

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİRAZIN (*Prunus avium* L.) *in vitro* MİKROÇOĞALTIMI

Zafer AKTÜRK

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

Aralık - 2009

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Zafer AKTÜRK tarafından yapılan "Kirazın (*Prunus avium* L.) *in vitro* Mikroçoğaltımı" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ahmet ONAY

Üye : Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEL

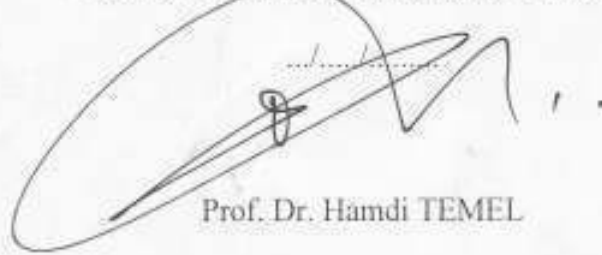
Üye : Prof. Dr. Bekir Erol AK

Üye : Doç. Dr. Mehmet Nuri NAS

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hakan YILDIRIM

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 25/12/2009

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.



Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doku kültürü çalışmalarına başlamamı sağlayan ve tezimin her aşamasında değerli fikirleriyle yön veren danışman hocam sayın Prof. Dr. Ahmet ONAY'a teşekkür ederim. Bölümlerinde doktora yapmama imkan sağlayan ve derslerini almaktan onur duyduğum Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalındaki değerli hocalarıma ve özellikle, varlığıyla güven veren sayın hocam Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN'e ve doktora başlarken sunduğu katkıyı unutamayacağım sayın hocam Prof. Dr. Davut BAŞARAN'a teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Çalışmalarımı yürüttüğüm Ziraat Fakültesi Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarının kurulmasını sağlayan ve her sıkıştığım da imdadıma koşan, manevi desteğiyle de daima moral veren değerli hocam ve kıymetli ağabeyim Yrd. Doç. Dr. Vedat PİRİNÇ'e teşekkür ederim.

On yıldan uzun sürelik birlikteliğimizde her konuda yardımlarını esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarında tecrübelerini benimle paylaşan değerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Hakan YILDIRIM'a teşekkür ederim. Verilerimin analizlerinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Ahmet BAYRAM'a ve daima manevi desteğini hissettiğim Doç. Dr. Cuma AKINCI'ya teşekkürü borç bilirim.

Çeşitli vesileler ile mutlaka fayda gördüğüm ve teşekkürü bir vazife olarak bildiğim, başta Bahçe Bitkileri Bölümü olmak üzere Ziraat Fakültesinin bütün değerli personeline ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen kıymetli öğrencilerimize şükranlarımı sunarım.

Doktora çalışmalarımın ağırlığını ve sıkıntılarını benimle birlikte omuzlayan, daima manevi desteklerini gördüğüm sevgili eşim Müberra AKTÜRK'e ve güzel kızım Zeynep İkbâl AKTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Zafer AKTÜRK

Aralık 2009 - Diyarbakır

Bu araştırma; **TÜBİTAK** tarafından TOVAG-3355 kodlu ve **Dicle Üniversitesi Araştırma Proje Koordinatörlüğü** tarafından DÜAPK-02-ZF-65 kodlu projelerle desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| TEŞEKKÜR..... | I |
| DESTEKLER..... | II |
| İÇİNDEKİLER..... | III |
| ÖZET..... | IX |
| ABSTRACT..... | X |
| ÇİZELGE LİSTESİ..... | XI |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | XIV |
| KISALTMA VE SİMGELER..... | XV |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ..... | 3 |
| 2.1. Kiraz Hakkında Genel Bilgiler..... | 3 |
| 2.1.1. Sistematığı, Anavatanı ve Kültür Tarihi..... | 3 |
| 2.1.2. Morfolojik Özellikleri..... | 3 |
| 2.1.3. Biyolojik Özellikleri..... | 4 |
| 2.1.4. Çoğaltma Yöntemleri..... | 5 |
| 2.1.5. Kirazın Pomolojik Özellikleri ve Bazı Önemli Kiraz Çeşitleri..... | 6 |
| 2.1.6. Ekonomik Önemi..... | 7 |
| 2.1.7. Beslenmedeki Önemi..... | 8 |
| 2.2. <i>Prunus</i> Türlerinde <i>in vitro</i> Çoğaltım Çalışmaları..... | 10 |
| 3. MATERYAL ve METOT..... | 57 |
| 3.1. Genel Doku Kültürü Teknikleri..... | 57 |
| 3.1.1. Alet ve Malzemelerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu..... | 58 |
| 3.1.1.1. Kültür Kaplarının Temizlenmesi ve Sterilizasyonu..... | 58 |
| 3.1.1.2. Pens, Bisturi ve Kağıt Malzemelerin Sterilizasyonu..... | 59 |
| 3.1.1.3. Transfer Odasının Temizlenmesi..... | 59 |
| 3.1.2. Besi Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu..... | 59 |

