

A Study on *In Vitro* Propagation Possibilities of Some Clone Rootstocks of *Prunus* Species

Mine Pakyurek (Corresponding author)
Siirt University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, 56100, Siirt, Turkey
E-mail: mine.pakyurek@siirt.edu.tr

Serra Hepaksoy
Ege University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, 35100, Izmir, Turkey
E-mail: serra.hepaksoy@ege.edu.tr

This study was produced from the PhD thesis of Mine Aksehirli Pakyurek and funded by Ege University Scientific Research Projects Office with the project number 07-ZRF-002.

Abstract

In vitro techniques which is one of the modern breeding methods offer alternative methods to meet the growing food demands in parallel with the increasing world population by allowing rapid and intensive mass propagation of varieties and rootstocks in fruit cultivation under laboratory conditions. Clone rootstocks which are economically important and early yielding with maximum yield per unit area are preferred in fruit production. In this study, the propagation possibilities of Marianna GF 8/1, Myrobolan B, Myrobolan 29-C and St Julien A clone rootstocks used in the production of stone fruit species were investigated. In this study, shoot tips were used as explants. MS (Murashige-Skoog) media was used as the propagation media and 30 g L⁻¹ sucrose and 7 g L⁻¹ agar were added. The shoot tips were planted into the media and then placed in the temperature and light controlled culture chamber. Samples were placed to the subculture at 1-month intervals. Explant length, number of leaves and number of tillings were observed every 20 days. Nine different MS media were tested during the shoot growth stage. The best propagation was obtained in the 1 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ IBA + 0.25 mg L⁻¹ GA3 media. Eight different MS media were tested during the rooting stage. The best rooting was achieved in a media containing 1/2 MS + 2 mg L⁻¹ IBA.

Keywords: Marianna GF 8/1, Myrobolan B, Julien A, Myrobolan 29-C, micropropagation, plant growth regulators.

DOI: 10.7176/JSTR/5-9-10

Prunus Türlerine Ait Bazı Klon Anaçlarının *In Vitro* Çoğaltma Olanakları Üzerine Bir Çalışma

Özet

Her geçen gün artan dünya nüfusuna paralel olarak büyüyen gıda ihtiyacını karşılamakta alternatif yeni yöntemler sunan ve bitki biyoteknolojisi adı altında toplanan modern ıslah yöntemlerinden *in vitro* teknikler meyvecilik alanında üretilmek istenen çeşit ve anaçların laboratuvar koşullarında hızlı ve yoğun bir biçimde kitlesel olarak çoğaltılmasına olanak tanımaktadır. Meyve üretiminde ekonomik açıdan önemli olan erken ürüne yatma ve birim alandan maksimum verim elde etme özelliklerine sahip klon anaçları tercih edilmektedir. Bu çalışmada sert çekirdekli meyve türlerinin üretiminde kullanılan Marianna GF 8/1, Myrobolan B, Myrobolan 29-C ve St. Julien A klon anaçlarının doku kültürü ile çoğaltılma olanakları araştırılmıştır. Çalışmada eksplant olarak sürgün uçları kullanılmıştır. Besin ortamı olarak MS (Murashige-Skoog) ortamı kullanılmış, 30 g L⁻¹ sakkaroz, 7 g L⁻¹ agar eklenmiştir. Sürgün uçları besin ortamına dikildikten sonra sıcaklık ve ışık kontrolü olan kültür odasına konulmuştur. Örnekler 1 ay aralıklarla alt kültüre alınmıştır. Her 20 günde eksplant boyu, yaprak sayısı ve kardeşlenme

sayısı gözlemlenmiştir. Sürgün çoğalması aşamasında 9 farklı MS ortamı denenmiştir. En iyi çoğalma 1 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ IBA + 0.25 mg L⁻¹ GA₃ ilave edilen ortamda elde edilmiştir. Köklendirme aşamasında 8 farklı MS ortamı denenmiştir. En iyi köklenme ise 1/2 MS + 2 mg L⁻¹ IBA içeren besin ortamında sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Marianna GF 8/1, Myrobolan B, St. Julien A, Myrobolan 29-C, mikroçoğaltım, bitki büyüme düzenleyiciler.

1.Giriş

Meyve yetiştiriciliğinde doğru anaç ve çeşit seçimi üretim kalitesini doğrudan etkileyen en önemli unsurlardan biri olduğu için tüm dünyada ve ülkemizde çeşide en uygun anaç geliştirilmesi ve kullanımı amacıyla yapılan çalışmalara önem verilmektedir. Özellikle sık dikime yönelik toprak ve iklim koşullarına uygun anaç geliştirme çalışmaları yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Anaçlar, çoğaltım şekillerine göre iki grupta incelenmektedir. Tohumla çoğaltılanlar “tohum anaç”, vejetatif olarak çoğaltılanlar ise “klon anaç” olarak adlandırılmaktadır. Heterozigotik yapıda olmaları nedeniyle açılım göstermeleri, aşırı kuvvetli büyümeleri ve geç verime yatmaları tohum anaçlarının olumsuz yönleridir. Bunun yanı sıra bazı çöğürler ağır topraklarda gelişmemekte ve özellikle *Phytophthora* Kök Çürüklüğü Hastalığına karşı oldukça hassasiyet göstermektedir (Hartmann ve Kester, 1983). Klon anaç kullanımıyla genotipin devamlılığı sağlanmakta, bir örnek bir populasyon yapısı oluşturulabilmekte ve gençlik kısırlığı döneminin kısaltılması ile ağaç daha erken meyveye yatmaktadır (Hartmann ve Kester, 1983). Günümüzde *Prunus* türlerinin üretiminde hem çöğür hem de klon anaçları kullanılmaktadır. Örneğin; erik üretiminde çöğür anaç olarak can eriklerinin yabani formları olan Myrobolan anaçları tercih edilmektedir. Klon anaç olarak da Myrobolan 29-C, Myrobolan B, Myrobolan GF 31, Marianna 2624, Marianna GF 8-1, Saint Julien A, Saint Julien 655/2, Pixy ve şeftali ile badem melezi olan GF 677 anaçları kullanılmaktadır (Anonim, 2008c). Bir başka sert çekirdekli meyve türü olan kayısı yetiştiriciliğinde de anaç olarak derin, geçirgen, su tutmayan, besin maddelerince zengin, tınlı veya tınlı-kireçli topraklar için kayısı çöğürleri kullanılmakla beraber kumlu topraklarda kayısı yetiştirilmek istendiğinde anaç olarak şeftali çöğürlerinin kullanılması daha kaliteli ürün alınmasını sağlamaktadır. Ayrıca ağır topraklarda yapılacak yetiştiricilik için ise Myrobolan (can erikleri) anaçları tercih edilmektedir (Anonim, 2008b).

Doku kültürü yöntemlerinden biri olan mikroçoğaltım tekniği, tam bir bitki oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, kök, sürgün, kallus, tek hücre veya polen tanesi vb.) alınan doku parçalarının yapay besin ortamında mikroorganizmalardan arındırılmış şartlar altında genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitkiyi hızlı çoğaltma amacıyla kullanılan bir tekniktir. Mikroçoğaltım tekniği, ziraat ve orman mühendisliğinin çalışma alanı içinde yer alan birçok bitki türü üzerinde uygulanmaktadır (Solarova ve Posposilova, 1997; Nguyen ve Kozai, 1998; Pospisilova ve ark., 1999; Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Mikroçoğaltımın başarısı, çoğaltım için kullanılan bitki parçasının (eksplant) alındığı bitkinin genotipi, sağlık durumu ile beslenme, ışık, sıcaklık, bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanması ve yetiştirme mevsimi gibi yetiştirme koşullarından doğrudan etkilenmektedir. Bitkinin, vejetatif gelişme evresinde olması da mikroçoğaltımın başarılı olmasını sağlayan bir başka faktördür. Vejetasyon periyodu içinde farklı dönemlerde alınan eksplantların kalitesi, çevresel faktörlerin etkisine bağlı olarak değişebilmektedir. Bu nedenle eksplantların, sürgün gelişiminin hızlı olduğu ve aktif büyümenin gerçekleştiği dönemlerde alınmasına özen gösterilmelidir (Debergh ve Read, 1993). Bu tekniğin temel safhaları; eksplant alınacak bitkinin seçimi, bitki örneklerinin alınması, örneklerin dikime hazırlığı ve besin ortamlarının hazırlığı adımlarını içeren hazırlık safhası, eksplantların yapay besin ortamlarına dikiminin yapıldığı kültür safhası, kültür ortamı içerisinde sürgün çoğaltım ve gelişimi safhası, köklendirme safhası ve dış ortama adaptasyon safhası şeklinde sıralanmaktadır (George ve ark., 2008).

Son yıllarda gelişmiş ülkelerde sert çekirdekli meyve türleri için kullanılan klon anaçları virüsten arı şekilde doku kültürü teknikleri ile yoğun olarak üretilmektedir (Muna ve ark., 1999; Ertürk ve ark., 2007). Türkiye’de de Tarım Bakanlığı bünyesinde bulunan araştırma enstitüleri ve özel sektöre bağlı laboratuvarlarda doku kültürü tekniği ile klon anaç üretimi yaygın hale gelmeye başlamıştır. Bununla birlikte hala mevcut üretim ihtiyaçlarının karşılanması için klon anaçlarının dış pazardan ithaline devam edilmektedir. Ülkemizde biyoteknolojik yöntemleri kullanarak klon anaç üretiminin ülke ihtiyaçları ölçüsünde artırılması ve yaygınlaştırılması anaçlık materyalin yurtdışından ithalini önleyecek ve üretimdeki girdi maliyetlerini azaltacaktır. Bu düşünceden hareket ederek yapılan bu çalışmada Marianna GF 8/1, Myrobolan B, Myrobolan 29-C ve Saint Julien A klon anaçlarının *in vitro* çoğaltım koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metod

2.1. Materyal

Araştırma, 2007-2009 yılları arasında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür. Isparta Eğirdir Meyvecilik Araştırma Enstitüsü'nde ismine doğru olarak üretilmiş Marianna GF 8/1, Myrobolan B, Myrobolan 29-C ve St. Julien A klon anaçlarından alınan sürgün uçları çalışmada eksplant olarak kullanılmıştır.

Marianna anaçları, *Prunus cerasifera* ve *Prunus munsoniana*'nın doğal melezlemesi sonucu Kaliforniya'da üretilmiştir. Bu gruptaki anaçların en önemlileri Marianna 2624 ve Marianna GF 8/1 dir. Bu çalışmada kullanılan Marianna GF 8/1 anacı yüzeysel kök oluşturur. Ağır ve nemli topraklarda yetişebildiği gibi, kumlu kireçli topraklarda çok iyi sonuç vermektedir. Bu anaç, *Phytophythora* ve meşe kök mantarı hastalıklarına toleranslı, kök ur nematoduna dayanıklı, bakteriyel kanser ve kök uru hastalıklarına ise hassastır. Çok verimli ağaçlar oluşturur. Odun çelikleri ve daldırma metodu ile kolay çoğaltılabilir. Marianna GF 8/1, tüm erik çeşitleri ile uyuşma göstermekle birlikte bazı şeftali, nektarin ve badem çeşitleri ile uyuşmazlık görülmektedir (Anonim, 1969; Hartmann ve Kester, 1983).

Myrobolan klon anaçları, *Prunus cerasifera* türünden İngiltere'de East Malling Araştırma Enstitüsü'nde geliştirilen Myrobolan A, B, C ve D anaçlarıdır. Bunlardan Myrobolan A, C ve D orta kuvvette ağaç meydana getirmekte ve ticari olarak kullanılmaktadır. Myrobolan B ise, özellikle Kuzey Avrupa grubu erikler için ticari olarak kullanılmaktadır. Bu gruptaki anaçlar değişik toprak tiplerine adapte olabilmeye, orta derinlikte kök meydana getirme, kuvvetli ve büyük ağaçlar oluşturma özelliğine sahiptir. Bunun yanı sıra geç meyveye yatmasına rağmen on yıldaki toplam verimi St. Julien A klon anacından daha yüksektir. Ayrıca kök ur nematoduna dayanıklı, bakteriyel kanser ve meşe kök mantarına hassastır (Büyükyılmaz ve Öz, 1994).

