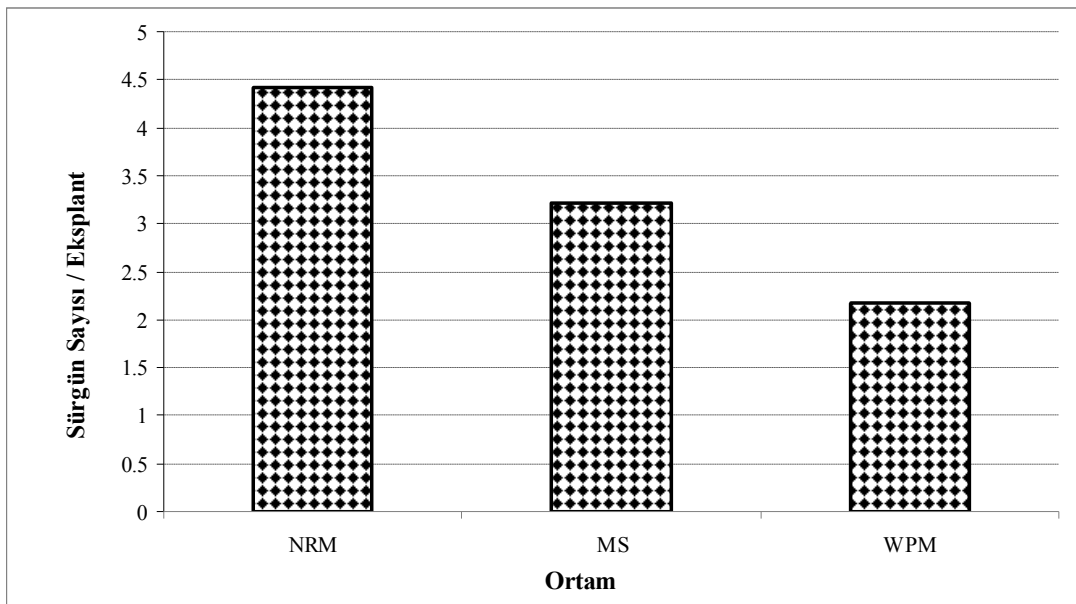


Şekil 4.2. Genotiplere bağlı olarak bir eksplantten meydana gelen ortalama sürgün sayısı

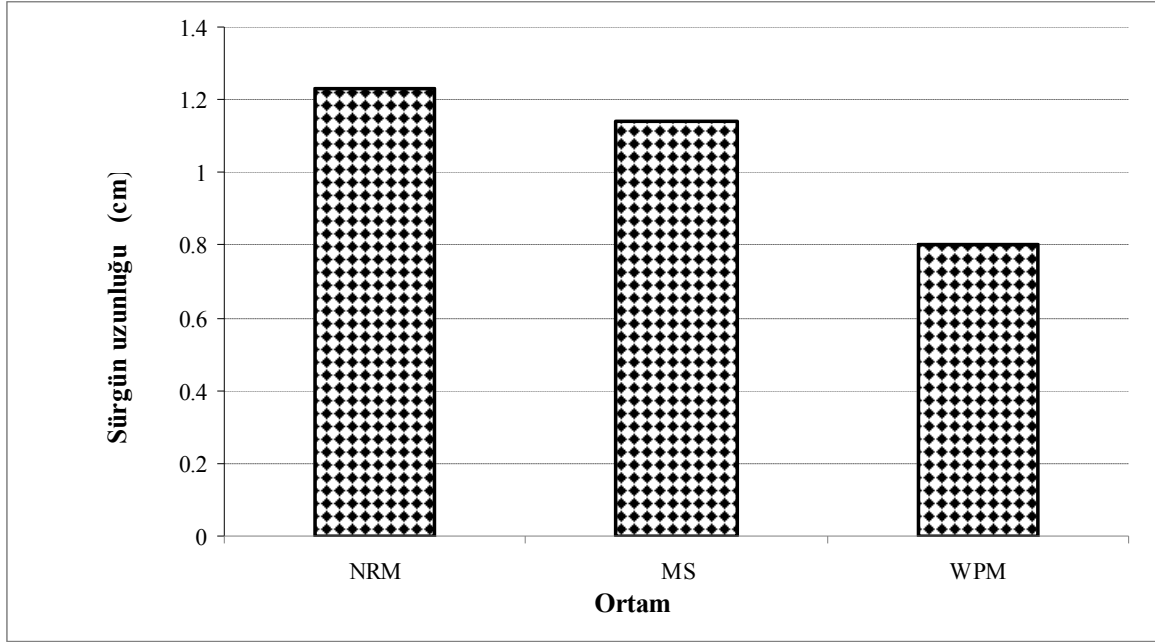


Şekil 4.3. Genotiplere bağlı olarak meydana gelen sürgünlerin ortalama uzunlukları