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 3.1.2.1. Besi Ortamı Stok Çözeltilerinin Hazırlanması..... | 59 |
| 3.1.2.2. Büyüme Düzenleyici Stok Çözeltilerinin Hazırlanması..... | 61 |
| 3.1.2.3. Besi Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu..... | 61 |
| 3.1.3. Kültür Şartları..... | 62 |
| 3.2. Mikroçoğaltım Çalışmaları..... | 63 |
| 3.2.1. Yüze Sterilizasyonu Çalışmaları..... | 63 |
| 3.2.1.1. Tomurcukların Yüze Sterilizasyonu..... | 64 |
| - Tomurcukların Yüze Sterilizasyonuna NaOCl Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 64 |
| - Tomurcukların Yüze Sterilizasyonuna %15'lik NaOCl'nin Uygulama Sürelerinin Etkisi..... | 65 |
| - Tomurcukların Yüze Sterilizasyonuna Vejetasyon Döneminin Etkisi..... | 65 |
| - Tomurcukların Yüze Sterilizasyonuna Eksplant Hazırlama Yönteminin Etkisi | 65 |
| 3.2.1.2. Tohumların Yüze Sterilizasyonu..... | 65 |
| - Tohumların Yüze Sterilizasyonuna NaOCl Konsantrasyonlarının Etkisi.. | 66 |
| - Tohumların Yüze Sterilizasyonuna %15'lik NaOCl'nin Uygulama Sürelerinin Etkisi..... | 66 |
| 3.2.2. Kültür Başlatma Çalışmaları..... | 66 |
| 3.2.2.1. Tomurcuklardan Kültür Başlatma Çalışmaları..... | 68 |
| - Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına Sitokin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 68 |
| - Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına BAP ile Birlikte Kullanılan Oksin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 68 |
| - Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına TDZ ile Birlikte Kullanılan Oksin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 68 |
| - Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına BAP ile Birlikte Kullanılan GA ₃ 'ün Etkisi..... | 69 |
| - Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasında Başarılı Bulunan Büyüme Düzenleyicilerin Etkilerinin Tekrarlanabilirliği..... | 69 |
| - Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına Şeker Tip ve Karışımlarının Etkisi | 69 |
| - Kültür Başlatılmasına Tomurcukların Alındığı Dönemin Etkisi..... | 70 |
| - Kültür Başlatılmasına Tomurcukların Ağaçtaki Pozisyonunun Etkisi..... | 70 |

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 3.2.2.2. Tohumlardan Kültür Başlatma Çalışmaları..... | 70 |
| - Tohumların <i>in vitro</i> Çimlendirilmesine Eksplant Hazırlama Yönteminin Etkisi..... | 70 |
| - Tohumların <i>in vitro</i> Çimlendirilmesine Büyüme Düzenleyicilerinin Etkisi | 71 |
| - Tohumların <i>in vitro</i> Çimlendirilmesine BAP Konsantrasyonlarının Etkisi | 71 |
| - Tohumların <i>in vitro</i> Çimlendirilmesine Karanlıkta Bekletme Sürelerinin Etkisi..... | 71 |
| 3.2.3. Sürgün Çoğaltım Çalışmaları..... | 71 |
| 3.2.3.1. Sürgün Çoğaltımına Besi Ortamlarının Etkisi..... | 72 |
| 3.2.3.2. Sürgün Çoğaltımına Sitokin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 72 |
| 3.2.3.3. Sürgün Çoğaltımına BAP'ın Yüksek Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 73 |
| 3.2.3.4. Sürgün Çoğaltımına Sitokinler ile Birlikte Kullanılan GA ₃ 'ün Etkisi..... | 73 |
| 3.2.3.5. Sürgün Çoğaltımına Farklı BAP ve GA ₃ Kombinasyonlarının Etkisi..... | 73 |
| 3.2.3.6. Sürgün Çoğaltımına Floroglukinol'ün Etkisi..... | 73 |
| 3.2.3.7. Aksillar Sürgünlerin Gelişmesine BAP ve GA ₃ Kombinasyonlarının Etkisi | 73 |
| 3.2.3.8. Tohumdan Elde Edilen Sürgünlerin Çoğaltımına BAP Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 74 |
| 3.2.4. Köklendirme Çalışmaları..... | 74 |
| 3.2.4.1. Sürgün Köklenmesine IBA ve NAA Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 75 |
| 3.2.4.2. Sürgün Köklenmesine Karanlık Uygulamasının Etkisi..... | 75 |
| 3.2.5. Dış Ortama Alıştırma (Aklimatizasyon) Çalışmaları..... | 75 |
| 3.2.5.1. Dikim Ortamlarının Aklimatizasyona Etkisi..... | 76 |
| 3.2.5.2. Köklendirmede Kullanılan Oksinlerin Aklimatizasyona Etkisi..... | 76 |
| 3.2.5.3. Soğuk Uygulamasının Aklimatizasyona Etkisi..... | 76 |
| 3.2.6. Verilerin Değerlendirilmesi..... | 76 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... | 77 |
| 4.1. Yüzey Sterilizasyon Çalışmaları..... | 77 |
| 4.1.1. Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonu..... | 77 |
| 4.1.1.1. Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna NaOCl Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 77 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 4.1.1.2. | Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna %15'lik NaOCl'nin Uygulama Sürelerinin Etkisi..... | 79 |
| 4.1.1.3. | Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna Vejetasyon Döneminin Etkisi..... | 79 |
| 4.1.1.4. | Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna Eksplant Hazırlama Yönteminin Etkisi..... | 80 |
| 4.1.2. | Tohumların Yüzey Sterilizasyonu..... | 82 |
| 4.1.2.1. | Tohumların Yüzey Sterilizasyonuna NaOCl Konsantrasyonlarının Etkisi | 82 |
| 4.1.2.2. | Tohumların Yüzey Sterilizasyonuna %15'lik NaOCl'nin Uygulama Sürelerinin Etkisi..... | 83 |
| 4.1.3. | Sterilizasyon Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi ve Tartışma..... | 83 |
| 4.2. | Kültür Başlatma Çalışmaları..... | 89 |
| 4.2.1. | Tomurcuklardan Kültür Başlatma Çalışmaları..... | 89 |
| 4.2.1.1. | Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına Sitokin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 89 |
| | - Benzilaminopürin..... | 90 |
| | - Thidiazuron..... | 91 |
| | - Kinetin..... | 92 |
| 4.2.1.2. | Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına BAP ile Birlikte Kullanılan Oksin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 94 |
| | - İndol Asetik Asit..... | 94 |
| | - İndol Butirik Asit..... | 95 |
| | - Naftalen Asetik Asit..... | 95 |
| | - 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit..... | 96 |
| 4.2.1.3. | Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına TDZ ile Birlikte Kullanılan Oksin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 97 |
| | - İndol Asetik Asit..... | 97 |
| | - İndol Butirik Asit..... | 98 |
| | - Naftalen Asetik Asit..... | 99 |
| | - 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit..... | 100 |
| 4.2.1.4. | Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına BAP ile Birlikte Kullanılan GA ₃ 'ün Etkisi..... | 101 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 4.2.1.5. | Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasında Başarılı Bulunan Büyüme Düzenleyicilerin Etkilerinin Tekrarlanabilirliği..... | 101 |
| 4.2.1.6. | Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına Şeker Tip ve Karışımlarının Etkisi | 105 |
| 4.2.1.7. | Kültür Başlatılmasına Tomurcukların Alındığı Dönemin Etkisi..... | 107 |
| 4.2.1.8. | Kültür Başlatılmasına Tomurcukların Ağaçtaki Pozisyonunun Etkisi..... | 107 |
| 4.2.2. | Tohumlardan Kültür Başlatma Çalışmaları..... | 108 |
| 4.2.2.1. | Tohumların <i>in vitro</i> Çimlendirilmesine Eksplant Hazırlama Yönteminin Etkisi | 108 |
| 4.2.2.2. | Tohumların <i>in vitro</i> Çimlendirilmesine Büyüme Düzenleyicilerinin Etkisi | 109 |
| 4.2.2.3. | Tohumların <i>in vitro</i> Çimlendirilmesine BAP Konsantrasyonlarının Etkisi | 110 |
| 4.2.2.4. | Tohumların <i>in vitro</i> Çimlendirilmesine Karanlıkta Bekletme Sürelerinin Etkisi | 111 |
| 4.2.3. | Kültür Başlatma Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi ve Tartışma..... | 112 |
| 4.2.3.1. | Kültür Başlatma Materyali..... | 112 |
| 4.2.3.2. | Kültür Başlatma Dönemi..... | 113 |
| 4.2.3.3. | Eksplant Hazırlama Yöntemi..... | 115 |
| 4.2.3.4. | Besi Ortamı..... | 117 |
| 4.2.3.5. | Besi Ortamına Eklenen Büyüme Düzenleyiciler..... | 118 |
| 4.2.3.6. | Besi Ortamına Eklenen Şekerler..... | 122 |
| 4.2.3.7. | Tohumların <i>in vitro</i> Çimlendirilmesi..... | 124 |
| 4.3. | Sürgün Çoğaltım Çalışmaları..... | 125 |
| 4.3.1. | Sürgün Çoğaltımına Besi Ortamlarının Etkisi..... | 125 |
| 4.3.2. | Sürgün Çoğaltımına Sitokinin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 127 |
| 4.3.3. | Sürgün Çoğaltımına BAP'ın Yüksek Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 128 |
| 4.3.4. | Sürgün Çoğaltımına Sitokininler ile Birlikte Kullanılan GA ₃ 'ün Etkisi..... | 129 |
| 4.3.5. | Sürgün Çoğaltımına Farklı BAP ve GA ₃ Kombinasyonlarının Etkisi..... | 130 |
| 4.3.6. | Sürgün Çoğaltımına Floroglukinol'ün Etkisi..... | 131 |
| 4.3.7. | Aksillar Sürgünlerin Gelişmesine Farklı BAP ve GA ₃ Kombinasyonlarının Etkisi..... | 132 |
| 4.3.8. | Tohumdan Elde Edilen Sürgünlerin Çoğaltımına BAP Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 133 |
| 4.3.9. | Sürgün Çoğaltım Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi ve Tartışma..... | 134 |

| | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| 4.3.9.1. Besi Ortamı..... | 134 |
| 4.3.9.2. Sitokininler..... | 137 |
| 4.3.9.3. Sitokininlerle Birlikte Kullanılan GA ₃ | 139 |
| 4.3.9.4. Floroglukinol..... | 140 |
| 4.3.9.5. Tohum Kaynaklı Kùltürler..... | 140 |
| 4.4. Köklendirme Çalışmaları..... | 141 |
| 4.4.1. Sürgün Köklenmesine IBA ve NAA Konsantrasyonlarının Etkisi..... | 141 |
| 4.4.2. Sürgün Köklenmesine Karanlık Uygulamasının Etkisi..... | 142 |
| 4.4.3. Köklendirme Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi ve Tartışma..... | 144 |
| 4.4.3.1. Oksinler..... | 144 |
| 4.4.3.2. Karanlık Uygulaması..... | 147 |
| 4.5. Dış Ortama Alıştırma (Aklimatizasyon) Çalışmaları..... | 148 |
| 4.5.1. Dikim Ortamlarının Aklimatizasyona Etkisi..... | 148 |
| 4.5.2. Köklendirmede Kullanılan Oksinlerin Aklimatizasyona Etkisi..... | 149 |
| 4.5.3. Soğuk Uygulamasının Aklimatizasyona Etkisi..... | 150 |
| 4.5.4. Aklimatizasyonda Kullanılan Havalandırma Yöntemleri..... | 151 |
| 4.5.5. Aklimatizasyon Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi ve Tartışma..... | 152 |
| 4.5.5.1. Dikim Ortamı..... | 152 |
| 4.5.5.2. Köklendirme şartları..... | 153 |
| 4.5.5.3. Nem Kontrolü..... | 154 |
| 5. SONUÇLAR..... | 155 |
| 5.1. Yüzey Sterilizasyon Çalışmaları..... | 155 |
| 5.2. Kùltür Başlatma Çalışmaları..... | 155 |
| 5.3. Sürgün Çoğaltım Çalışmaları..... | 157 |
| 5.4. Köklendirme Çalışmaları..... | 158 |
| 5.4. Dış Ortama Alıştırma (Aklimatizasyon) Çalışmaları..... | 159 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 161 |
| Özgeçmiş..... | 175 |

ÖZET

KİRAZIN (*Prunus avium* L.) *in vitro* MİKROÇOĞALTIMI

DOKTORA TEZİ

Zafer AKTÜRK

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2009

Dünya kiraz üretimi ve ihracatı bakımından, Türkiye ilk sırada yer almakta olup, bu üretimin büyük bir kısmı 0900-Ziraat çeşidi ile yapılmaktadır. Bu çalışmada, 0900-Ziraat çeşidinin juvenil ve olgun materyallerinden *in vitro* mikroçoğaltımı için protokollerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Verim çağındaki beş yaşlı kiraz ağaçlarından alınan tomurcuk ve olgun tohumlardan aksenik materyal üretmek üzere yüzey sterilizasyon metodu geliştirilmiştir. Kültür başlatmak için kullanılan tomurcukların yüzey sterilizasyonu %15'lik NaOCl içinde 25 dakika; endokarpı uzaklaştırılmış tohumların yüzey sterilizasyonu %15'lik NaOCl içinde 20 dakika boyunca çalkalanarak yapılmıştır. Tomurcuklarının içerisinde bulunduğu vejetasyon dönemine ve eksplant hazırlama yöntemine bağlı olarak, yüzey sterilizasyonunun başarısının büyük ölçüde etkilendiği gözlenmiştir.