St. Julien A ise *Prunus institia* L. erik türünden elde edilmiştir. Yarı bodur olan bu klon anacı, ağır bünyeli toprakları sevmez. Aşırı soğuklara dayanıksız olup, drenajı iyi olan topraklarda önerilir. Üzerine aşılana çeşidin verimi üzerine olumlu etki eder, *Phytophythora* ve bakteriyel kanser hastalıklarına dayanıklıdır. Erik türlerinin yanı sıra şeftali, nektarin ve kayısıda da anaç olarak kullanılabilir. İngiltere ve İspanya'da kullanımı yaygındır (Büyükyılmaz ve Öz, 1994).

2.2. Yöntem

Bu çalışmada, MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır. Daha önce bu konuda yapılmış çalışmaların literatür bilgileri doğrultusunda, MS besin ortamına değişik bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak oksin grubundan, indol butirik asit (IBA) ve naftalen asetik asit (NAA); gibberellin grubundan, gibberellik asit (GA3); sitokinin grubundan, 6-benzilaminopürin (BAP) kullanılmıştır. Besin ortamlarına 30 g/L sakkaroz ile başlangıç aşamasında 7 g/L, köklenme aşamasında ise 6 g/L agar eklenmiştir. Steril saf su ile hazırlanan besin ortamlarının pH değerleri, 1N Sodyum Hidroksit (NaOH) ve 1N Hidroklorik Asit (HCL) kullanılarak ayarlanmıştır. Önceden sterilizasyonu yapılmış cam tüp veya kavanozlara konulan besin ortamları 121 °C'de 1,2 atmosfer basınçtaki otoklavda 20 dk süre ile tutulup sterilizasyon işleminden geçirilmiştir. Çalışmanın sürgün çoğaltma aşamasında dokuz, köklendirme aşamasında ise sekiz adet MS besin ortamı kullanılmış olup bu ortamların adları, bitki büyüme düzenleyici içerikleri, pH dereceleri ve kaynak bildirimleri aşağıda Çizelge 2.1 ve 2.2' de verilmiştir.

2.2.1. Bitki örneklerinin alınması, dikime hazırlanması ve sterilizasyonu

Mayıs ayında sabah erken saatlerde bitkilerden alınan sürgün ucu örnekleri, dokularda oluşacak su kaybını azaltmak amacıyla ıslak kağıtlara sarılarak, naylon poşetlere konulmuş ve buzluk içinde laboratuvara getirilmiştir. Bitki örneklerindeki küçük yapraklar, sürgün uçlarına zarar vermeyecek şekilde uzaklaştırılmış ve ardından çeşme suyu ile yıkanarak materyalin mikroorganizma yoğunluğu azaltılmıştır. Bu şekilde kaba kirinden arındırılan bitki örnekleri daha sonra sabunlu suya konulup, burada ara sıra karıştırılarak 20 dk bekletildikten sonra akan çeşme suyu altında 20 dk yıkanmış ve ön sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Ön sterilizasyon işleminden sonra laminar (yatay ve dikey düzlemde steril) hava akışlı kabine alınan örnekler, 20 dk süre ile % 4 sodyum hipoklorit içeren 1/5 oranında seyreltilmiş çözeltide bekletilerek sterilize edilmiştir. Daha sonra üç kez beşer dakika süre ile steril saf suda yıkanıp dezenfektan madde uzaklaştırılarak sterilizasyon işlemi tamamlanmış ve eksplantlar besin ortamlarına dikilmek üzere hazır hale getirilmiştir (Karvar ve Gülşen, 1990).

2.2.2. *In vitro* kültür koşulları

In vitro koşullarda kültüre alınan eksplantlar, başlangıç, çoğaltma ve köklendirme aşamalarında 24±1 °C sıcaklık ve 16 saat ışık, 8 saat karanlık koşullarda kültür odasında tutulmuştur. Kültür kabı olarak kullanılan cam tüplerin ağızları kendilerine ait kapaklar ile cam kavanoz ve petrielerin ağızları ise streç film ile kapatıldığından kültür odasında nem kontrolü yapılmamıştır.

2.2.3. Deneme planı ve verilerin analizi

Sürgün çoğaltma ve köklendirme aşamalarında denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre her kültür kabında 5 eksplant olacak şekilde, 3 tekerrürlü olarak petri ve kavanoz kurulmuştur. Elde edilen verilerin ortalama değerlerine göre besin ortamları ve ölçüm zamanları arasındaki farklılıklar ile ortam x zaman arasındaki interaksyonlar varyans analizi yöntemi (ANOVA) ile Minitab Paket Programı (MINITAB) kullanılarak F-testine göre kontrol edilmiştir (P<0.05). Ortaya çıkan önemli farklılıklar Duncan Testi ile % 5 hata sınırı esas alınarak saptanmıştır. İstatistik analizlerde yüzde oranlarının açığı karşılıkları kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Sürgün çoğaltma aşamasında kullanılan MS besin ortamları

Ortam Adı	Bitki Büyüme Düzenleyici İçeriği	pH	Kaynak
S 1	MS + 1 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ NAA	5.6	Özzambak ve Hepaksoy, 1997a
S 2	MS + 1 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ NAA + 0.1 mg L ⁻¹ GA3	5.6	Ruzic ve ark., 1998
S 3	MS + 1 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ IAA + 0.1 mg L ⁻¹ GA3	5.6	-----
S 4	MS + 2 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ IBA + 0.25 mg L ⁻¹ GA3	5.6	Hepaksoy, 2004
S 5	MS + 1 mg L ⁻¹ BAP + 0.5 mg L ⁻¹ IBA + 0.25 mg L ⁻¹ GA3	5.6	Hepaksoy ve Tanrı sever, 2004
S 6	MS + 4.4 mM BAP + 0.49 mM IBA + 0.29 mM GA3	5.6	Espinosa ve ark., 2006
S 7	MS + 4.4 mM BAP + 0.49 mM IBA + 0.29 mM GA3 + 1mM PG	5.6	Hammatt ve Grant, 1997
S 8	MS + 1 mg L ⁻¹ BAP	5.6	----
S 9	MS + 1 mg L ⁻¹ BAP	6.2	Özzambak ve Schmidt, 1991

Çizelge 2.2. Köklendirme aşamasında kullanılan MS besin ortamları

Ortam Adı	Bitki Büyüme Düzenleyici İçeriği	pH	Kaynak
K 1	MS + 0.3 mg L ⁻¹ NAA	5.6	Kamali ve ark., 2001
K 2	MS + 0.3 mg L ⁻¹ NAA + 1.4 mg L ⁻¹ Thiamin	5.6	Kamali ve ark., 2001
K 3	MS + 0.4 mg L ⁻¹ IBA + 0.3 mgL Thiamin	5.2	Morini ve Perrone, 2006
K 4	MS + 0.5 mg L ⁻¹ IBA + 283.72 mg L ⁻¹ PG	5.7	Paul ve Feucht, 1985
K 5	MS + 0.5 mg L ⁻¹ NAA + 283.72 mg L ⁻¹ PG	5.7	Paul ve Feucht, 1985
K 6	MS + 4.90 µM IBA	5.8	Pevalek-Kozlina ve Jelaska, 1987
K 7	1/2 MS + 2 mg L ⁻¹ IBA	5.6	Tang ve ark., 2002
K 8	1/2 MS + 2 mg L ⁻¹ NAA	5.6	Tang ve ark., 2002

3. Bulgular

3.1. Başlangıç ve Çoğaltma Aşaması

Vegetatif gelişmenin devam ettiği Mayıs ayı başında alınan sürgün uçları sterilizasyon işleminden geçirilerek sürgün çoğaltması için 9 farklı MS besin ortamına dikilmiştir. Çalışmada yer alan anaçların kültür ortamına alınmasından sonra kültürlerde oluşan enfeksiyon, doku kararması ve kuruma sebebiyle materyalde bazı kayıplar meydana gelmiştir. Ancak bu kayıplar çalışmanın devam etmesini engelleyecek düzeyde olmadığı için deneme geriye kalan sağlıklı kültürler ile yürütülmüştür. Ayrıca kültürlerde zaman zaman camsılaşma sorunu görülmüştür. Bu sorun da önemli düzeyde olmadığı için herhangi bir uygulama yapılmamıştır. İlk dikilen kültürler (Şekil 3.1) 4 hafta ara ile alt kültüre alınarak çoğaltma işlemi yapılmış ve yeterli *in vitro* sürgün elde edildikten sonra ortam denemelerine başlanmıştır. Bu

aşamada kurulan 60 günlük denemede yeni besin ortamlarına aktarılan mikro sürgünlerde sürgün boyu, yaprak sayısı ve kardeşlenme sayısı ölçülmüş ve bu ölçümler 0. (denemenin başladığı gün), 20., 40. ve 60. günlerde yapılmıştır. Bu üç parametreye ait bulguların istatistik analizleri ve yorumları aşağıda ilgili anacın adı altında verilmiştir.



Şekil 3.1. Sürgün çoğaltma aşamasında *in vitro* kültürler

3.1.1. Marianna GF 8/1 anacı

Bu anacın, bitki büyüme düzenleyici içerikleri farklı olan 9 MS besin ortamındaki sürgün gelişimi dikimden itibaren 60 gün boyunca izlenmiştir. 60 gün süresince besin ortamlarında elde edilen ortalama sürgün boyu değerleri Çizelge 3.1’ de görülmektedir. Ortalama sürgün boyu açısından ortamlar arasındaki farklılık ve ortam x zaman etkileşimi istatistiksel ($P < 0.05$) olarak önemli bulunmuştur.

Çizelge 3.1. Marianna GF 8/1 anacının besin ortamlarına göre ortalama sürgün boyları (mm)

Ortam	Ortalama Sürgün Boyu (mm)			
	0. gün	20.gün	40.gün	60.gün
S 1	15.13 bc	15.40 abc	17.00 abc	18.33 abc
S 2	16.00 abc	18.80 abc	21.60 ab	24.67 a
S 3	15.13 bc	19.47 abc	19.07 abc	19.67 abc
S 4	13.47 bc	15.47 abc	11.47 c	11.67 c
S 5	14.13 bc	16.27 abc	17.53 abc	0.00 d
S 6	15.27 bc	17.47 abc	18.93 abc	13.80 bc
S 7	13.53 bc	16.20 abc	17.13 abc	19.53 abc
S 8	13.67 bc	13.60 bc	15.53 abc	16.60 abc
S 9	17.00 abc	19.33 abc	21.67 ab	22.27 ab

Marianna GF 8/1 anacı için besin ortamına göre ortalama sürgün boyu açısından 60 günlük ortalama değerler dikkate alındığında 11,98 mm ile S5 ortamında en zayıf gelişme gerçekleşmiştir. En iyi sonuç ise S2 ortamında elde edilmiştir. Bu ortamda ortalama sürgün boyu 20.27 mm olarak belirlenmiştir. Bu ortamı S9, S3, S7, S1, S6, S8 ve S4 ortamları izlemiştir. Anacın *in vitro* sürgünlerinin, 60 gün boyunca kademeli olarak gösterdiği gelişim ortamlar bazında incelendiğinde S1, S2, S7 ve S9 ortamlarında, düzenli

bir gelişmenin devam ettiği görülmektedir. Buna karşılık, S3 ve S4 ortamlarında sürgün gelişimi 20. güne kadar artmış, bugünden sonra S3 ortamında bazı sürgünlerin büyüme uçlarında meydana gelen kurumalar, S4 ortamında ise bazı sürgünlerde ölümlerin olması nedeniyle 40. günde ortalama sürgün boyu değerlerinde düşüşler olmuştur. Ancak bu ortamlarda, sağlıklı kalan bitkilerde gelişmenin seyri iyi olduğu için 60. gün değerinde yeniden bir artış gözlenmiştir. S5 ve S6 ortamlarında ise, 40. güne kadar sürgün gelişimi devam etmiş, bundan sonra bitkilerde ölümler meydana gelmeye başlamıştır. Bu ölümler sonucunda S5 ortamında 60 gün sonunda canlı sürgün kalmazken, S6 ortamında az sayıda sürgün canlı kalmış ve 60. gün sonunda ortalama sürgün boyu değeri 13.80 mm'ye düşmüştür. S8 ortamında ise, ilk kültüre alınma tarihinden itibaren ilk 20 günde sürgün uçlarında kurumalar meydana gelmiş; ancak, canlı kalan sürgünler iyi gelişme gösterdiği için ortalama sürgün boyu değeri artış göstermiştir. Marianna GF 8/1 anacı için en uzun ortalama sürgün boyuna S1 (18.33 mm), S2 (24.67 mm), S3 (19.67 mm), S7 (19.53 mm), S8 (16.60 mm) ve S9 (22.27 mm) ortamlarında 60. günde; S5 (17.53 mm) ve S6 (18.93 mm) ortamlarında 40. günde ve S4 (15.47 mm) ortamında ise 20. günde ulaşıldığı görülmektedir. Bunun yanında en kısa ortalama sürgün boyu değeri ise S4 ortamında 40. günde 11.47 mm olmuştur. Denemenin başlangıcından 60. güne kadar, Marianna GF 8/1 anacı için, S1 ortamında 15.13 mm'den 18.33 mm'ye yükselen ortalama sürgün boyu değeri ile yaklaşık olarak % 20 oranında bir sürgün uzaması sağlanırken, bu oran, S2 ortamında % 50, S3 ortamında % 30, S7 ortamında % 45, S8 ortamında % 22 ve S9 ortamında ise % 31 olmuştur. S4, S5 ve S6 ortamlarında ise, deneme boyunca sürgün uzamasında düzenli bir artış gözlenmezken, S5 ortamında deneme sonunda hiç canlı sürgün kalmamıştır. S4 ve S6 ortamlarında ise değişik zamanlarda ölümler meydana geldiği için başlangıç değerlerinin de altında olan ortalama değerler oluşmuştur.