Eksplant başına oluşan sürgün sayısı bakımından kültür ortamının bileşimi etkili bulunmuştur. NRM üzerinde bir eksplantten meydana gelen sürgün sayısı ile MS ve WPM üzerinde bir eksplantten meydana gelen sürgün sayısı arasındaki fark önemli bulunmuştur. Eksplant başına oluşan ortalama sürgün uzunluğu bakımından kültür ortamının bileşimi etkili bulunmuştur. NRM ve MS ortamı ile WPM ortamı arasındaki fark önemli bulunmuştur. Bir eksplantten oluşan ortalama sürgün sayısı NRM ortamı için 4.41, MS ortamı için 3.21 ve WPM ortamı için 2.17 bulunmuştur (Şekil 4.4.). Bir eksplantten oluşan ortalama sürgün uzunluğu NRM ortamı için 1.23 cm, MS ortamı için 1.14 cm ve WPM ortamı için 0.8 cm bulunmuştur (Şekil 4.5.).

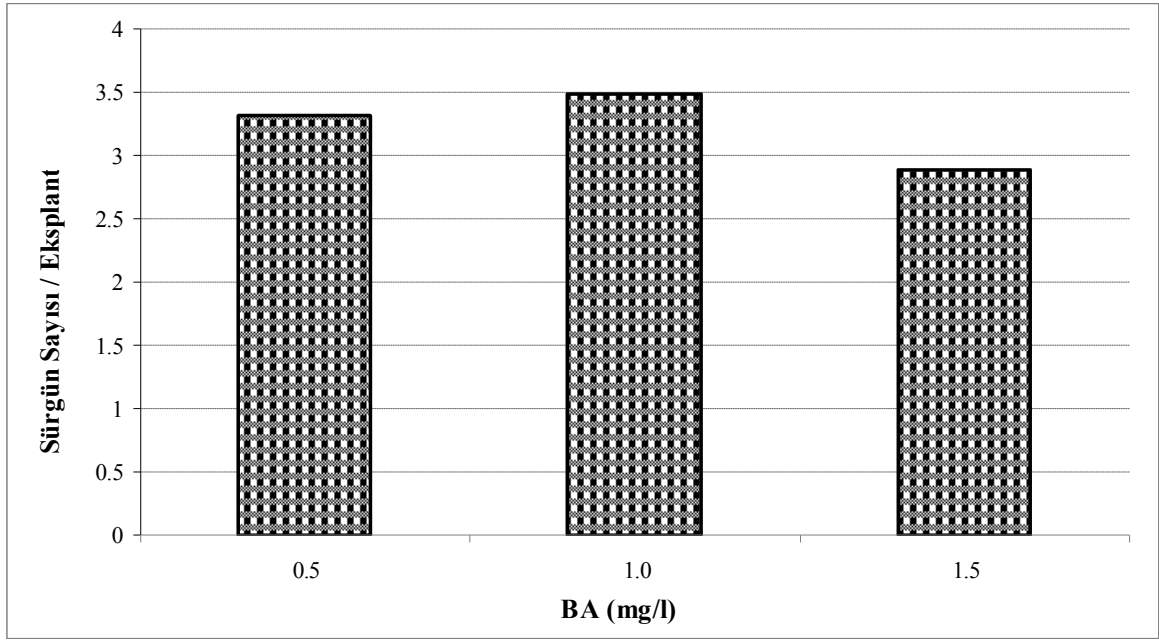


Şekil 4.4. Kültür ortamına bağlı olarak bir eksplantten meydana gelen ortalama sürgün sayısı