Kültür başlatma materyali olarak yan tomurcuklar kullanılmış, dormant haldeki tomurcukların yüksek oranda rozet sürgün oluşturduğu tespit edilmiş, pulları temizlenerek hazırlanan eksplantlarla başarılı bir şekilde kültür başlatılmıştır. En uygun kültür başlatma döneminin Ocak-Mart ayları arası olduğu belirlenmiştir. Modifiye MS besi ortamına ilave edilen 2 mg^l⁻¹ BAP + 0.5 mg^l⁻¹ IAA veya 2 mg^l⁻¹ BAP ile %95'in üzerinde bir başarı ile kültür başlatılmıştır. Karbonhidrat kaynağı olarak sukrozun 30 mg^l⁻¹ konsantrasyonunun, tomurcuklardan kültür başlatmak için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Tohumdan kültür başlatma çalışmalarında, enine ikiye bölünerek embriyonik ucun kültüre alınmasıyla daha başarılı sonuç alınmış, *in vitro* çimlendirme için besi ortamına büyüme düzenleyici ilave edilmesine gerek olmadığı tespit edilmiştir.

Sürgün çoğaltım çalışmalarında; farklı besi ortamlarının (MS, QL, WPM, SH), sitokinin tip ve konsantrasyonlarının (BAP, TDZ, kinetin), sitokininlerle birlikte kullanılan GA₃'ün ve floroglukinol'ün etkileri incelenmiştir.

Tomurcuklardan başlatılan kültürlerde sürgün çoğaltımı için 2.0 mg^l⁻¹ BAP + 0.3 mg^l⁻¹ GA₃ ile destekli modifiye MS besi ortamın en iyi sonuç verdiği tespit edilmiş ve alt kültüre alınabilir eksplant oranı %96 ± 4, sürgün sayısı 1.7 ± 0.4 adet, ana sürgün uzunluğu 12.0 ± 0.5 mm, yan sürgün uzunluğu 5.0 ± 0.3 mm olarak belirlenmiştir. Ayrıca, besi ortamının floroglukinol ile desteklenmesinin, sürgün çoğaltımına herhangi bir etkisi görülmemiştir. Kiraz tohumları ile başlatılmış kültürlerde, besi ortamındaki BAP konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısının da arttığı görülmüş, en yüksek sürgün sayısı 4.0 mg^l⁻¹ (5.4 ± 0.7 adet) BAP ilaveli besi ortamlarında elde edilmiştir.

Tohum kaynaklı sürgünlerle yürütülen köklendirme çalışmalarında, oksin tip ve konsantrasyonları (IBA, NAA) ile karanlık uygulamalarının etkileri incelenmiştir. Köklenme oranları, kullanılan bitki büyüme düzenleyicilere göre %75 ile %95 arasında değişmiş, IBA içeren ortamlarda kallus oluşumunun çok az ve elde edilen köklerin daha sağlıklı olduğu gözlenmiştir. Tomurcuklardan başlatılan kültürlerdeki sürgünlerin köklendirilmesinde ilerleme sağlanamamıştır. Köklü kiraz bitkilerinin dikimi için kullanılan ortamlardan en başarılısı %59 yaşama oranı ile torf-perlit (2:1 h/h) karışımı olmuş ve köklendirme ortamında kullanılan oksinlerin, kiraz bitkilerinin aklimatizasyonuna etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kiraz, *Prunus avium* L., 0900-Ziraat, mikroçoğaltım, tomurcuk kültürü,

ABSTRACT

IN VITRO MICROPROPAGATION OF SWEET CHERRY

Ph.D. THESIS

Zafer AKTÜRK

DICLE UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

2009

Turkey is the leading cherry producer in the world, accounting for most of production with “0900-Ziraat” cultivar in respect to production and exportation. The aim of this study was to develop a reliable and efficient micropropagation system for juvenile and mature *Prunus avium* L. cultivar “0900-Ziraat”.

Mature seeds and sprouting axillary buds sampled from a mature five years old *P. avium* L. cultivar “0900-Ziraat” were used as starting material for *in vitro* culture establishment. In order to initiate axenic cultures from mature seeds, which outer pericarp was removed, the surface sterilization technique using 15% NaOCl at 20 min was completely effective on the axenic germination of cherry seeds for the use of further tissue culture studies. Mature buds were also surface sterilized by a 15% NaOCl with 25 min. Establishment of axenic cultures sterilization technique depends upon the period of explant harvesting time and the preparation methods of explants used.

Axillary buds were used for the culture initiation. Dormant buds produced high level of rosette shoots, but successful culture initiation was obtained by the explants which the scale leaves were removed. The most suitable time for the initiation of axenic cultures was over the period of January-March. The cultures with a 95% success rate were initiated when modified MS medium containing 2 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ IAA or 2 mg l⁻¹ BAP was used for the establishment of cultures. Sucrose at 30 g l⁻¹ gave superior growth compared to the other three carbon sources for the establishment of cultures from buds. In the present study, the isolated embryogenic axes of mature seeds of *P. avium* L. were axenically germinated on MS medium devoid of plant growth regulators.