Yapılan istatistikî değerlendirilmeye göre, mikro sürgünlerin ortalama yaprak sayıları ortamlar açısından bir farklılık göstermezken, zamana ve ortam x zaman interaksyonuna göre istatistikî olarak fark göstermektedir ($P<0.05$). Elde edilen ortalama yaprak sayıları Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Marianna GF 8/1 anacı için ortalama yaprak sayıları zamana göre incelendiğinde düzenli bir artış göstermiştir. Deneme başında 7.82 adet/eksplant olan değer, 20. günde 9,05 adet/eksplant, 40. günde 9.48 adet/eksplant ve 60. günde ise 10,10 adet/eksplant değerine ulaşmıştır. Mikro sürgünlerin ortalama yaprak sayıları, sürgün boyu değerleri gibi 60 gün boyunca S1, S2, S3, S7, S8 ve S9 ortamlarında düzenli olarak artarken S4 ortamında 20. güne kadar artış göstermiştir. Bugünden sonra bitkilerde meydana gelen ölümler nedeniyle bu değer 40. günde azalmış; ancak, sağlıklı kalan bitkilerde gelişme iyi olduğu için 60. gün değerinde yeniden bir artış gözlenmiştir. S5 ortamında ise *in vitro* sürgünlerde 40. güne kadar yaprak oluşumu devam etmiştir. Bundan sonra sürgünlerin tamamında ölümler meydana gelmesi nedeniyle 60. gün sonunda canlı sürgün kalmamıştır. S6 ortamında ise 40. güne kadar ortalama değerlerde artış görülmüş, sonrasında bazı mikro sürgünlerin ölmesi nedeniyle ortalama yaprak sayısı değerinde azalma olmuştur.

Çizelge 3.2. Marianna GF 8/1 anacının besin ortamlarına göre ortalama yaprak sayıları (adet/eksplant)

Ortam	Ortalama yaprak sayısı (adet/eksplant)			
	0. gün	20.gün	40.gün	60.gün
S 1	7.53 abcd	8.27 abcd	9.33 abcd	10.27 abcd
S 2	8.07 abcd	9.60 abcd	11.13 abcd	12.53 ab
S 3	7.13 abcd	10.20 abcd	10.47 abcd	10.93 abcd
S 4	7.60 abcd	8.80 abcd	6.53 cd	6.73 bcd
S 5	9.80 abcd	11.00 abcd	11.87 abcd	0.00 e
S 6	7.53 abcd	9.47 abcd	10.33 abcd	6.80 abcd
S 7	6.27 d	8.27 abcd	8.80 abcd	10.47 abcd
S 8	7.33 abcd	8.93 abcd	10.27 abcd	11.13 abcd
S 9	9.13 abcd	10.80 abcd	12.13 abc	12.60 a

Bir diğer ifade ile bu ortamlarda deneme süresince yaprak oluşumu ve gelişmesi devam etmiştir. S5 ortamında 11.87 adet/eksplant ve S6 ortamında 10.33 adet/eksplant ile 40. günde, S4 ortamında ise 8.80 adet/eksplant ile 20. günde en yüksek değerlere ulaşmıştır. Eksplant başına düşen en az ortalama yaprak sayısının ise S4 ortamında 40. günde 6.53 adet/eksplant olduğu belirlenmiştir. Deneme süresince

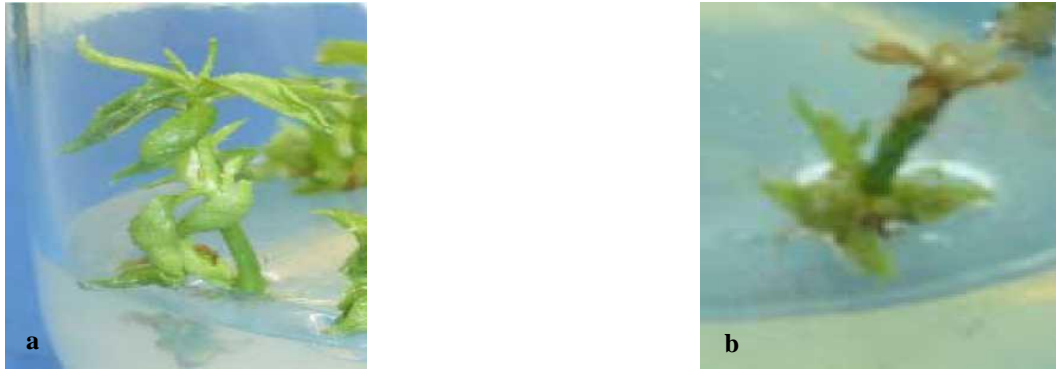
ortalama yaprak sayısı S1 ortamında 7.53 adet/eksplant değerinden 10.27 adet/eksplant değerine yükselerek yaklaşık olarak % 36 oranında artış gösterirken; bu artış S2 ortamında % 50, S3 ortamında % 53, S7 ortamında % 63, S8 ortamında % 54 ve S9 ortamında ise % 38 oranında olmuştur. Sürgün gelişimine paralel olarak yine S4, S5 ve S6 ortamlarında mikro sürgünlerde meydana gelen ölümler nedeniyle ortalama yaprak sayısında bir artış gözlenememiştir.

İn vitro koşullarda Marianna GF 8/1 anacının ortalama kardeşlenme sayıları açısından, ortama, zamana ve ortam x zaman interaksiyonuna göre bazı farklılıklar belirlenmekle birlikte bu farklılıklar istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Ortalama kardeşlenme sayıları Çizelge 3.3' te görülmektedir.

Çizelge 3.3. Marianna GF 8/1 anacının besin ortamlarına göre ortalama kardeşlenme sayıları (adet/eksplant)

Ortam	Ortalama kardeşlenme (adet/eksplant)		
	20. gün	40. gün	60. gün
S 1	0.33	0.60	1.27
S 2	0.73	1.40	2.47
S 3	0.33	0.40	0.93
S 4	0.67	1.07	1.67
S 5	0.73	1.53	0.00
S 6	0.47	0.67	0.93
S 7	0.73	0.67	1.33
S 8	0.67	0.33	0.87
S 9	0.73	1.20	1.93

Her üç parametre birlikte incelendiğinde en başarılı ortamlar S2, S7, S9, S3 ve S8 olmuştur. Bu ortamları S1 ortamı takip etmiştir. Başarısı daha düşük olan ortamlar ise S5, S4 ve S6'dır. Şekil 3.1'de anacın S2 ve S5 ortamlarındaki gelişme durumu görülmektedir.



Şekil 3.1. Marianna GF 8/1 anacının S2 (a) ve S5 (b) ortamlarında 5. hafta sonundaki gelişme durumu.

3.1.2. Myrobolan B anacı

Bu anacın, bitki büyüme düzenleyici içerikleri farklı olan 9 MS besin ortamındaki sürgün gelişimi 60 gün boyunca izlenmiştir. Sürgün boyu bakımından ortamın, zamanın ve ortam x zaman arasındaki interaksiyonun etkisi ($P < 0.05$) istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Elde edilen ortalama değerler Çizelge 3.4' te görülmektedir. Besin ortamına göre ortalama sürgün boyları değerlendirildiğinde S6 ortamının 18.27 mm değeri ile ilk sırada yer aldığı; bunu S5, S9, S2, S1, S8, S3, S7 ortamlarının takip ettiği ve 8.40 mm değeri ile en az ortalama sürgün boyunun S4 ortamına ait olduğu görülmektedir.

Bu anac için 0. gün ölçülen ortalama sürgün boyu 13.67 mm iken; bu değer 20. günde 15.59 mm, 40. günde 15.41 mm ve 60. günde ise 12.47 mm olmuştur. Ortalama sürgün boyu değerleri 20. güne kadar yükselme göstermiş ve bugünden sonra sürgünlerde meydana gelen kuruma ve ölümler nedeniyle 40.

gün ve 60. gün ortalama değerleri düşmüştür. Myrobolan B anacının sürgün gelişimi 60 günlük deneme boyunca S2, S5, S6 ve S9 ortamlarında düzenli olarak artmıştır. Buna karşılık S1 ve S4 ortamlarında sürgün gelişimi 20. güne kadar artmış, bugünden sonra mikro sürgünlerin uçlarında meydana gelen kuruma ve sürgünlerin ölmesi nedeniyle 40. günde ortalama sürgün boyu değeri azalmış, ancak sağlıklı kalan bitkilerde gelişme iyi olduğu için 60. gün değerinde yeniden bir artış gözlenmiştir. S3, S7 ve S8 ortamlarında ise 40. güne kadar ortalama değerlerde artış olurken; sonrasında S3 ve S7 ortamlarında kuruyan ve S8 ortamında ise ölen mikro sürgünler nedeniyle ortalama sürgün boyu değerinde azalma görülmüştür.

Çizelge 3.4. Myrobolan B anacının besin ortamlarına göre ortalama sürgün boyu (mm) değerleri

Ortam	Ortalama Sürgün Boyu (mm)			
	0. gün	20.gün	40.gün	60.gün
S 1	13.87 abc	14.27 abc	13.40 abc	15.00 abc
S 2	12.33 bc	14.33 abc	16.33 abc	19.60 ab
S 3	13.40 abc	15.20 abc	15.67 abc	9.13 cd
S 4	14.47 abc	14.67 abc	2.20 d	2.27 d
S 5	12.80 abc	15.93 abc	18.73 ab	19.60 ab
S 6	14.60 abc	18.00 ab	19.93 ab	20.53 a
S 7	12.20 bc	15.67 abc	16.67 abc	3.33 d
S 8	14.93 abc	16.80 abc	19.00 ab	4.20 d
S 9	14.40 abc	15.47 abc	16.73 abc	18.60 ab

En yüksek ortalama sürgün boyunun S1, S2, S5, S6 ve S9 ortamlarında 60. günde, S3, S7 ve S8 ortamlarında 40. günde, S4 ortamında ise 20. günde olduğu görülmektedir. En düşük ortalama sürgün boyu değeri ise S4 ortamında 40. günde oluşmuştur. Denemenin başlangıcından 60. güne kadar S1 ortamında 13.87 mm'den 15.00 mm'ye yükselen ortalama sürgün boyu değeri ile yaklaşık olarak %8 oranında bir sürgün uzaması sağlanırken; bu oran S2 ortamında %59, S5 ortamında %53, S6 ortamında %41 ve S9 ortamında ise %29 olmuştur. S3, S4, S7 ve S8 ortamlarında ise deneme boyunca sürgün uzamasında düzenli bir artış gözlenmemiş, S3 ve S7'de bazı sürgünlerin tamamen kuruması ve S4 ve S8'de ise bazı sürgünlerin ölmesinden dolayı deneme sonundaki ortalama değerler başlangıç değerlerinin de altına düşmüştür.