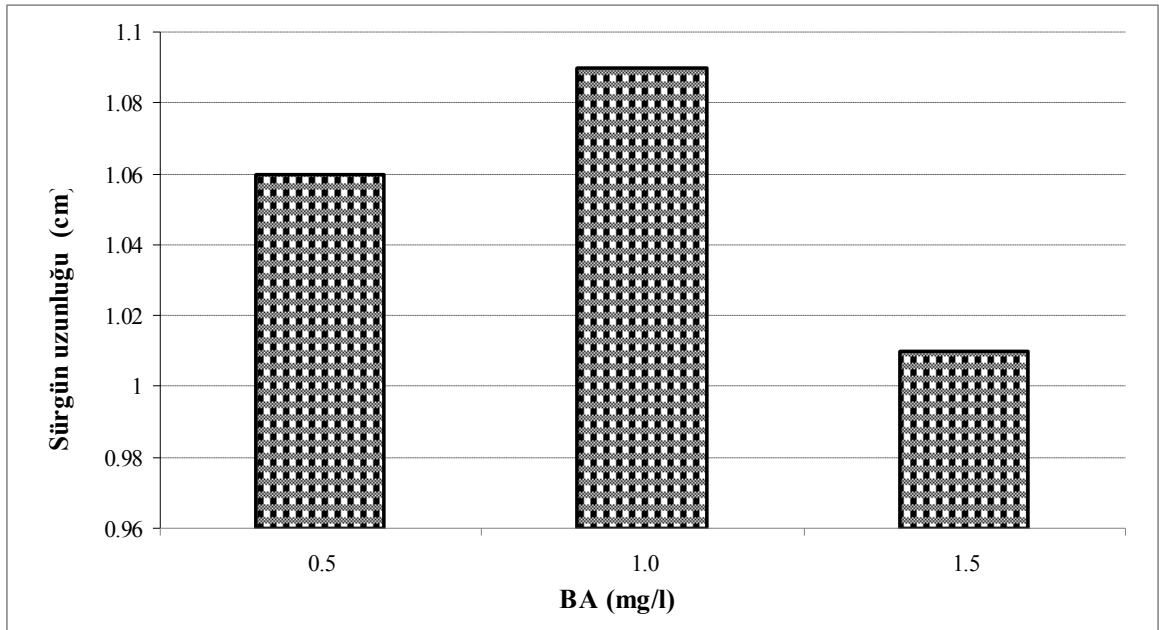


Şekil 4.5. Kültür ortamına bağlı olarak meydana gelen sürgünlerin ortalama uzunlukları

Eksplant başına oluşan sürgün sayısı BA konsantrasyonu bakımında karşılaştırıldığında  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA ve  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  BA arasındaki fark önemsiz bulunmuş,  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA ile  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  BA'nın  $1.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA ile arasındaki fark önemli bulunmuştur. Sürgün uzunluğu bakımından  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA ve  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  BA arasındaki fark önemsiz bulunmuş,  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA ile  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  BA'nın  $1.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA ile arasındaki fark önemli bulunmuştur. Bir eksplantten oluşan ortalama sürgün sayısı  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA için 3.31,  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  BA için 3.48 ve  $1.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA için 2.88 bulunmuştur (Şekil 4.6.). Bir eksplantten oluşan ortalama sürgün uzunluğu  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA için 1.06 cm,  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  BA için 1.09 cm ve  $1.5 \text{ mg l}^{-1}$  BA için 1.01 bulunmuştur (Şekil 4.7.).



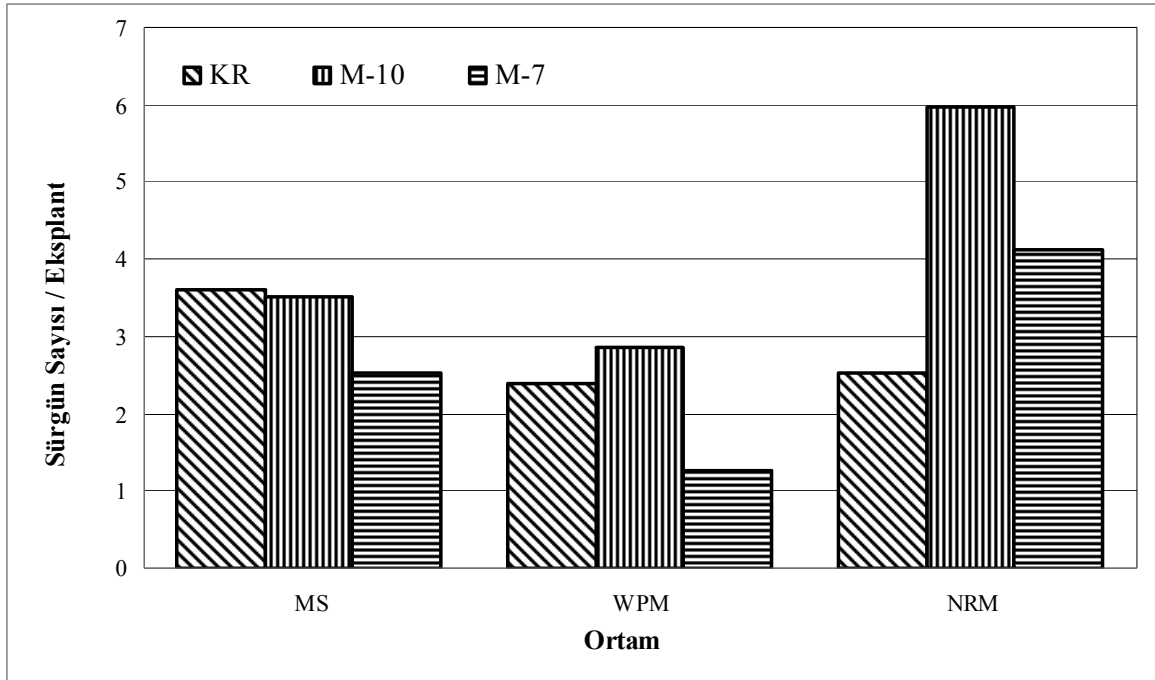
Şekil 4.6. Farklı BA konsantrasyonlarında bir eksplantten meydana gelen sürgün sayısı