The effects of different media (MS, QL, WPM and SH), cytokinin type (BAP, TDZ, kinetin) and their concentrations and GA₃ and Phloroglucinol of BAP together with a control (a fresh initiation medium) on the multiplication of regenerated shoot type explants of *P. avium* L. were tested for shoot proliferation.

MS medium containing 2.0 mg l⁻¹ BAP + 0.3 mg l⁻¹ GA₃ gave the best results for multiple shoot proliferation from the bud derived cultures and it was determined that the explants rate for subculturing (96 ± 4), mean number of shoots per explant, (1.7 ± 0.4), mean length of main shoot (12.0 ± 0.5 mm) and mean length of axillary shoots (5.0 ± 0.3 mm) per explants were determined. Moreover, phloroglucinol was not found to have a beneficial effect to shoot proliferation when it was added to the media. Number of shoots derived from axenic germinated seeds was increased when the BAP concentration tested was increased, and the greatest number shoots (5.4 ± 0.7) were obtained from 4.0 mg l⁻¹ BAP containing media.

In the rooting studies, effects of auxin types (IBA, NAA) and their concentration were investigated for the shoots derived from seeds. The percentages of rooting were varied between 75% and 95% and media containing IBA produced less callus and healthy roots. No rooting responses were obtained from the regenerated mature material of *P. avium* L. cv “0900-Ziraat”. The best method developed for plantlet acclimatization was a sterile 2:1 mixture of peat and perlite and auxins used in the rooting treatments have an impact upon the acclimatization of plantlets.

Key Words: Sweet cherry, *Prunus avium* L., 0900-Ziraat, micropropagation, node culture,

ÇİZELGE LİSTESİ

| <u>Çizelge No</u> | | <u>Sayfa</u> |
|----------------------|---|--------------|
| Çizelge 2.1. | Olgunlaşma zamanlarına göre bazı kiraz çeşitleri | 6 |
| Çizelge 2.2. | Dünya kiraz üretiminde başlıca ülkeler | 7 |
| Çizelge 2.3. | Türkiye’de kiraz üreticisi başlıca iller | 8 |
| Çizelge 2.4. | Kiraz meyvesinin kimyasal içeriği (100 g meyve etinde) | 9 |
| Çizelge 3.1. | Çalışmada kullanılan kültür kapları ve özellikleri | 57 |
| Çizelge 3.2. | Çalışmadaki büyüme düzenleyicilerin molekül ağırlığı ve kullanılan çözücüler | 61 |
| Çizelge 4.1. | Kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl konsantrasyonlarının etkisi-I (10 dk - Nisan) | 77 |
| Çizelge 4.2. | Kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl konsantrasyonlarının etkisi-II (20 dk - Haziran) | 78 |
| Çizelge 4.3. | Kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna %15 NaOCl’in uygulama sürelerinin etkisi | 79 |
| Çizelge 4.4. | Kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna vejetasyon döneminin etkisi | 80 |
| Çizelge 4.5. | Kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna eksplant hazırlama yönteminin etkisi | 81 |
| Çizelge 4.6. | Kiraz tohumlarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl konsantrasyonlarının etkisi | 82 |
| Çizelge 4.7. | Kiraz tohumlarının yüzey sterilizasyonuna %15 NaOCl’in uygulama sürelerinin etkisi | 83 |
| Çizelge 4.8. | Kiraz lateral tomurcuklarında yüzeysel sterilizasyon protokolü | 86 |
| Çizelge 4.9. | Kiraz tohumlarında yüzeysel sterilizasyon protokolü | 87 |
| Çizelge 4.10. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP’in etkisi | 90 |
| Çizelge 4.11. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya TDZ’nin etkisi | 91 |
| Çizelge 4.12. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya kinetinin etkisi | 92 |
| Çizelge 4.13. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP ile birlikte kullanılan IAA’nın etkisi | 94 |
| Çizelge 4.14. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP ile birlikte kullanılan IBA’nın etkisi | 95 |
| Çizelge 4.15. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP ile birlikte kullanılan NAA’nın etkisi | 96 |

| <u>Çizelge No</u> | | <u>Sayfa</u> |
|----------------------|---|--------------|
| Çizelge 4.16. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP ile birlikte kullanılan 2,4-D'nin etkisi | 97 |
| Çizelge 4.17. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya TDZ ile birlikte kullanılan IAA'nın etkisi | 98 |
| Çizelge 4.18. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya TDZ ile birlikte kullanılan IBA'nın etkisi | 98 |
| Çizelge 4.19. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya TDZ ile birlikte kullanılan NAA'nın etkisi | 99 |
| Çizelge 4.20. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya TDZ ile birlikte kullanılan 2,4-D'nin etkisi | 100 |
| Çizelge 4.21. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP ile birlikte kullanılan GA ₃ 'ün etkisi | 101 |
| Çizelge 4.22. | Tomurcuklardan kültür başlatmada başarılı bulunan büyüme düzenleyicilerin etkilerinin tekrarlanabilirliği (Alt kültüre alınabilir eksplant oranı) | 102 |
| Çizelge 4.23. | Tomurcuklardan kültür başlatmada başarılı bulunan büyüme düzenleyicilerin etkilerinin tekrarlanabilirliği (Rozet sürgün oranı) | 103 |
| Çizelge 4.24. | Tomurcuklardan kültür başlatmada başarılı bulunan büyüme düzenleyicilerin etkilerinin tekrarlanabilirliği (Yaprak sayısı) | 104 |
| Çizelge 4.25. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya şeker tiplerinin etkisi | 105 |
| Çizelge 4.26. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya şeker karışımlarının etkisi | 106 |
| Çizelge 4.27. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya kültüre alma döneminin etkisi | 107 |
| Çizelge 4.28. | Tomurcuklardan kültür başlatmaya tomurcukların ağaçtaki pozisyonunun etkisi | 108 |
| Çizelge 4.29. | Kiraz tohumlarının <i>in vitro</i> çimlendirilmesine eksplant hazırlama yönteminin etkisi | 108 |
| Çizelge 4.30. | Kiraz tohumlarının <i>in vitro</i> çimlendirilmesine büyüme düzenleyicilerinin etkisi | 110 |
| Çizelge 4.31. | Kiraz tohumlarının <i>in vitro</i> çimlendirilmesine BAP konsantrasyonlarının etkisi | 111 |
| Çizelge 4.32. | Kiraz tohumlarının <i>in vitro</i> çimlendirilmesine karanlıkta bekletme süresinin etkisi | 111 |
| Çizelge 4.33. | Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına farklı besi ortamlarının etkisi | 125 |
| Çizelge 4.34. | Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına farklı sitokin tip ve konsantrasyonlarının etkisi | 127 |