Myrobolan B anacının yaprak sayısı açısından ortamın, zamanın ve ortam x zaman interaksiyonunun etkisi ($P<0.05$) istatistiksel olarak önemlidir. Elde edilen ortalama değerler Çizelge 3.5' te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Myrobolan B anacının besin ortamlarına göre ortalama yaprak sayıları (adet/eksplant)

Ortam	Ortalama yaprak sayısı (adet/eksplant)			
	0. gün	20.gün	40.gün	60.gün
S 1	8.93 bcdef	10.33 abcde	9.67 abcde	10.80 abcd
S 2	7.27 def	8.40 bcdef	9.73 abcde	11.67 abcd
S 3	5.87 efg	7.80 cdef	8.00 cdef	4.67 fgh
S 4	7.20 def	7.67 cdef	0.80 h	0.87 h
S 5	9.00 bcdef	10.87 abcd	12.27 abc	12.87 ab
S 6	6.93 def	8.73 bcdef	9.80 abcde	10.33 abcde
S 7	7.73 cdef	10.07 abcde	10.60 abcd	2.33 gh
S 8	7.27 def	8.80 bcdef	10.73 abcd	2.53 gh
S 9	11.20 abcd	12.20 abc	12.80 ab	13.93 a

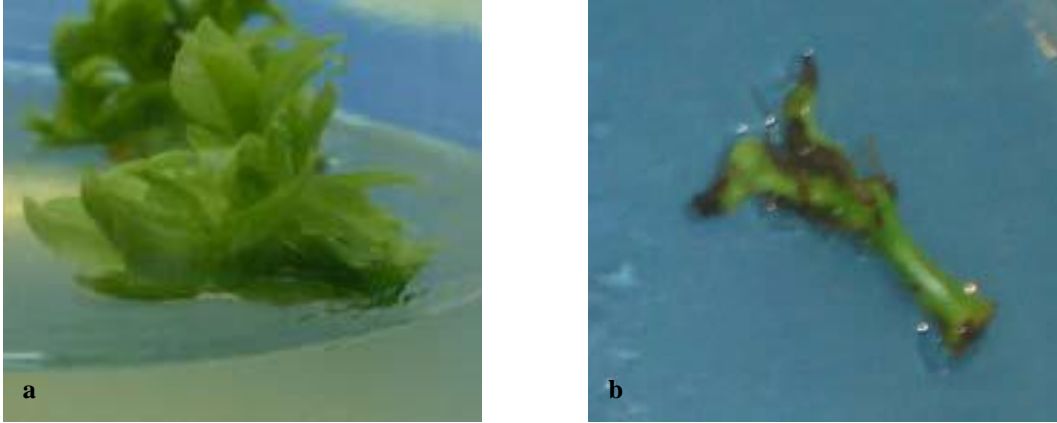
Ortalama yaprak sayısı zamana göre incelendiğinde 20. gün değeri 9.43 adet/eksplant'a yükselirken, 40. gün değeri 9.38 adet/eksplant, 60. gün değeri ise 7.78 adet/eksplant olmuştur. Ortalama değerlerin 20. güne kadar artış gösterdiği; ancak, 40. günden itibaren düştüğü görülmektedir. Besin ortamları bakımından ortalama yaprak sayıları incelendiğinde ise 12.53 adet/eksplant değeri ile S9 ortamının en yüksek ortalama değere ulaştığı saptanmıştır. Bu ortamı; S5, S1, S2, S6, S7, S8, S3 ve S4 (4.13 adet/eksplant) ortamlarının izlediği belirlenmiştir. S2, S5, S6 ve S9 ortamlarında Myrobolan B anacının yaprak sayısı da sürgün boyu gibi 60 gün boyunca düzenli olarak artmıştır. S1 ve S4 ortamlarında ise 20. güne kadar artmış, sonrasında sürgünlerin ucunda meydana gelen kuruma ve sürgünlerdeki ölümler nedeniyle 40. günde ortalama yaprak sayısı değeri azalmıştır. Ancak sağlıklı kalan sürgünlerde gelişme iyi olduğu için 60. gün değerinde yeniden bir artış gözlenmiştir. S3, S7 ve S8 ortamlarında ise 40. güne kadar ortalama değerlerde artış olurken, sonrasında mikro sürgünlerde oluşan kurumalar nedeniyle ortalama değerin azaldığı tespit edilmiştir. Denemede en yüksek ortalama yaprak sayısı değerine S1 (10.80 adet/eksplant), S2 (11.67 adet/eksplant), S5 (12.87 adet/eksplant), S6 (10.33 adet/eksplant) ve S9 (13.93 adet/eksplant) ortamlarında 60., S3 (8.00 adet/eksplant), S7 (10.60 adet/eksplant) ve S8 (10.73 adet/eksplant) ortamlarında 40., S4 (7.67 adet/eksplant) ortamında ise 20. günde ulaşıldığı görülmektedir. En düşük ortalama yaprak sayısı ise S4 ortamında 40. günde 0,80 adet/eksplant olmuştur. Ortalama yaprak sayısı, deneme sonuna kadar S1 ortamında 8,93 adet/eksplant değerinden 10,80 adet/eksplant değerine ulaşarak yaklaşık %21 oranında bir artış sağlarken bu artış S2 ortamında %60, S5 ortamında %42, S6 ortamında %49 ve S9 ortamında ise %24 olmuştur. Bu anacın ortalama kardeşlenme sayısı, ortama ve zamana göre farklılık göstermektedir ($P < 0.05$) ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemlidir. Elde edilen ortalama değerler Çizelge 3.6' da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Myrobolan B anacının besin ortamlarına göre ortalama kardeşlenme sayıları (adet/eksplant)

Ortam	Ortalama kardeşlenme sayısı (adet/eksplant)			Ortalama
	20.gün	40.gün	60.gün	
S 1	0.40	0.53	0.93	0.62 de
S 2	0.40	0.53	0.93	0.62 de
S 3	0.20	0.20	0.60	0.33 ef
S 4	0.07	0.00	0.00	0.02 f
S 5	0.93	1.67	2.13	1.57 a
S 6	0.87	1.53	2.07	1.48 ab
S 7	0.07	0.07	0.07	0.07 f
S 8	0.13	0.33	0.13	0.20 ef
S 9	0.53	0.33	1.47	0.77 cd

Zamana göre ortalama kardeşlenme sayıları incelendiğinde, 20. günden itibaren kardeşlenme durumunun düzenli olarak artmıştır. Denemenin 20. gününde 0.44 adet/eksplant olan ortalama kardeşlenme sayısının, 40. günde 0.66 adet/eksplant ve 60. günde ise 0.96 adet/eksplant değerine yükseldiği görülmektedir. Ortamlar bakımından kardeşlenme durumu incelendiğinde en başarılı sonucu 1.57 adet/eksplant ile S5 ortamı vermiş; bu ortamı S6, S2, S9, S1, S3, S8, S7 ve S4 (0.02 adet/eksplant) ortamları izlemiştir. S1, S2, S3, S5 ve S6 ortamlarında ortalama kardeşlenme sayısı deneme boyunca düzenli bir artış gösterirken; S4 ortamında, 20. güne kadar artmış ve sonrasında bütün sürgünlerin ölmesi sebebiyle geride canlı sürgün kalmamıştır. S7 ve S8 ortamlarında denemenin 20. ve 40. gün değerleri aynı olmuştur. S7'de ilk 20 günde kardeşlenme meydana gelirken daha sonraki günlerde sürgün uçlarındaki kurumalar sebebiyle ortalama kardeşlenme sayısı sabit kalmıştır. S8'de 40. günde artan ortalama kardeşlenme sayısı (0.33 adet/eksplant), sürgünlerin ölmesi yüzünden 60. ve 20. gün değerleri (0.13 adet/eksplant) ile aynı olmuştur. S9 ortamında ise 20. gün değerinin artmasının ardından sürgünlerdeki kurumalar nedeniyle 40. gün değeri azalmıştır. Ancak canlı kalan sürgünlerin gelişmesi iyi olduğundan 60. günde yeniden bir artış kaydedilmiştir. Anacın en yüksek ortalama kardeşlenme sayısı 1.57 adet/eksplant ile S5 ve 1,48 adet/eksplant ile S6 ortamlarında elde edilirken; en düşük ortalama kardeşlenme sayıları ise S4 (0.02 adet/eksplant) ve S7 (0.07 adet/eksplant) ortamlarında elde edilmiştir.

Myrobolan B anacı için, sürgün çoğaltma aşamasında denenen MS besin ortamları farklı ölçüde başarı göstermiştir. Ortamlar sürgün boyu, yaprak sayısı ve kardeşlenme durumu açısından genel olarak değerlendirildiğinde en başarılı olanlar sırasıyla S2, S5, S6 ve S9' dur. S4, S7 ve S3 ortamları ise en az başarı gösteren ortamlardır.



Sekil 3.2. Myrobolan B anacının S2 (a) ve S4 (b) ortamlarında 5. hafta sonundaki gelişme durumu

3.1.3. Myrobolan 29-C anacı

Başlangıç ve sürgün çoğaltma aşamasında S2, S3, S4, S6, S7, S8 ve S9 ortamlarında bulunan bu anaca ait mikro sürgünlerin ölmesi nedeniyle 60 günlük deneme, sadece S1 ve S5 ortamlarında kurulabilmiştir. Yapılan varyans analizine göre bu anaçta sürgün gelişimi, ortama göre fark göstermektedir ($P<0.05$) ve bu fark istatistiksel açıdan önemlidir. Elde edilen ortalama değerler Çizelge 3.7' de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Myrobolan 29-C anacının besin ortamlarına göre ortalama sürgün boyu (mm) değerleri

Ortam	Ortalama sürgün boyu (mm)				Ortalama
	0.gün	20.gün	40.gün	60.gün	
S 1	9.47	9.73	10.67	10.47	10.08 b
S 5	12.20	16.40	19.60	20.93	17.28 a

Bu anaçta denenen iki besin ortamından biri olan S5 ortamında ortalama sürgün boyu değerleri deneme sonuna kadar düzenli olarak artmıştır. S1 ortamında ise 40. güne kadar ortalama değerler artmış, daha sonra mikro sürgünlerin ölmesi nedeniyle 60. günde değerler azalmıştır. En uzun sürgün (20,93 mm), S5 ortamında 60. günde elde edilirken, en kısa sürgün (9,73 mm) ise S1 ortamında 20. günde oluşmuştur. S5 ortamında ortalama sürgün boyu, deneme başında 12,20 mm iken deneme sonunda 20,93 mm değerine ulaşarak yaklaşık % 71 oranında bir artış kaydedilmiştir. İki ortam açısından en iyi sürgün uzaması 17,28 mm ile S5 ortamında elde edilmiştir. S1 ortamı ise sürgün boyu açısından deneme süresince düzenli bir artış göstermemiştir.

Deneme süresinde izlenen mikro sürgünlerin yaprak gelişimi, ortama göre farklılık göstermektedir ($P<0.05$) ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemlidir. Elde edilen ortalama değerler Çizelge 3.8' de görülmektedir.

Çizelge 3.8. Myrobolan 29-C anacının besin ortamlarına göre ortalama yaprak sayıları (adet/eksplant)

Ortam	Ortalama yaprak sayısı (adet/eksplant)				Ortalama
	0.gün	20.gün	40.gün	60.gün	
S1	6.00	5.20	5.67	5.53	5.60 b
S5	6.27	8.60	10.40	11.20	9.12 a

S5 ortamındaki ortalama yaprak sayısı, sürgün boyunda olduğu gibi deneme sırasında düzenli olarak artmıştır. S1 ortamında ise deneme başındaki ortalama değer mikro sürgünlerde meydana gelen ölümler nedeniyle 20. günde azalmış, daha sonra canlı kalan sürgünlerde iyi bir gelişme olduğundan 40. gün değeri artmıştır. Ancak yine sürgünlerin ölmesi sebebiyle 60. günde ortalama değer tekrar düşmüştür. En iyi yaprak oluşumu (11.20 adet/eksplant), S5 ortamında 60. günde sağlanırken, en az yaprak (5.20 adet/eksplant) S1 ortamında 20. günde oluşmuştur. S5 ortamında ortalama yaprak sayısı, deneme başında 6.27 adet/eksplant iken deneme sonunda 11.20 adet/eksplant değerine ulaşmış ve yaklaşık %79 oranında bir artış kaydedilmiştir. S1 ortamında ise yaprak oluşumu açısından deneme süresince düzenli bir artış gözlenmemiştir.