Şekil 4.7. Farklı BA konsantrasyonlarında meydana gelen sürgünlerin ortalama uzunlukları

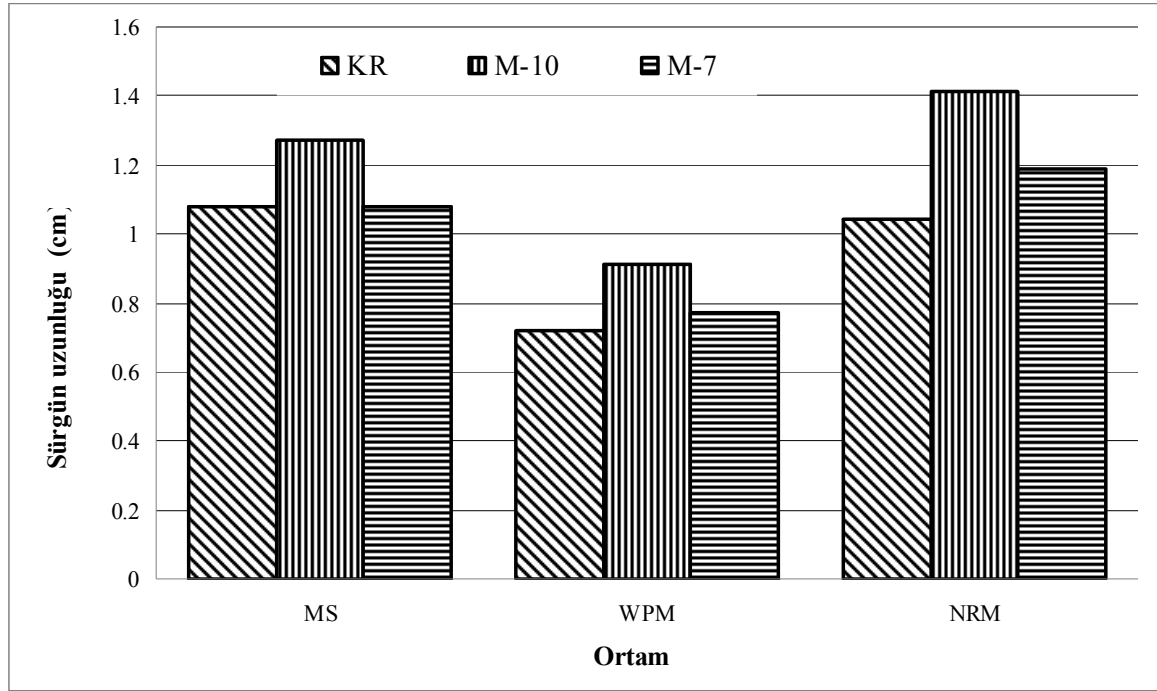
Eksplant başına oluşan sürgün sayısı bakımından Genotip x Ortam interaksyonu incelendiğinde; MS ortamında KR ile M-10 arasındaki fark önemsiz, KR ile M-10'un M-7 ile arasındaki fark önemli bulunmuştur. WPM ortamında KR ile M-10 arasındaki fark önemsiz, KR ile M-10'un M-7 ile arasındaki fark önemli bulunmuştur. NRM ortamında KR, M-10 ve M-7 arasındaki fark önemli bulunmuştur. Bir eksplanttan oluşan ortalama sürgün sayısı MS ortamında KR için 3.6, M-10 için 3.5 ve M-7 için 2.5, WPM ortamında