| <u>Çizelge No</u> | | <u>Sayfa</u> |
|----------------------|---|--------------|
| Çizelge 4.35. | Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına yüksek BAP konsantrasyonlarının etkisi | 128 |
| Çizelge 4.36. | Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına sitokin - GA ₃ kombinasyonlarının etkisi | 129 |
| Çizelge 4.37. | Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına BAP - GA ₃ kombinasyonlarının etkisi | 130 |
| Çizelge 4.38. | Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına Floroglukinol'ün etkisi | 132 |
| Çizelge 4.39. | Kiraz kültürlerinden elde edilen aksillar sürgünlerin gelişmesine farklı BAP ve GA ₃ konsantrasyonlarının etkisi | 132 |
| Çizelge 4.40. | Tohumla başlatılmış kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına BAP konsantrasyonlarının etkisi | 133 |
| Çizelge 4.41. | Tohumla başlatılmış kiraz kültürlerinde sürgün köklenmesine IBA ve NAA konsantrasyonlarının etkisi | 142 |
| Çizelge 4.42. | Tohumla başlatılmış kiraz kültürlerinde sürgün köklenmesine karanlık uygulamasının etkisi | 142 |
| Çizelge 4.43. | Köklendirilmiş kiraz bitkilerinin aklimatizasyonuna dikim ortamlarının etkisi | 148 |
| Çizelge 4.44. | Köklendirilmiş kiraz bitkilerinin aklimatizasyonuna köklendirmede kullanılan oksinlerin etkisi | 150 |
| Çizelge 4.45. | Köklendirilmiş kiraz bitkilerinin aklimatizasyonuna soğuk uygulamasının etkisi | 150 |
| Çizelge 4.46. | Köklendirilmiş kiraz bitkilerinin aklimatizasyonunda kullanılan havalandırma yöntemleri | 151 |

ŞEKİL LİSTESİ

| <u>Şekil No</u> | | <u>Sayfa</u> |
|-----------------|--|--------------|
| Şekil 3.1. | MS besi ortamının stok çözeltileri ve hazırlanışı | 60 |
| Şekil 4.1. | Lateral tomurcukların kültüre alınmasında kullanılan eksplant hazırlama yöntemleri ve 5 gün sonraki enfeksiyon durumları | 81 |
| Şekil 4.2. | Farklı sitokininlerle desteklenen besi ortamında, kültürün 28. gününde, lateral tomurcuklardan gelişen rozet sürgünler | 93 |
| Şekil 4.3. | Farklı şekerlerle desteklenen besi ortamlarında, kültürün 28. gününde, lateral tomurcuklardan gelişen rozet sürgünler | 106 |
| Şekil 4.4. | “Normal”, “yarım kotiledonlu embriyonik uç” ve “embriyonik uç” halinde ekim yapılan kiraz tohumlarına ait kültürler | 109 |
| Şekil 4.5. | BAP - oksin kombinasyonları ile desteklenen besi ortamlarında, kültürün 28. gününde lateral tomurcuklardan gelişen rozet sürgünler | 120 |
| Şekil 4.6. | Sürgün çoğaltımı için farklı besi ortamlarının kullanıldığı deneyde, kültürün 28. günündeki gelişme durumları | 126 |
| Şekil 4.7. | 2 mg ^l ⁻¹ BAP ve 0.3 mg ^l ⁻¹ GA ₃ ile desteklenen besi ortamında sürgün çoğaltımı | 131 |
| Şekil 4.8. | Oksin içeriği farklı olan besi ortamlarında, kiraz sürgünlerinin köklenme durumu | 143 |
| Şekil 4.9. | IBA ve NAA'nın 0.5 mg ^l ⁻¹ konsantrasyonunu içeren besi ortamında köklenmiş kiraz bitkileri | 145 |
| Şekil 4.10. | Farklı dikim ortamlarına aktarılan köklü kiraz bitkilerinin, aklimatizasyon aşamasındaki görünüşleri | 149 |

KISALTMA VE SİMGELER

| | |
|-----------------|---|
| 2,4-D | : 2,4-Diklorofenoksi asetik asit |
| 2iP | : N-izopentil adenin |
| AP | : Almehdi ve Parfitt (1986) |
| B5 | : Gamborg ve ark. (1968) |
| BAP | : 6-Benzilaminopurin |
| CH | : Kazein hidrolizat |
| CP | : Chee ve Pool (1987) |
| CPPU | : N-(2-kloro-4-pyridil)-N ² -fenil üre |
| DICA | : Dikloroizosiyanürik asit |
| DKW | : Driver ve Kuniyuki (1984) |
| GA ₃ | : Gibberellik asit |
| IAA | : İndol-3-asetik asit |
| IBA | : İndol-3-butirik asit |
| MS | : Murashige ve Skoog (1962) |
| NAA | : α -Naftalen asetik asit |
| QL | : Quoirin ve Lepoivre (1977) |
| SH | : Schenk ve Hildebrandt (1972) |
| TDZ | : Thidiazuron |
| TK | : Tabachnik ve Kester (1977) |
| WPM | : Woody Plant Medium (Lloyd ve McCown, 1981) |
| Zea | : Zeatin |

1. GİRİŞ

Kiraz yetiştiriciliği, bugün dünyanın ılıman iklim kuşağında yer alan birçok ülkesine yayılmış durumdadır. Afrika'nın kuzeyi, Avrupa'nın tamamı, Ortadoğu'nun batı kısmında yer alan ülkeler, Anadolu, Hazar Denizi ve buraya yakın ülkeler ile Kuzey ve Güney Amerika Kıtası kiraz yetiştiriciliğinin yoğun olduğu yerlerdir (Westwood 1995). Ülkemizde yabancı olarak Kuzey Anadolu dağlarında, Toroslarda ve Doğu Toroslarda kiraza sıkça rastlanmaktadır (Özbek 1978; Özçağırın ve ark. 2003).