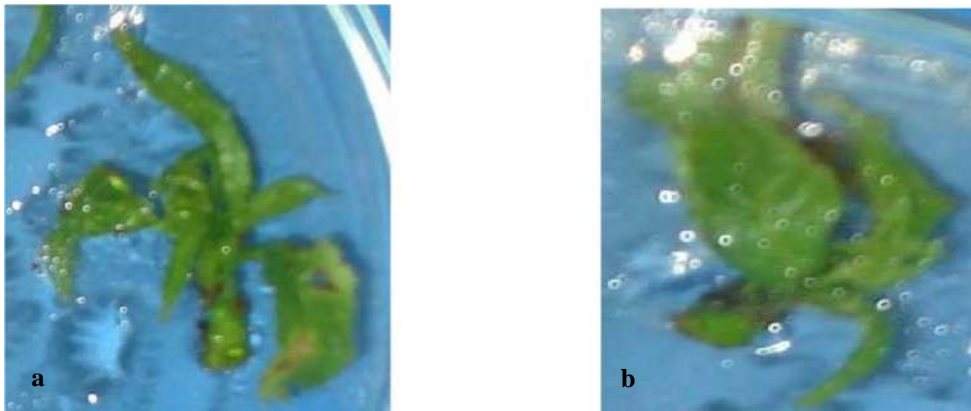
Bu anacın kardeşlenme sayısı ortam x zaman interaksiyonuna göre fark göstermiştir ($P<0.05$) ve bu fark istatistiksel olarak önemlidir. Elde edilen ortalama değerler Çizelge 3.9 'da görülmektedir.

Çizelge 3.9. Myrobolan 29-C anacının besin ortamlarına göre ortalama kardeşlenme sayıları (adet/eksplant)

Ortam	Ortalama kardeşlenme sayısı (adet/eksplant)		
	20.gün	40.gün	60.gün
S 1	0.93 bc	0.80 bc	0.80 bc
S 5	0.73 c	1.87 ab	2.47 a

Kardeşlenme miktarı zamanla paralel bir artış göstermiştir. 0.83 adet/eksplant olan 20. gün değeri, deneme sonunda 1.63 adet/eksplant olmuştur. Ortalama değerler S5 ortamında, S1 ortamından iki kat daha fazla sürgün çoğalmasının gerçekleştiğini göstermektedir. Bu anacın ortalama kardeşlenme sayısı, S5 ortamında deneme boyunca düzenli olarak artarken S1 ortamında düzenli bir artış göstermemiştir. S1 ortamında 20. günde 0.93 adet/eksplant olan ortalama değer, mikro sürgünlerdeki ölümler nedeniyle 40. günde 0.80 adet/eksplant'a düşmüştür. En iyi ortalama kardeşlenme sayısı (2.47 adet/eksplant), S5 ortamında 60. günde elde edilirken, en düşük ortalama değer (0.80 adet/eksplant) ise S1 ortamında 40. günde sağlanmıştır. S5 ortamında 0.73 adet/eksplant ortalama değeri ile başlayan denemenin 60. gün değeri 2.47 adet/eksplant olmuştur. Bu anacın ortalama kardeşlenme sayısı, deneme sonunda yaklaşık 2-3 kat artış göstermiştir. En iyi ortalama kardeşlenme sayısı 1.27 adet/eksplant ile S5 ortamında elde edilmiştir.

Myrobolan 29-C anacının, bu iki besin ortamındaki gelişme durumları değerlendirildiğinde S5 ortamının S1 ortamından daha başarılı sonuç verdiği görülmektedir. Ortamlardaki gelişme durumları Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Myrobolan 29-C anacının S5 (a) ve S1 (b) ortamlarında 5. hafta sonundaki gelişme durumu

3.1.4. St. Julien A anacı

Mikro sürgün gelişimi 60 gün izlenen bu anacın, sürgün boyu, ortam x zaman interaksiyonuna göre fark göstermektedir ($P<0.05$) ve bu fark istatistiksel açıdan önemlidir. Elde edilen ortalama değerler Çizelge

3.10'da verilmiştir. Ortamlara göre ortalama sürgün boyu incelendiğinde S3 ortamının 21.32 mm ortalama sürgün boyu değeri ile en başarılı besin ortamı olarak ilk sırada bulunduğu; bu ortamı, S2, S9, S5, S6, S8, S7, S1 ve S4 (3.43 mm) ortamlarının takip ettiği görülmektedir.

Çizelge 3.10. St. Julien A anacının besin ortamlarına göre ortalama sürgün boyu (mm) değerleri

Ortam	Ortalama sürgün boyu (mm)			
	0. gün	20. gün	0. gün	60. gün
S 1	10.93 ghij	10.73 ghij	9.73 hij	6.73 ijk
S 2	14.93 bcdefghi	16.93 bcdefgh	18.53 bcdefg	22.33 abcd
S 3	17.67 bcdefgh	19.60 abcdef	21.13 abcdef	26.87 a
S 4	13.73 efghij	0.00 k	0.00 k	0.00 k
S 5	14.33 cdefghi	14.93 bcdefghi	17.07 bcdefgh	18.07 bcdefgh
S 6	13.33 efghij	15.80 bcdefgh	17.87 bcdefgh	14.93 bcdefghi
S 7	12.67 fghij	15.33 bcdefgh	13.87 defghij	6.07 jk
S 8	15.13 bcdefgh	21.27 abcde	23.20 ab	0.00 k
S 9	13.00 efghij	15.73 bcdefgh	19.80 abcdef	22.40 abc

Aseptik koşullarda S2, S3, S5, S9 ortamlarında St. Julien A anacının sürgün gelişimi deneme süresince düzenli olarak artmıştır. S7 ortamında 12.67 mm olan ortalama sürgün boyu 20. günde 15.33 mm değerine ulaşmış ve bugünden sonra sürgünlerde meydana gelen ölümler nedeniyle 40. günden sonra giderek azalmıştır. S6 ve S8 ortamlarında, 40. güne kadar ortalama değerlerde artış olurken, sonrasında mikro sürgünlerde oluşan ölümler sebebiyle S6 ortamında ortalama değer azalmış, S8 ortamında ise hiç canlı sürgün kalmamıştır. S1 ve S4 ortamlarında ortalama sürgün boyunda herhangi bir artış gözlenmemiştir. S1 ortamında mikro sürgünlerin uçlarında meydana gelen kurumalar nedeniyle değerler sürekli azalırken, S4 ortamında bulunan sürgünler de deneme sonuna kadar canlılığını koruyamamıştır. En yüksek ortalama sürgün boyu değeri S3 ortamında 60. günde 26.87 mm olurken, en düşük değer S7 ortamında 60. günde 6.07 mm olmuştur. Bu anacın, ortalama yaprak sayıları ortam x zaman interaksyonuna göre fark göstermektedir ($P<0.05$) ve bu fark istatistiki açıdan önemlidir. Elde edilen ortalama değerler Çizelge 3.11'de görülmektedir.

Çizelge 3.11. St. Julien A anacının besin ortamlarına göre ortalama yaprak sayıları (adet/eksplant)

Ortam	Ortalama yaprak sayısı (adet/eksplant)			
	0.gün	20.gün	40.gün	60.gün
S 1	5.80 efgh	6.13 efgh	5.67 fgh	3.87 ghi
S 2	7.93 cdefgh	9.33 abcdef	10.27 abcdef	12.40 abcd
S 3	8.53 abcdefg	9.40 abcdef	10.27 abcdef	13.47 ab
S 4	5.40 fgh	0.00 ı	0.00 ı	0.00 ı
S 5	7.60 cdefgh	7.93 cdefgh	9.00 abcdefg	9.67 abcdef
S 6	7.40 cdefgh	9.07 abcdefg	10.33 abcdef	8.33 bcdefgh
S 7	6.73 efgh	8.80 abcdefg	7.13 defgh	3.20 hı
S 8	9.33 abcdef	12.47 abc	13.80 a	0.00 ı
S 9	7.00 efgh	8.67 abcdefg	11.07 abcde	12.60 abc

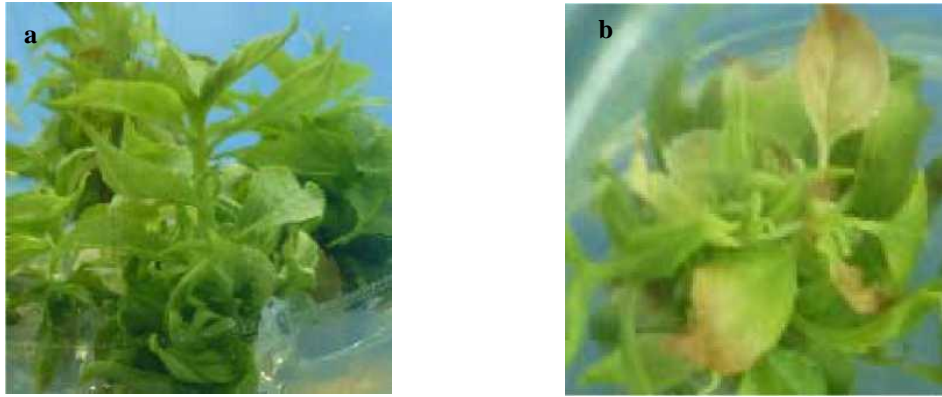
Zamana göre ortalama yaprak sayısı incelendiğinde S3 ortamının 10.42 adet/eksplant ortalama yaprak sayısı değeri ile en iyi sonuç veren ortam olduğu, bu ortamı azalan değerlerle S2, S9, S8, S6, S5, S7, S1 ve S4 (10.42 adet/eksplant) ortamlarının izlediği saptanmıştır. Sürgün gelişimine paralel olarak S2, S3, S5 ve S9 ortamlarında ortalama yaprak sayısı değerlerinin düzenli olarak arttığı belirlenmiştir. S1 ve S7

ortamlarında ortalama yaprak sayısı değerleri 20. güne kadar artmış, bugünden sonra sürgünlerin uçlarında meydana gelen kuruma veya tüm sürgünün ölmesi nedeniyle değerler giderek azalmıştır. S6 ortamında 40. güne kadar ortalama değerlerde artış olurken sonrasında mikro sürgünlerin uçlarındaki kurumalar sebebiyle değerlerde azalma görülmüştür. S8 ortamında 40. güne kadar ortalama değerlerde artış olmuş, daha sonraki günlerde sürgünler yaşamamıştır. S4 ortamının ortalama değerlerinde ise hiç artış gözlenmemiş, *in vitro* sürgünlerin ölmesine bağlı olarak ortalama değer sürekli azalmış ve 20. günde canlı sürgün kalmamıştır. En yüksek ortalama yaprak sayısı olan 13.80 adet/eksplant S8 ortamında 40. günde oluşurken, en düşük değer (3.87 adet/eksplant) ise S1 ortamında 60. günde elde edilmiştir. Ortamlar bazında en yüksek ortalama yaprak sayısı (17.73 adet/eksplant) S9 ortamında, en düşük ortalama yaprak sayısı (1.35 adet/eksplant) da S4 ortamında elde edilmiştir. Kardeşlenme durumunu incelemek için yapılan 60 günlük gözlem sonucunda sağlanan verilerin istatistiki değerlendirmesine göre ortalama kardeşlenme sayıları ortam x zaman interaksiyonuna göre farklılık göstermektedir ($P < 0.05$) ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemlidir. Elde edilen ortalama değerler Çizelge 3.12 'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. St. Julien A anacının besin ortamlarına göre ortalama kardeşlenme sayıları (adet/eksplant)

Ortam	Ortalama kardeşlenme sayısı (adet/eksplant)		
	20.gün	40.gün	60.gün
S 1	0.00 h	0.00 h	0.00 h
S 2	0.53 efgh	0.93 efgh	2.00 def
S 3	1.53 ab	1.47 bc	1.60 bc
S 4	0.00 h	0.00 h	0.00 h
S 5	0.13 gh	0.47 efgh	1.07 cde
S 6	0.40 efgh	1.00 cde	0.73 efg
S 7	0.00 h	0.27 fgh	0.20 gh
S 8	0.13 gh	0.20 gh	0.00 h
S 9	0.53 efgh	1.47 bcd	2.27 a