KR için 2.3, M-10 için 2.8 ve M-7 için 1.2; ve NRM ortamında KR için 2.5, M-10 için 5.9 ve M-7 için 4.1 bulunmuştur (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Genotip x Ortam interaksiyonunun bir eksplantten meydana gelen sürgün sayısı üzerine etkisi

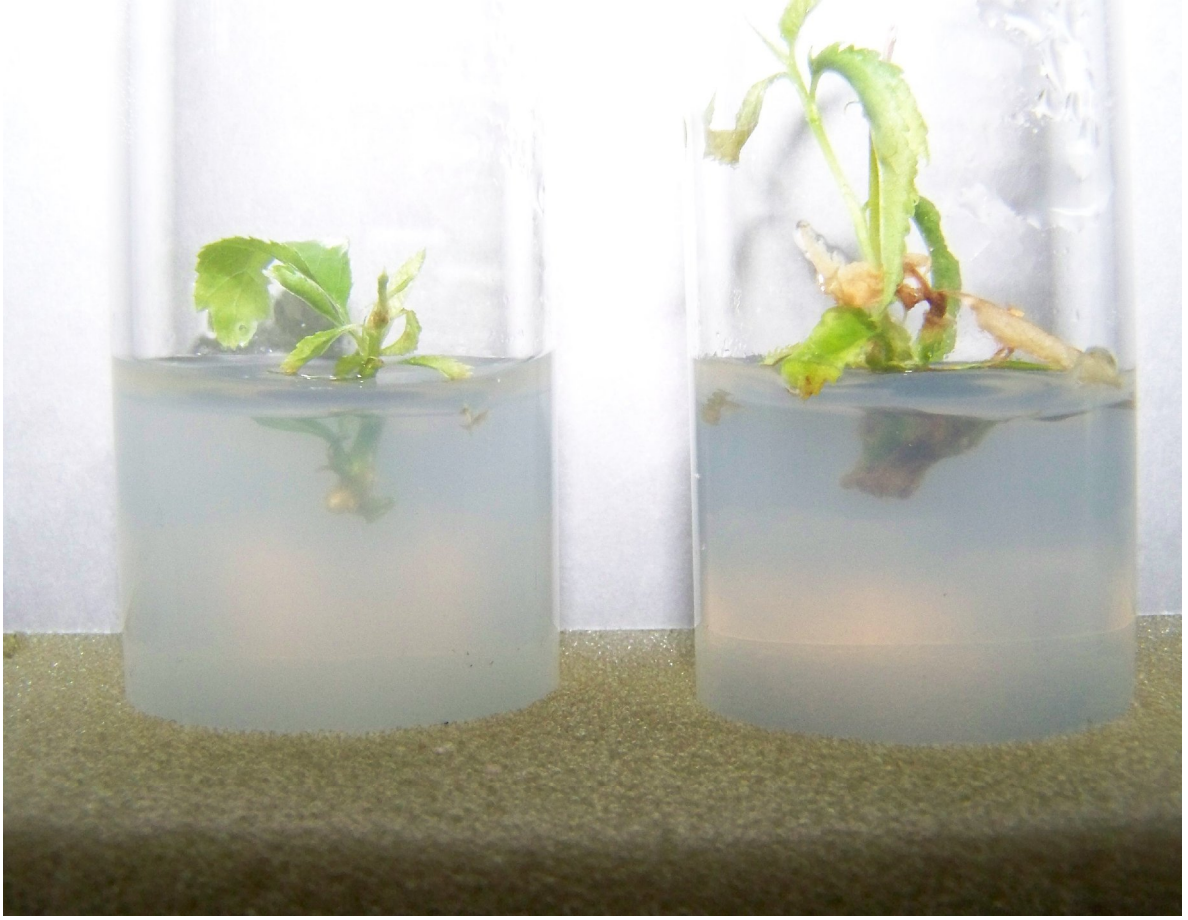
Eksplant başına oluşan sürgün uzunluğu bakımından Genotip x Ortam interaksiyonu incelendiğinde; MS ortamında KR, M-10 ve M-7 arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. WPM ortamında KR, M-10 ve M-7 arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. NRM ortamında KR, M-10 ve M-7 arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. MS ortamı üzerinde ortalama sürgün uzunluğu KR için 1.0 cm, M-10 için 1.2 cm ve M-7 için 1.0 cm; WPM ortamı üzerinde KR için 0.7 cm, M-10 için 0.9 cm ve M-7 için 0.7 cm; NRM ortamı üzerinde KR için 1.0 cm, M-10 için 1.4 cm ve M-7 için 1.1 cm bulunmuştur (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Genotip x Ortam interaksiyonunun ortalama sürgün uzunluğu üzerine etkisi