Dünya kiraz üretimi 2007 yılı itibariyle 2.083.000 ton olup, üretim bakımından 398.000 ton ile ilk sırada yer alan Türkiye'yi, ABD, İran, İtalya ve Rusya takip etmektedir. Dünya kiraz üretiminde %19' luk payıyla birinci sırada yer alan ülkemizin kiraz üretimindeki bu payı yıldan yıla artış göstermektedir (FAO 2009).

Kiraz, en fazla tüketilen taze meyveler arasında yer almaktadır. Kiraz meyvelerinin kendine has albeni, tat ve aroması, hem iç hem de dış pazarlarda tüketicinin ısrarla aradığı ve severek tükettiği bir meyve olmasını sağlamıştır. Dolayısıyla pazarda yüksek fiyatla alıcı bulabilen meyveler arasında yer almaktadır (Gülcan ve ark. 1995).

Kirazın meyveleri özellikle mineral madde açısından oldukça zengindir. Düşük meyve suyu randımanı ve asitliği nedeniyle genellikle meyve suyu olarak işlemeye uygun değildir. Üretilen kirazın hemen hepsi taze olarak tüketilmektedir (Eriş ve Barut 2000).

Pazar taleplerini karşılayabilmek için birçok ülkede kiraz ıslah çalışmaları yürütülmektedir. Bu çalışmaların ana hedefleri kısaca; verimliliği artırarak üretim maliyetini düşürmek, hastalık ve böceklerin zararını azaltmak ve uzun depo ömrü ile düşük fiyatlı yüksek kaliteli meyveler elde etmek şeklinde sıralanabilir. Bu amaçlara ulaşmak için, geleneksel ıslah programlarının, gen haritalama ve biyomühendislik çalışmaları ile entegre edilmesi önem taşımaktadır (Scorza 2001).

Genelde tür içi ve türler arası hibridizasyonun kullanıldığı geleneksel ıslah metotları, heterozigotik yapı ve gelişen yeni bireylerin poligenik özelliklere sahip olmasından dolayı, oldukça zordur. Kirazın ıslahındaki bu engeller, genetik mühendisliği metotlarıyla ortadan kaldırılabilmektedir. Fakat bu çalışmalar için ön şart,

bitki doku kültürü teknikleri kullanarak bitkilerin rejenerasyonunu sağlamaktır (Tang ve ark. 2002).

Bitki biyoteknolojisi alanındaki önemli gelişmeler sayesinde, bugün artık ıslah çalışmaları çok daha hızlı ve başarılı olarak yürütülmekte ve bilimsel çalışmaların ticari sonuçları da alınmaya başlanmaktadır. Genetik manipulasyon çalışmalarının yapılabilmesi için, ilk ve temel aşama olan doku kültürü protokollerinin tamamlanması gerekmektedir. Diğer bir ifade ile; sterilizasyon, uygun ortam tespiti ve kültür şartları ile birlikte birçok değişkeni içeren *in vitro* tekniklerdeki protokolleri etkileyen faktörlerin optimize edilmesi gerekmektedir.

In vitro teknikler, ıslah çalışmalarında kullanımın yanında, son yıllarda ticari çoğaltım amaçlı olarak giderek artan bir kullanım alanı bulmaktadır. Özellikle klonal *Prunus* anaçlarının mikroçoğaltımı büyük bir ticari sektör haline gelmiştir. Anaç genotipleri ile birlikte, üretim potansiyeli yüksek olan çeşitlerin de *in vitro* çoğaltım protokollerinin belirlenmesiyle, mikroaşı gibi sonraki aşamalara geçilerek sağlıklı üretim materyalini hızlı bir şekilde temin etmek mümkün olacaktır.

In vitro koşullarda yapılan mikroçoğaltım, ekolojik koşullardan bağımsız olarak yapılmakta ve klasik yöntemlerle çoğaltmaya alternatif bir yaklaşım sağlamaktadır. Büyük boyutlarda yapılan mikroçoğaltım çalışmaları yüksek potansiyel sağlayıp hız, zaman ve yerden kazanç sağlar (Aka-Kaçar ve ark. 2001).

Kirazın *in vitro* çoğaltımı ve doku kültürleri üzerine çeşitli çalışma yapılmıştır ve halen yeni araştırmalar yapılmaktadır. Ancak, ülkemizin en yaygın ve ticarete en çok kabul görmüş çeşidi olarak nitelendirebileceğimiz 0900-Ziraat çeşidinde, yeteri kadar çalışmanın yapılmadığı görülmektedir. Bu çeşidin *in vitro* mikroçoğaltım tekniklerinin belirlenmesi ile modern ıslah çalışmalarına konu olmasına imkan verilmiştir. Ayrıca kiraz anaçlarının *in vitro* kültürleri ile yapılacak mikroaşı çalışmalarına zemin hazırlanmıştır. Bu çalışmada, 0900-Ziraat kiraz çeşidinin lateral tomurcuklarından ve tohumlarından başlatılan kültürlerle, mikroçoğaltımın bütün aşamalarına ait protokoller geliştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kiraz Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Sistematığı, Anavatanı ve Kültür Tarihi

Kiraz, Türkiye meyve yetiştiriciliğinde önemli yere sahip olan meyve türlerindedir. Üretimi yapılan sert çekirdekli meyveler grubunda, kayısı ve şeftaliden sonra üçüncü sırada yer alır. Kiraz meyveleri, ilkbaharda meyvenin az olduğu bir dönemde pazara çıkması, güzel rengi ve kendine özgü tadından dolayı zevkle tüketilmektedir. Türkiye'deki farklı ekolojiye sahip değişik bölgeler ve çeşitlerin olgunlaşma zamanı dikkate alındığında, kiraz Mayıs ayı başından Temmuz ayı ortasına kadar olan dönemde pazarlarda görülmektedir (Özçağırın ve ark. 2003).