Bu anacın besin ortamlarına göre ortalama kardeşlenme sayıları değerlendirildiğinde, S3 ortamında en yüksek kardeşlenme miktarının (1.15 adet/eksplant) elde edildiği; S9, S2, S6, S5, S7, S8 ortamlarının azalan değerlerle bu ortamın ardından geldiği, S4 ve S1 ortamlarında ise hiç kardeşlenme olmadığı tespit edilmiştir. Ortalama kardeşlenme sayısı, sürgün boyu ve yaprak sayısı S2, S5 ve S9 ortamlarında düzenli olarak artmıştır. S3 ortamında kardeşlenme durumu 20. güne kadar artmış, 40. günde azalmış, 60. gün değerinde yeniden bir artış gözlenmiştir. S6, S7 ve S8 ortamlarında 40. güne kadar ortalama değerlerde artış olurken, sonrasında ortalama kardeşlenme sayılarında azalma görülmüştür. S8 ortamında 60. günde tüm sürgünler ölmüştür. S1 ve S4 ortamlarında kardeşlenme gerçekleşmediği için bu ortamlarda sürgün çoğalması sağlanamamıştır. En yüksek ortalama kardeşlenme sayısı, S9 ortamında 60. günde 2,27 adet/eksplant olurken, en düşük değer (0.20 adet/eksplant) S8 ve S7 ortamlarında 40. ve 60. günde elde edilmiştir. Tüm ortamlar açısından en büyük ortalama kardeşlenme sayısı deneme süresince düzenli bir artış gösteremeyen S3 ortamında 1.15 adet/eksplant olmuş ve bu ortamı 1.07 adet/eksplant değeri ile S9 ortamı takip etmiştir. Sürgün çoğaltma aşamasında farklı sonuçlar alınan ortamların sürgün çoğalması ve gelişmesine etkilerini anlamak için ortalama sürgün boyu, yaprak sayısı ve kardeşlenme sayısı değerlerine bakıldığında sırasıyla S9, S3 ve S2 ortamları en iyi sonuçları verirken; S4, S1 ve S7 ortamları ise en az başarı gösteren ortamlar olmuştur. Bu gelişme durumlarına Şekil 3.4 'te örnek görüntüler verilmiştir.



Sekil 3.4. St. Julien A anacının S9 (a) ve S4 (b) ortamlarında 5. hafta sonundaki gelişme durumu

3.2. Köklendirme Aşaması

Marianna GF 8/1, Myrobolan B ve St. Julien A klon anaçlarına ait mikro sürgünlerin köklendirilmesi amacıyla bitki büyüme düzenleyici içeriği farklı 8 MS (Murashige and Skoog) besin ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.13). Myrobolan 29-C anacında yeterli mikroçoğalma sağlanamadığı için bu anaç köklendirme aşamasına alınmamıştır. Ortalama değerlere göre hesaplanan ortalama köklenme oranları Çizelge 3.13 'te verilmiştir.

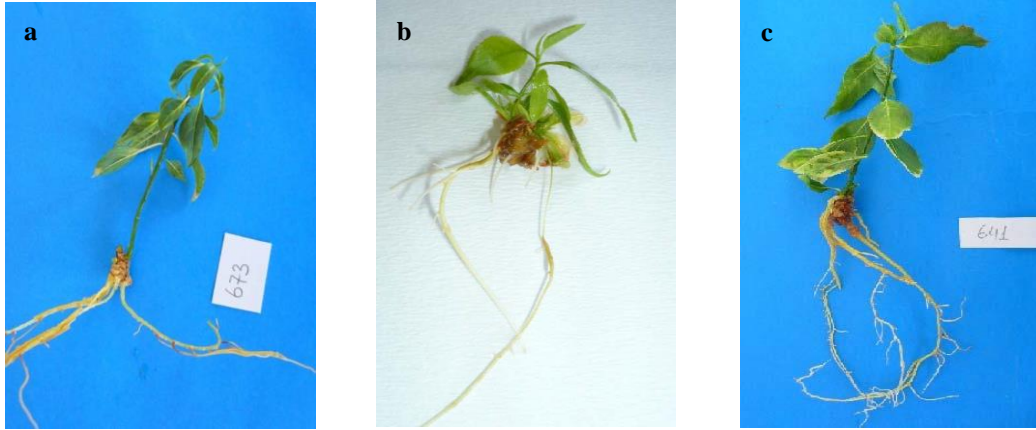
Çizelge 3.13. Besin ortamlarına göre anaçların ortalama köklenme oranları (%)

Ortam	Anaç			Ortalama
	Marianna GF 8/1	Myrobolan B	St. Julien A	
K 1	27	40	33	33.3 cd
K 2	47	60	53	53.3 abc
K 3	33	33	40	35.3 bcd
K 4	67	60	53	60.0 abc
K 5	27	27	27	27.0 d
K 6	40	53	53	48.6 bcd
K 7	73	73	73	73.0 a
K 8	73	67	67	69.0 ab

Köklenme oranları bakımından ortamlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunurken ($P < 0.05$), anaçlar arasındaki farklılık ve ortam x anaç etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Tüm anaçların ortalama köklenme değerleri esas alındığında K7 ortamında en yüksek köklenme oranı (% 73) elde edilmiştir. Bu ortamı K8 (% 67), K4 (% 60) ve K2 (% 53) ortamları izlemiştir. Çalışmada K5 ortamı ise en düşük köklenme oranına (% 27) sahip olmuştur. Bu oranı sırasıyla % 33, % 40 ve % 53 ile K1, K3 ve K6 ortamları takip etmiştir. Anaçların ortamlara göre ortalama köklenme oranları değerlendirildiğinde Marianna GF 8/1 ve Myrobolan B anaçlarının köklenme oranları % 27 ile % 73 değerleri arasında değişirken, St. Julien A anacının ise % 33 ile % 73 değerleri arasında değişmiştir. Her üç anaç da en yüksek köklenme oranına (% 73), K7 (1/2 MS + 2 mg L⁻¹ IBA) ortamında ulaşmıştır. Ayrıca Marianna GF 8/1 anacı K8 ortamında en yüksek köklenme oranı olan %73'e ulaşmıştır. K7 ortamından sonra köklenmede en başarılı ikinci ortam % 67 köklenme oranına sahip olan K8 (1/2 MS + 2 mg L⁻¹ NAA) ortamıdır.

Köklenme ortamlarına dikilen mikro sürgünlerde ilk kök oluşumları 5. günde görülmüştür. Köklenmeler sırasıyla 7., 10., 12. ve 15. günlerde meydana gelmiştir. En son köklenmeler 20. günde olmuştur. 20.

günden sonra köklenme meydana gelmemiş, köklenmeyen bitkiler ya kurumuş ya da aynı gelişme seyrini sürdürmüştür. Çalışmada K7 ortamında köklendirilen Marianna GF 8/1, Myrobolan B ve St. Julien A anaçlarının köklü bitkicikleri Şekil 3.5 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. K7 ortamında köklenen Marianna GF 8/1 (a), Myrobolan B (b) ve St. Julien A (c) anaçları

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, Marianna GF 8/1, Myrobolan B, Myrobolan 29-C ve St. Julien A klon anaçlarının doku kültürü ile optimum çoğaltma koşullarının belirlenmesi için sürgün ucu eksplantları, bitki büyüme düzenleyici içerikleri farklı olan 9 MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu besin ortamlarından sürgün çoğaltma aşamasında alınan sonuçlar farklı olmuştur. Marianna GF 8/1 anacında sürgün çoğaltması bakımından en başarılı ortamlar S2, S7, S9, S3 ve S8 olmuştur. Bu ortamları, S1 ortamı takip etmiştir. Başarısı daha düşük olan ortamlar ise S5, S4 ve S6 ortamları olmuştur. Myrobolan B anacı için en başarılı olan ortamlar S2, S5, S6 ve S9' dur. Buna karşılık S4, S3, S7 ve S8 ortamları ise en az başarı gösteren ortamlardır. St. Julien A anacı için ortalama sürgün boyu ve yaprak sayısı değerlerine bakıldığında sırasıyla S9, S3 ve S2 ortamları en iyi sonuçları verirken; S4, S1 ve S7 ortamları ise en az başarı sağlayanlar olmuştur. Kardeşlenme değerlerini incelediğimizde S3, S9 ve S2 ortamlarında en fazla; S4, S1, S8 ve S7 ortamlarında ise en az miktarda kardeşlenme olduğu görülmektedir. S4 ve S1 ortamlarında kardeşlenme olmaması bu iki ortamda St. Julien A anacının çoğalmadığını göstermektedir. S3 ortamında ise en yüksek çoğalma miktarı (1,15 adet/eksplant) ortaya çıkmıştır. Bu durum, anaç için başarılı olan ortamlarda düzenli bir sürgün çoğaltması meydana geldiğini ifade etmektedir. St. Julien A anacı için denenen ortamlardan S9, S3, S2 ve S5 ortamlarında başarılı sürgün çoğaltması gerçekleşmiş; S4, S1, S7 ve S8 ortamlarında ise başarılı bir çoğalma sağlanamamıştır. Myrobolan 29-C anacının sürgün boyu, yaprak sayısı ve kardeşlenme durumu S5 ortamında deneme boyunca artış göstermiştir. S1 ortamında ise sürgün gelişmesinin gerilediği göze çarpmıştır. Buna göre Myrobolan 29-C anacı için S5 ortamı, S1 ortamından daha iyi sonuç vermiştir.

S1 (1 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ NAA) ortamı, Marianna GF 8/1 ve Myrobolan B anaçlarının sürgün çoğaltmasında iyi sonuç verirken, St. Julien A ve Myrobolan 29-C anaçlarında çok az sürgün verimi sağlamıştır. S1 ortamının iyi sonuç verdiğini destekleyen Sauer (1985) tarafından kiraz anacı Mazzard üzerinde yapılan bir araştırmada da genç sürgünlerin tepe tomurcuklarına ait meristemler 2 mg L⁻¹ BAP ve 0,1 mg L⁻¹ NAA içeren MS besin ortamında kültüre alınmış ve yan sürgünlerin gelişmesi sağlanmıştır. Heimanns Rubinweichsel vişne çeşidinde Özzambak ve Hepaksoy (1997a) tarafından yapılan bir *in vitro* sürgün çoğaltma çalışmasında da benzer bir sonuç alınmış olup, 0,5 mg L⁻¹ BAP ve 0.1 mg L⁻¹ NAA eklenmiş MS besin ortamında en fazla sürgün çoğaltması sağlanmıştır. Bu çalışmada 1.0 – 1.5 mg L⁻¹ BAP ilave edilen MS ortamının ideal alt kültür ortamı olduğu belirlenmiştir. BAP yerine aynı miktarda IAA, IBA ve NAA uygulandığında da benzer sonuçlar alınmıştır. *Prunus persica* ile *Prunus amygdalus* melezi olan ve şeftali'ye anaç olarak kullanılan PR 204/84 klon anacı üzerinde yapılan bir çalışma da çalışmamızı desteklemektedir. Fotopolous ve Sotiropolous, (2005) tarafından yapılan bu çalışmada, en fazla sürgün uzaması, 8.0 µM BAP + 5.0 µM NAA ve 4.0 µM BAP + 5.0 µM IBA içeren ortamlarda gerçekleşmiştir. S2 (1 mg L⁻¹ BAP + 0.1mg L⁻¹ NAA + 0.1 mg L⁻¹ GA3) ve S3 (1 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg

L⁻¹ IAA + 0.1 mg L⁻¹ GA3) ortamları, sitokinin (BAP), oksin (NAA ve IAA) ve gibberellin (GA3) grubu olmak üzere tüm gruplardan bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlardır. Çalışmamızda, farklı oksin kullanımının çoğalmayı nasıl etkilediğini incelemek için S2 ortamından farklı olarak içeriğinde IAA bulunan S3 ortamı denenmiştir. Alınan sonuçlara göre S2 ve S3 ortamları Marianna GF 8/1, ve St. Julien A anaçlarında en iyi sürgün çoğalmasını sağlayan ortamlar arasında yer almış, Myrobolan B anacı ise sadece S2 ortamında iyi çoğalmıştır. Marianna GF 8/1 ve Myrobolan B anaçları NAA varlığında yani S2 ortamında daha iyi sonuç vermiştir. Benzer şekilde Ruzic ve ark. (1998) S2 ortamıyla aynı bitki büyüme düzenleyici içeriğinde olan MS ortamında, kiraz anaçlarının en iyi çoğalmayı sağladığını vurgulamışlardır. Yine S2 ortamının iyi sonuç verdiğini ortaya koyan Ruzic ve ark. (2000) tarafından Gisela 5 anacında yapılan bir başka denemede, MS makro elementleri sırasıyla iki katı kuvvetinde, 1/2 ve 1/4 kuvvetinde alınarak, 4.4 µM BA + 0.5 µM NAA + 0.3 µM GA3 ilave edilmiş ve pH 5.78'e ayarlanmıştır. Bu ortamların sürgün çoğalması ve büyümesi üzerine etkisi incelendiğinde makro elementlerin iki katı kuvvette kullanıldığı ortamda en iyi çoğalma ve büyümenin gerçekleştiği saptanmıştır.