#### 4.3. Mikrosürgünlerin Köklendirilmesi ve Dış Ortama Aktarılması

Mikrosürgünler dokuzuncu altkültürden sonra köklendirmeye alınmıştır. Köklendirme muamelesinden yaklaşık bir ay sonra köklenen mikrosürgünlerin oranı düşük (%5'ten az) bulunmuştur. Benzer şekilde kök gelişimi (uzaması) çok yavaş olmuştur. Mikrosürgünlerde meydana gelen kökler genellikle 2 - 3 mm büyüdükten sonra kök büyümesi tamamen durmuştur (şekil 4.10). Köklenme oranı ve kök gelişimi yetersiz olduğundan dış ortama aktarma aşamasına başlanmamıştır



Şekil 4.10. Köklendirme işleminden yaklaşık 30 gün sonra mikro sürgünlerde meydana gelen köklenmeler.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemiz meyve yetiştiriciliği bakımından önemli ülkeler arasında yer almaktadır. Türkiye yabani meyve türleri bakımından oldukça zengindir. Ancak yabani meyve türlerinin potansiyelinden yeterince faydalandığımızı söylemek mümkün değildir. Yeterince değerlendirilmemiş olan bu türlerden biri *Cerasus microcarpa*'dır. Bu yabani türün potansiyelinden yararlanmaya yönelik çalışmalara bu araştırma ile başlanılmıştır.

Bazı meyve türleri için kullanılan anaçların çeşitli çevre koşulları ve bazı hastalıklara olan hassasiyetleri bu yabani türlerin önemini arttırmaktadır. Bu sebepten dolayı bu türler için etkin çoğaltma protokollerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu protokoller içerisinde en etkin olanlarından birisi mikroçoğaltımdır.

*Cerasus microcarpa* (subsp. *tortuosa*) için *in vitro* mikroçoğaltım protokolünün geliştirilmesi amacıyla yapılan bu çalışmada; kültürlerin sürdürülebilmesi için kültür ortamına sitokin (BA) eklenmesinin gerekli olduğu görülmüştür. Sürgün kalitesi, sayısı ve uzunluğu dikkate alındığında en uygun BA konsantrasyonunun 1.0 mg.l<sup>-1</sup> olduğu görülmüştür.

Kültürlerin çoğaltılmasında kullanılan ortamlar içerisinde genotipler için en uygun ortamın Nas ve Read (NRM) ortamı olduğu görülmüştür. Ayrıca, çoğaltma katsayısı ve sürgün uzunluğunun genotiplere bağlı olarak değiştiği belirlenmiştir. Bu nedenle *in vitro* kültüre daha iyi cevap veren genotiplerin araştırılmasına ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, *Cerasus microcarpa* (subsp. *tortuosa*)'nın mikroçoğaltımında karşılaşılan en ciddi problem mikrosürgünlerin yeterince uzamaması ve köklenmenin yetersiz olması olarak belirlenmiştir. Yetersiz köklenme mikroçoğaltım protokülünün başarısını sınırladığından bu problemin ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir. İyi bir köklenmenin sağlanabilmesi için zor köklenen türlerde ortam koşullarının iyileştirilmesiyle beraber altkültür sayısının artırılması etkili olabilir. Örneğin Nas ve Read (2004b) ortam optimasyonundan sonra alt kültür sayısını artırarak zor köklenen fındık mikrosürgünlerinde %95'in üzerinde bir köklenme elde etmişlerdir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, Dai ve ark. (2007)'nin kullandığı iki aşamalı köklendirme protokolu uygulanması ve Hepaksoy ve Tanrısever (2004)'in köklendirme ortamına aktif kömür ilavesi gibi muameleler ile yapılacak çalışmaları daha önemli kılmaktadır.

**KAYNAKLAR**

- AHMAD, T., RAHMAN, H., AHMED, CH. M. S., and LAGHARI, M.H., 2003. Effect of Culture Media and Growth Regulators on Micropropagation of Peach Rootstock GF-677. *Pakistan Journal of Botany*, 35(3): 331-338.
- AINSLEY, P.J., COLLINS, G.G. and SEDGLEY, M., 2001. *In vitro* Rooting of Almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In vitro Cellular and Development Biolgy-Plant*, 6:778-785 (8).
- ANDREU, P., and MARIN, J. A., 2005. *In vitro* Culture Establishment and Multiplication of The Prunus Rootstock “Adesoto 101” (*P. institia* L.) as Affected by The Type of Propagation of the Donor Plant and by the Culture Medium Composition. *Scientia Horticulturae*, 106 (2): 258-267.
- ANTONOPOULOU, C., DIMASSI, K., THERIOS, I., CHATZISSAVVIDIS, C., TSIRAKOGLU, V., 2005. Inhibitory Effects of Riboflavin (Vitamin B2 ) on the *In vitro* Rooting and Nutrient Concentration of Explants of Peach Rootstock GF 677 (*P. amygdalus* x *P. persica*).
- CABONI, E., LAURI, P., 2002. Micropropagation as a Tool to Evaluate Response to Fe-limiting Conditions in Almond Genotypes. *ISHS Acta Horticulturae* 591: III. International Symposium on Pistachios and Almonds. <http://www.ishs.org>
- CHANNUNTAIPAT, C., SEDGLEY, M. and COLLINS, G., 2003. Micropropagation of Almond Cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the Hybrid Rootstock Titan x Nemaguard. *Scientia Horticulturae*, 98 (4) : 473-484.
- CLUSTER, E., 1992. Improvement of *In vitro* Plant Cultures at Laboratory and Industrial Scales: Control of Gaseous Enviroment by Using Selective Membranes as Lids of Culture Containers. VI- Production and Storage. [www.nf-2000.org/secure](http://www.nf-2000.org/secure)
- COS, J., FRUTOS, D., SYNCHEZ, M.A., RODRIGUEZ, J. and CARRILLO, A., 2004. Determiration of the Optimal Culture Medium and Growth Regular Concentration for the *In vitro* Poliferation Stage of the Peach- Almond Hybrid Mayor. *ISHS Acta Horticulturae* 658: I International Symposium on Rootstocks for Deciduous Fruit Tree Species. <http://www.ishs.org>.
- DAI, H., Z. ZHANG, X. GUO. 2007. Adventitious Bud Regeneration from Leaf and Cotyledon Explants of Chinese Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. Major N.E.Br.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 43:2-8.
- DEBERGH, P.C., 1998. Micropropagation of Woody Species-State of the Art on *In vitro* Aspects. *ISHS Horticulturae* 227: International Symposium on Vegetative Propagation of Woody Species. <http://www.ishs.org>

- DIMASSITHERIOU, K., 1995. *In vitro* Rooting of Rootstock GF-677 (*P. amygdalus* x *P. persica*) as Influenced by Mineral Concentration of the Nutrient Medium and Type of Culture-tube Sealing Material. *Journal of Horticultural Science*, 70(1): 105–108.
- DURKOVIC, J., 2006. Rapid Micropropagation of Mature Wild Cherry. *Biologia Plantarum*, 50(4):733-736.
- EXADAKTYLOU, E., THOMİDİS, T. 2005. Susceptibility of Gisela 5 and Maxma 14 Cherry Rootstocks to four Phytophthora species. *Scientia Horticulturae* 106: 125–128.
- ESCALETTES V., and DOSBA F., 1993. *In vitro* Adventitious Shoot Regeneration from Leaves of *Prunus* spp. *Plant Science*, 90(2):201-209.
- FOTOPOULOS, S., SOTIROPOULOS, T. E., 2005. *In vitro* Rooting of PR 204/84 Rootstock (*P. amygdalus* x *P. persica*) as Influenced by Mineral Concentration of the Culture Medium and Exposure to Darkness for a Period. *Agronomy Research* 3(1), 3-8.
- FİDANCI, A., M. BURAK ve B. ERENOĞLU. 2002. Meyvecilikte kullanılan bazı klonal anaç ve çeşitlerinin *in vitro*'da hızlı çoğaltılma tekniklerinin belirlenmesi (<http://www.arastirma-yalova.gov.tr/ar444/yettek/yettek177.htm>).
- GENTILE, A., MONTICELLI, C., and DAMIANO, C., 2002. Adventif Shoot Regeneration in Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Cell Rep.*, 20: 1011-1016.
- GERÇEK, V., ŞAHİN, A., 2003. Yabani Kiraz (*Prunus Avium* L.)' In Doku Kültürü Tekniği ile Üretilmesi Doğu Karadeniz Ormancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi, Çevre ve Orman Bakanlığı Yayın No: 201, DKOYA Yayın No: 19, Trabzon, 2003
- GÜREL, S., GÜLŞEN, Y., 1998. The Effects of IBA and BAP on *In vitro* Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis* L.). *Tr. J. of Botany*, 22: 375-379.
- HEPAKSOY, S., TANRISEVER, A. 2004. Bazı Kiraz Anaçlarının Mikroçoğaltımı Üzerinde Araştırmalar II. Köklenme ve Dış ortama Alıştırma. *Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41(3):23-24.
- KAMALI, K., MAJIDI, E. and ZARGHAMI, R., 2001. Micropropagation of GF-677 Rootstocks (*P. amygdalus* x *P. persica*). 11. GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds CIHEAM-IAMZ. 56(175-177)
- LLOYD G, MCCOWN B (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427.