Çalışmamıza paralel olarak Arıcı (2008)'nin sert çekirdekli meyve türleri için kullanılan Maxma-14 ve GN anaçlarının sürgün ucu ve yan sürgünleri ile çoğaltma olanaklarını araştırdığı çalışmada, Maxma-14 anacı için 2.0 mg L⁻¹ BAP + 0.2 mg L⁻¹ NAA + 0.5 mg L⁻¹ GA3, GN anacı için 1.0 mg L⁻¹ BAP + 0.02 mg L⁻¹ NAA + 0.5 mg L⁻¹ GA3 içeren ortamlarda başarılı sürgün çoğalmasının olduğu bildirilmiştir. S4 (2 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ IBA + 0.25 mg L⁻¹ GA3) ve S5 (1 mg L⁻¹ BAP + 0.5 mg L⁻¹ IBA + 0.25 mg L⁻¹ GA3) ortamları da üç ana gruptan bitki büyüme düzenleyicileri içermektedir; ancak, S2 ve S3 ortamlarından farklı olarak bunlar IBA içermektedir. Yaptığımız denemede Marianna GF 8/1 anacının S4 ve S5 ortamlarında, Myrobolan B ve St. Julien A anaçlarının ise S4 ortamında iyi çoğalma sağlayamadığı ve camsılaşıma oluşumuna eğilimli hale geldiği görülmüştür. S4 ortamında BAP seviyesinin yüksek (2 mg L⁻¹) olması bu anaçların sürgün gelişimini olumsuz etkilemiştir. Bu bulguya paralel olarak Gürel ve Gülşen (1998) adlı araştırmacıların yaptığı çalışmada da yüksek BAP (2 veya 3 mg L⁻¹) konsantrasyonunun, sürgünlerde camsılaşıma ve canlılık azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık Myrobolan B, St. Julien A ve Myrobolan 29- C anaçları S5 ortamında başarılı olarak çoğaltılmıştır. Bu iki anacın 1 mg L⁻¹ BAP uygulandığında daha iyi sürgün oluşturduğu ve çoğaldığı belirlenmiştir. Hepaksoy ve Tanrısever (2004) de Gisela 5 ve Gisela 5 anaçlarında denedikleri S5 ortamı ile içerikli MS ortamında başarılı sürgün çoğalmasının sağlandığını ifade etmişlerdir. S6 ve S7 ortamlarında ise sürgün çoğalmasında PG'nin etkisi araştırılmıştır. S7 (4.4 µM BAP + 0.49 µM IBA + 0.29 µM GA3 + 1 mM PG) ortamı PG (Floroglisinol) içermektedir. S7 ortamında Marianna GF 8/1 anacının iyi sürgün gelişimi sağladığı görülmüştür. Myrobolan B ve St. Julien A anaçları ise S7 ortamında iyi çoğalma sağlayamamıştır. Bunun yanında S7 ortamı ile aynı bitki büyüme düzenleyici içeriğine sahip olan ve PG içermeyen S5 (4.4 µM BAP + 0.49 µM IBA + 0.29 µM GA3) ortamında ise Myrobolan B ve St. Julien A anaçları iyi çoğalma sağlarken, Marianna GF 8/1'de daha düşük miktarda sürgün çoğalması sağlamıştır. Eksplant dokusunun besin ortamına salgıladığı fenolik maddeler, ortamda kararmaya neden olup eksplant gelişimini engellemektedir. Pontikis ve Melas (1986), fenolik maddelerin bu etkisini azaltmak veya ortadan kaldırmak için besin ortamına floroglisinol eklenmesini tavsiye etmektedir. Çalışmamızda PG uygulaması, bazı anaçlarda sürgün çoğalmasını artırırken bazılarında azaltmıştır. PG uygulamasını destekleyen bir çalışmada, F 12/1 (*Prunus avium*) ve Colt (*P. avium x P. pseudocerasus*) kiraz anaçlarında sürgün ucu yöntemi ile çalışan Hammatt ve Grant (1993), besin ortamının 2.2 µM BA ve 1.0 µM floroglisinol (PG) içermesi, 5.5 veya 6.5 g L⁻¹ agar ilave edilmesi ve pH'sının 5.0 olması durumunda sürgün çoğalmasının arttığını tespit etmişlerdir. S6 ortamıyla aynı bitki büyüme düzenleyicileri içeren bir ortamın kullanıldığı başka çalışmada da Espinosa ve ark. (2006) tarafından Kara Kiraz (*Prunus serotina*) üzerinde sürgün çoğaltma denemesi yapılmıştır. MS besin ortamına 4.44 µM BA, 0.49 µM IBA ve 0.29 µM GA3 ilave edilerek boğumların kültüre alındığı çalışmada sürgün proliferasyonu sağlandığı bildirilmiştir.

S8 (1 mg L⁻¹ BAP pH 5.6) ve S9 (1 mg L⁻¹ BAP pH 6.2) ortamları içerikleri aynı sadece pH dereceleri birbirinden farklı iki ortamdır. Farklı pH derecelerinin sürgün çoğalmasına etkisini araştırmak amacıyla S9 ortamına alternatif olarak S8 ortamı denenmiştir. Bu iki ortam karşılaştırıldığında pH'nın yüksek olması (S9) durumunda çoğalmada artışın sağlandığı gözlenmiştir. Marianna GF 8/1, Myrobolan B ve St. Julien A anaçlarında yüksek pH derecesi sürgün çoğalmasını arttırmıştır. S8 ortamında ise Marianna GF 8/1 anacı için orta düzeyde sürgün çoğalması elde edilirken; Myrobolan B ve St. Julien A anaçları için az miktarda sürgün çoğalması gerçekleşmiştir. Denememizdeki S8 ortamına benzer olarak Gürel ve Gülşen (1998) tarafından Texas ve Nonpareil badem (*Amygdalus communis* L.) çeşitleri üzerinde yapılan

sürgün ucu çalışmasında farklı sakkaroz, agar ve pH düzeylerinin sürgün çoğalması ve gelişmesine etkisi incelenmiştir. İlk dikim aşamasında sakkaroz dozu % 5-6 ve pH ayarı 5.5 olduğunda çoğalma sağlanmış ve en iyi sürgün gelişimi olmuştur. Alt kültüre alma aşamasında yine % 5-6 sakkaroz miktarı ile pH düzeyi 5.5 olan ortamlarda sürgün gelişmesinin en iyi olduğu görülmüştür. Damil, Edabriz, Gisela 5 ve MaxMa kiraz anaçları üzerinde S9 ortamını destekleyen bir çalışma yapılmıştır. Besin ortamına eklenen değişik katılaştırıcı maddelerin ve farklı pH düzeylerinin sürgün çoğalmasına, sürgün uzunluk ve ağırlığına etkilerinin incelendiği bu çalışmada en uygun pH düzeyinin 6.2 ve en iyi sonucu veren katılaştırıcı maddenin agar olduğu belirlenmiştir (Aka-Kaçar ve ark., 2001). Sürgün çoğaltma aşamasında yapılan istatistiki değerlendirmeye göre anaçların denenen besin ortamlarındaki kardeşlenme miktarlarının az olduğu görülmektedir. Deneme sırasında bazı mikro sürgünlerin uç kısımlarında kurumaların meydana gelmesi ve bazı sürgünlerin de tamamen ölmesi nedeniyle 60 gün sonunda hiç canlı sürgünün kalmadığı ortamlarda kardeşlenme miktarları düşük olmuştur. Bu durum dikkate alındığında, istatistiksel analizlere göre farklı ortamlar başarılı olarak ön plana çıkmış olsa da deneme süresince yapılan gözlemlere göre genel olarak tüm anaçlar için en iyi sürgün çoğalmasının gerçekleştiği ortam $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ BAP} + 0.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA} + 0.25 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA3}$ bitki büyüme düzenleyici içeriğine sahip olan S5 ortamıdır.

Çalışmanın köklendirme aşamasında da besin ortamlarından farklı sonuçlar alınmıştır. Bunların içinde en başarılı olan ortam oksin olarak $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ içeren ve 1/2 kuvvette MS uygulanan K7 ortamı olmuştur. Denemede ikinci başarılı olan ortam ise yine yarı kuvvette MS besin ortamına IBA yerine aynı miktarda NAA ilave edilen K8 ortamıdır. Al-Sabbagh ve ark. (1999) tarafından yapılan benzer çalışmada da IBA veya NAA içeren ortamlarda başarılı köklenmenin gerçekleştiği doğrulanmaktadır. Bu araştırmacılar katı ve sıvı MS ortamına $0.49 \text{ } \mu\text{M}$ NAA veya $0.49\text{-}2.45 \text{ } \mu\text{M}$ IBA ilavesiyle 4 hafta sonunda köklenmenin gerçekleştiğini bildirmiştir. Epstein ve ark. (1993) ise farklı köklenme özelliği gösteren kiraz çeşitleri üzerinde yaptıkları bir araştırmada aseptik koşullarda IBA'nın taşınımı ve metabolizmasını incelemişlerdir. Çalışmalarında oksine en iyi yanıtın alındığı 2., 3., 4. ve 5. günleri köklenme periyodu olarak tanımlamış ve kolay köklenen çeşitlerin sürgünlerini köklenme ortamına aldıktan 7 gün sonra ilk kök oluşumunun görüldüğünü bildirmişlerdir. Paul ve Feucht (1985) tarafından Hedelfinger ve Sam kiraz çeşitleri üzerinde yapılan köklendirme denemesinde de agarla katılaştırılmış modifiye MS ortamı kullanılarak IBA, NAA ve IAA'nın köklenme üzerine etkisi incelenmiştir. Bizim bulgularımıza benzer olarak köklenme üzerinde etkili oksinin IBA olduğu saptanmıştır. Zor köklendiği bilinen bu iki kiraz çeşidi üzerinde yapılan çalışmada ortalama %90 oranında köklenme sağlanmıştır. Sam çeşidi tüm IBA konsantrasyonlarında ($0.5, 0.75$ ve 1.0 mg L^{-1}) yüksek oranda köklenirken, Hedelfinger çeşidinde $1.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ ile en yüksek köklenme oranı elde edilmiştir. Snir (1982)'in kirazda yaptığı köklendirme çalışmasında da *in vitro* sürgünlerin, $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$, %2 sakkaroz ve %0.7 agar içeren, pH'sı 5.3 olan 1/2 oranında seyreltilmiş MS ortamında en fazla köklendikleri tespit edilmiştir. Pevalek-Kozlina ve Jelaska (1987) tarafından yabancı kiraz anacında yapılan çalışmada ise *in vitro* sürgünlerden $4.9 \text{ } \mu\text{M}$ IBA içeren besin ortamında, yan sürgünlerden ise $2.46 \text{ } \mu\text{M}$ IBA çözeltilisine batırıldıktan sonra en iyi köklenmenin oluştuğu ifade edilmiştir. Bu araştırmacıların denediği ortam bizim denememizde %45 oranında kök oluşumu sağlamıştır. Özzambak ve Schmidt (1991) adlı araştırmacılar da kirazda yaptıkları çalışmada Early Burlat ve Viola çeşitleri ile F 12/1 ve 209/1 anaçlarının *in vitro* sürgünlerinin $1,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ içeren 1/2 kuvvette MS ortamında iyi köklendiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda en iyi sonucu veren K5 ortamı bu ortamdan farklı olarak $1.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ yerine $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ IBA}$ içermektedir. Özzambak ve Hepaksoy (1997b) tarafından yapılan çalışmada ise kiraz sürgünleri 5.5, 11.0, 16.5 ve $22.0 \text{ } \mu\text{M}$ IAA, IBA ve NAA eklenen 1/2 MS besin ortamında köklendirilmiştir. Çalışma sonunda belirtilen miktarlardaki bitki büyüme düzenleyicilerin kullanımıyla iyi köklenme sağlandığı, ancak; bizim denememizden farklı olarak kök rengi, şekli, kalınlığı ve kallus oluşum oranının IAA varlığında diğerlerine göre daha iyi sonuç verdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ içeren K8 ortamında %69 oranında kök oluşumu sağlanmıştır. Demiral ve Ülger (2008) tarafından Gisela 5 kiraz anacı üzerinde yapılan benzer bir köklendirme çalışmasında MS ortamına 0, 1, 2, 4 ve $6 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ ilave edilmiş ve en iyi köklenme %92.88 oranı ile $6 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ uygulamasından elde edilmiştir.