- MATT, A., and JEHLE, J. A., 2005. *In vitro* Plant Regeneration From Leaves and Internode Sections of Sweet Cherry Cultivars (*Prunus avium* L.) Plant Cell Rep., 24: 468-476.
- MOLASSIOTIS, A. N., DIMASSI, K., DIAMANTIDIS, G. and THERIOS, I., 2003. Fe-EDDHA Promotes Rooting of Rootstock GF-677 ( *P. amygdalus* x *P. persica*) Explants *In vitro* Biologia Plantarum 47 (1): 141-144.
- MOLASSIOTIS, A. N., DIMASSI, K., DIAMANTIDIS, G. and THERIOS, I., 2004. Changes in Peroxidases and Catalase Activity During *In vitro* Rooting. Biologia Plantarum, 48 (1):1-5 (5).
- MUNA, A., AHMAD, A., MAHMOUD, K., and ABDUL-RAHMAN, K., 1999. *In Vitro* Propagation of Semi-dwarfing Cherry Rootstock. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 59: 203-208
- MURASHIGE T, SKOOG F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.
- NAS MN, READ PE (2004a). A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. Sci. Hortic. 101:189-200.
- NAS MN, READ PE (2004b). Improved rooting and acclimatization of micropropagated hazelnut shoots. HortScience 39(7): 1688-1690.
- QUOIRIN, M., and LEPOIVRE, P., 1997. Etude de Milieux Adaptes Aux Cultures *in vitro* de Prunus. Acta Hort., 78:437-442.
- READ PE, YANG Q (1987). Novel growth regulator delivery systems for *in vitro* culture of horticultural crops. Acta Hort. 212: 55-59.
- RUZIC, D., SARIC, M., CEROVIC, R. and CULAFIC, L., 2000. Relationship Between the Concentration of Macro Elements, Their Uptake and Multiplication of Cherry Rootstock Gisela 5 *In vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 63(1): 9-14.
- RODRIGUES, A.C., SILVEIRA, C.A.P., FORTES, G.R. de L., FACHINELLO, J.C. and SILVA, J.B., 2003. Establishment and Multiplication *In vitro* of *Prunus* sp. In Different Culture Media. Rev. Bras. Frutic. 25 (1) Jaboticabal abr. www.scielo.br
- SILVEIRA, C.A.P., FACHINELLO, J.C. and FORTES, G.R. de L, 2001. *In vitro* Multiplication of *Prunus* Rootstocks in Different BAP Concentrations in Two Culture Media. Rev. Bras. Frutic., 23(3): 488-492.
- WEBSTER, T., TOBUTT, K., EVANS, K. 2000. Breeding and Evaluation of New Rootstocks for Apple, Pear and Sweet Cherry. The Compact Fruit Tree 33(4):100–104.

TÜBİVES (Türkiye Bitkileri Veri Servisi)- <http://www.tubitak.gov.tr/tubives>

ZİMMERMANN, A. 1994. Gisela 5, a dwarfing rootstock for Sweet cherries from Giessen in a trial. Obstbau 19: 62-63.

**ÖZGEÇMİŞ**

1980 yılında Kayseri’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Kayseri’de tamamladım. 2002 yılında Kahramanmaraş Sütçü imam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde yüksek öğrenimime başladım ve 2006 yılında mezun oldum. 2006 yılında aynı üniversitede Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım. Halen yüksek lisans öğrenimime devam etmekteyim.