Denememizde standart içeriğinde 0.1 mg L^{-1} Thiamin bulunan MS besin ortamına ilave olarak 1.4 mg L^{-1} daha Thiamin eklenmiş K2 ortamı tüm anaçlar için K1 ortamından daha başarılı sonuç vererek %53.3 köklenme oranına ulaşmıştır. K1 ortamında ise köklenme oranı %33.3 olmuştur. Besin ortamına Thiamin eklenmesi mikro sürgünlerin köklenmesini olumlu etkilemektedir. Bizim denememizdeki K2 ortamına benzer bir ortam içeriği deneyen Kamali ve ark. (2006) LS ortamına $0.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ NAA}$ ve 1.6 mg L^{-1} Thiamin eklendiğinde GF 677 ve farklı badem anaçlarının %80 oranında kök meydana getirdiğini

bildirmektedir. Çalışmamızda 0.3 mg L⁻¹ Thiamin ilave edilen K1 ortamında (%33.3) daha az oranda köklü bitkicik elde edilmiştir. Esmenjaud ve ark. (1993) tarafından Myrobolan erikleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise K1 ortamına benzer içerikli bir ortamda Thiamin miktarının köklenmeye etkisi araştırılmıştır. Bizim bulgularımızdan farklı bir sonuca ulaşan bu araştırmacılar denemede ilk olarak 0.4 mg L⁻¹ Thiamin ve 0.5 mg L⁻¹ IBA ilave edilen, ikinci olarak da sadece 0.4 mg L⁻¹ Thiamin eklenen MS ortamlarında başarılı kök oluşumunun sağlandığını bildirmişlerdir. K6 ortamından farklı olarak 283.72 mg L⁻¹ PG içeren K4 ortamı kök oluşumunda daha iyi sonuç vermiştir. Ortama PG (Floriglisinol) ilave edilmesi köklenme oranını arttırmaktadır. Ne Plus Ultra ve Nonpareil badem (*Prunus dulcis* Mill.) çeşitlerinin köklenme durumunun araştırıldığı bir deneme de bu bulguyu desteklemektedir. Mikro sürgünlerde kök oluşumu için uygun oksinin belirlenmesi amacıyla inkübasyon safhasında IBA ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarının uygulandığı çalışmada ayrıca köklenme üzerinde PG etkisi de araştırılmıştır. En başarılı köklenme 1,0 mM IBA ilaveli %0.6 agar içeren MS besin ortamında 12 saat inkübe edildikten sonra iki hafta 100.0 mM PG içeren oksinsiz ortamda tutulan kültürlerde sağlanmıştır (Ainsley ve ark., 2001).

Çalışmamızda ortamlar bakımından ortalama köklenme oranları %33.3 ile %73 arasında değişmiştir. En fazla köklenme %73 ile K7 ortamında olurken, bu ortamı K8 (%69), K4 (%60), K2 (%53.3), K6 (%48.6), K3 (%35.3), K1 (%33.3) ortamları izlemiş ve en az köklenme ise %27 ile K5 ortamında elde edilmiştir. Anaç bazında en yüksek köklenme oranı olan %73, K 7 ve K8 ortamlarında Marianna GF 8/1 ile K7 ortamında Myrobolan B ve St. Julien A anaçlarında görülürken, en düşük köklenme oranı %27 ise K1 ve K5 ortamlarında Marianna GF 8/1 ile K5 ortamında Myrobolan B ve St. Julien A anaçlarına ait olmuştur. Anaçların ortamlara göre en iyi köklenme oranları incelendiğinde Marianna GF 8/1 anaç K 7 ve K 8 ortamlarında %73 oranında, Myrobolan B anaç K 7 ortamında %73 oranında, St. Julien A anaç K 7 ortamında %73 oranında köklenme sağlamıştır. Denememizin sonunda elde edilen *in vitro* bitkicikler viyollere aktarılmıştır. Viyoller, sulama işleminin ardından üzerleri naylon örtü ile kapatılarak iklim odasına konulmuştur. İklim odasında sadece sıcaklık kontrolü yapılmıştır. Deneme mikroçoğaltımın son aşaması olan dış koşullara alıştırma safhasına kadar getirilmiş ve burada sonlandırılmıştır.

Bilgilendirme

Bu çalışma Mine Akşehirli Pakyürek'in doktora tezinden üretilmiş olup, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 07-ZRF-002 nolu proje ile desteklenmiştir.

References

- Ainsley, P.J., Collins, G.G. & Sedgley, M. (2001). *In vitro* rooting of Almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 37, 778-785.
- Aka-Kaçar, Y., Yılmaz, N., Yalçın-Mendi, Y., Küden, A. & Çetiner, S. (2001). *In vitro* besi ortamında kullanılan değişik katılaştırıcı maddelerin ve farklı pH düzeylerinin bazı kiraz (*Prunus avium* L.) anaçlarının çoğaltılması üzerine etkileri. I. Sert Çekirdekli Meyveler Sempozyumu. 25-28 Eylül 2001, Yalova, 161-166.
- Anonim (1969) Research and training centers for the production, processing and marketing of fruit and vegetables. Turkey. UNDP/ FAO Technical Report 1, Rome. 150 p.
- Anonim (2008b). <http://www.cevizfidan.com/seftali.htm> (Erişim Tarihi: 2 Nisan 2009)
- Anonim (2008c). <http://www.bahcesel.com/content/view/914/3188>. (Erişim Tarihi: 5 Nisan 2009)
- Arıcı, Ş. E. (2008). Bazı Sert Çekirdekli Meyve Anaçlarının Doku Kültürü ile Çoğaltılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(1), 19-23.
- Büyükyılmaz, M. & Öz, F. (1994). Yaprğını dökken meyve türlerinde kullanılan anaçlar. Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, Yayın No: 70.

- Debergh, P.C. & Read, P. E. (1993). Micropropagation. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds), Micropropagation-Technology and Application. pp. 1-15, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Hollanda.
- Demiral, S. & Ülger, S. (2008). Gisela 5 Kiraz Anacının Doku Kültürü ile Çoğaltılması Üzerine Bir Araştırma. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 21(1), 117-121.
- Ertürk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor, M., Ozdemir, F. & Turkan, I. (2007). Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*. *Biologia Plantarum*. 51 (3), 597-600.
- Esmenjaud, D., Minot, J.C., Voisin, R., Salesses, G., Poupet, R. and Onesto, J.P. (1993). Assessment of a method using plantlets grown previously *in vitro* for studying resistance of *Prunus cerasifera* Ehr. (Myroblan Plum) to Meloidogyne spp. *Nematropica*, 23(1), 41-48.
- Espinosa, A.C., Pijut, P.M., & Michler, C.H. (2006). Adventitious shoot regeneration of *Prunus serotina* *in vitro* cultures. *Hortscience*, 41(1), 193-201.
- Fotopolous, S. & Sotiropoulos, T.E. (2005). *In vitro* rooting of PR 204/84 (*Prunus persica* x *P. Amygdalus*) rootstock: axillary shoot production and rhizogenesis. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science*, 33, 75-79.
- George, E.F., Hall, M.A. & De Klerk G.J. (2008). Plant Propagation By Tissue Culture 3rd Edition, Volume1. The Background, Chapter 1, p: 1-28, Springer.
- Gürel, S. & Gülşen Y. (1998). The Effects of Different Sucrose, Agar and pH Levels on *In Vitro* Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis* L.). *Turkish Journal of Botany*, 22, 363-373.
- Hammatt, N. & Grant, N.J. (1997). Micropropagation of mature British wild cherry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 103-110.
- Hartmann, H.T. & Kester, D.E. (1983). Plant propagation principles and practices. 3 rd Ed. Printice Hall, Inc. London, 727 p.
- Hepaksoy, S. (2004). Bazı kiraz anaçlarının mikroçoğaltımı üzerinde araştırmaları. Gelişme ve Çoğalma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41(3), 11-22.
- Hepaksoy, S. & Tanrısever, A. (2004). Bazı kiraz anaçlarının mikroçoğaltımı üzerinde araştırmalar II. Köklenme ve dış koşullara alıştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41(3), 23-34.
- Kamali, K., Majidi, E., & Zarghami, R. (2001). Micropropagation of GF-677 rootstocks (*Prunus amygdalus* x *P. persica*). *Chaiers Options Mediterraneennes*. 175-177.
- Kamali, K., Majidi, E., Zarghami, R. & Arvin, M.J. (2006). Differences in micropropagation of vegetative rootstock (GF 677) and other almond seed genotypes. *ISHS Acta Hort*. 726.
- Karvar, S. & Gülşen, Y. (1990). Bademin (*Prunus amygdalus* Batsch.) *in vitro* vejetatif çoğaltımında besin ortamı içeriğinin sürgün verimine etkileri. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Ankara.
- Mansuroglu, S. & Gürel, E. (2001). Mikroçoğaltım. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (edt.) 374 sayfa, 262-281.
- Morini, S., and Perrone, S. (2006). Effects of short light dark regimes on *in vitro* shoot rooting of some fruit tree rootstocks. *Biologia Plantarum*. 50(3), 429-432.

- Muna, A.S., Ahmad, A.K., Mahmoud, K. & Abdul-Rahman, K. (1999). *In vitro* propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock. *Plant Cell and Tissue and Organ Culture*, 59, 203-208.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nguyen, Q.T. & Kozai, T. (1998). Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Envir. Cont. in Biol.* 36(2), 59-75.
- Özzambak, E., & Hepaksoy, S. (1997a). Investigations on *in vitro* proliferation of sour cherry cv. Heimanns Rubinweichsel. *Acta Horticulturae*. 447: 155-156.
- Özzambak, E & Hepaksoy, S. (1997b). Investigations on *in vitro* rooting and acclimatization of sour cherry cv. Heimanns Rubinweichsel. *Acta Horticulturae*. 447, 153-154.
- Özzambak, E. & Schmidt, H., 1991. *In vitro* and *in vivo* micrografting of cherry (*Prunus avium* L.) *Gartenbauwissenschaft*. 56(5), 221-223.
- Paul, L. & Feucht, W. (1985). Rooting sweet and sour cherry cultivar and clones *in vitro*. *Hort. Abst.* 55(9), 679.
- Pevalek-Kozlina, B. & Jelaska, S. (1987). Microclonal propagation of *Prunus Avium* L. symposium on *in vitro* problems related to mass propagation of horticultural plants. *ISHS Acta Hort.* 212, 599-602.
- Pontikis, C.A. & Melas, P. (1986). Micropropagation of *Ficus carica* L. *Hort Science*, 21(1), 153.
- Pospisilova, J., Ticha, I., Kadlec, P., Haisel, D. & Plzakova, S. (1999). Acclimatization of micro-propagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42(4), 481-497.
- Ruzic, D., Cerovic, R. & Ystaas, J. (1998). Influence of agar brands and concentration on *in vitro* shoot multiplication of the cherry rootstock Gisela 5. *Acta Hort.* 468, 209-216.
- Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R. & 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, 9-14.
- Sauer, A. (1985). *In vitro* propagation of *Prunus avium* L. and storage of *in vitro* derived plantlets. *Acta Horticulture*, 169, 351.
- Snir, I. (1982). *In vitro* propagation of sweet cherry cultivars. *Hort Science*, 17, 192-193.
- Solarova, J. & Pospisilova, J. (1997). Effect of carbon dioxide enrichment during *in vitro* cultivation and acclimatization to *ex vitro* condition. *Biologia Plantarum*. 39(1), 23-30.
- Tang, H.R., Ren, Z.L., Renstle, G. & Krczal, G. (2002). Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. *Sci. Horticulture*, 93, 235-44.