Kiraz (*Prunus avium* L.), Rosales takımının Rosaceae familyasının Prunoideae alt familyasında yer almaktadır. Anavatanı Güney Kafkasya, Hazar Denizi ve kuzeydoğu Anadolu olup, tüm dünyaya yayılımı da bu bölgelerden olmuştur (Özbek 1978). Kirazın anavatan bölgesinden Dünya'nın diğer bölgelerine yayılmasında kuşlar, eski medeniyetler arasındaki savaşlar ile ekonomik ve kültürel ilişkiler önemli rol oynamıştır.

Kirazın ilk olarak ne zaman kültür meyvesi olarak yetiştirilmeye başlandığı kesin olarak bilinmemektedir. Kültürü ile ilgili en eski kayıtlar Yunanistan'da bulunmuştur. Eski döneme ait belgelerden anlaşıldığına göre, kiraz kültürü Yunanistan ve İtalya'da milattan önceki zamanlarda yapılmıştır. Kiraz yetiştiriciliği bugün, Dünya'nın ılıman iklim kuşağında yer alan birçok ülkesine yayılmış durumdadır (Özçağırın ve ark. 2003).

2.1.2. Morfolojik Özellikleri

Yabani kiraz (*Prunus avium* L.) yüksek boylu, dikine gelişen, bazen de yayvan taçlı ağaçlar meydana getirir. Mahlep anacı (*Prunus mahaleb* L.) üzerine aşılandığında daha küçük ağaçlar meydana getirir. Dik ve düzgün bir gövde teşkil ederler.

Yabani kiraz nispeten yüzeysel köklü bir meyve türüdür. Mahlepten daha fazla ince kök oluşturur. Gövdesi, genellikle dik, düzgün, kurşunimsi vişne veya boz vişne

renkte; kabuğu genç ağaçlarda düzgün, dalgasız; yaşlı ağaçlarda pürüzlü, dalgalı, çatal kısımlarda çatlamış durumdadır.

Kiraz ağaçları seyrek bir dallanma gösterir. Dallar genellikle tacın orta kısmında dik, dış kısımlarda dar açılı gelişme gösterirler. Tomurcuklar buldukları yere göre, tepe tomurcuğu (apikal) ve yan (koltukaltı veya lateral) tomurcuk olarak adlandırılır. Tepe tomurcuğu dalların uç kısmında bulunur. Bunlar dalların uzamasını sağlar. Yan tomurcuklar değişik uzunluklardaki dalların yan kısımlarında, yaprak koltukaltılarında meydana gelirler. Bunlardan yaprak, sürgün veya çiçekler oluşabilir. Anatomik yapılarına göre de tomurcuklar, çiçek ve odun tomurcukları diye ikiye ayrılır.

Kiraz yapraklarının genç dallar üzerindeki dizilişi almaşlı (spiral) durum gösterir. Yaprakların uç kısmı dar ve sivri, sap tarafı yuvarlakçadır. Yaprak ayası hafif dalgalı, üst yüz koyu yeşil, alt yüz damar çevresinde tüylü, damarlar belirgin çıkıntılı, mat yeşildir. Yaprak kenarları çift testere dişlidir. Yaprak sapının aya ile birleştiği yerde sap veya aya üzerinde 1-5 adet siğil bulunur.

Kirazın çiçekleri tam teşekküllüdür. Cinsiyet bakımından erselik yapıdadır. Yumurtalık orta durumludur. Kiraz çiçekleri genellikle 2 ve daha yaşlı dallar üzerindeki mayıs buketlerinde meydana gelir. Çiçek tomurcuklarından sadece çiçekler oluşur. Bir tomurcuktan 1-4 adet çiçek meydana gelebilir. Çiçekler büyük ve 5'li yapıdadır. Çanak yapraklar yeşil, taç yaprakları beyazdır. Bazı kiraz çeşitlerinde iki dişi organlı çiçek oluşumu oldukça fazladır. Ayrıca bazı çiçekler beşten fazla taç yaprak bulundurabilir (Özçağırın ve ark. 2003).

Kiraz meyveleri değişik renklere olup, bazı çeşitlerde karın çizgisine sahiptir. Meyveler yuvarlak, oval veya kalp şeklindedir. Çekirdekler meyve etine yapışık (Eriş ve Barut 2000). Meyve kabuğu ince, parlak ve meyve etine sıkıca yapışık.

Tohumların sap tarafı geniş, dolgun, kabuk düz veya pürüzlü, karın çizgisi tarafı uzunluğuna sırtlı veya oluklu, uç tarafı dar, küt veya sivri uçludur. Krem rengindedir. 100 tohum ağırlığı 15-30 g arasında değişir (Özçağırın ve ark. 2003).

2.1.3. Biyolojik Özellikleri

Kiraz yetiştiriciliğinde döllenme en önemli sorunu teşkil eder. Son yıllarda elde edilen kendine verimli çeşitler dışındaki bütün kiraz çeşitleri, meyve tutumu için

yabancı tozlanma gerektirir. Normal yapıda çiçektozu ve yumurta hücresi oluşturmalarına rağmen, çeşitler kendi çiçektozu ile tozlandığı zaman sadece %0-2 oranında meyve bağlayabilmektedir.

Kiraz çeşitlerinde birbiriyle uyumsuzluk da yaygın olarak görülür. Birbiriyle uyumsuzluk mekanizması şu şekilde cereyan etmektedir: Kirazda, uyumsuzluk geni olan “S”in 6 adet allelinin bulunduğu tespit edilmiş ve allel sayısının daha da fazla olduğu tahmin edilmektedir. Diploit yapıdaki somatik hücrelerde S_1S_2 , S_2S_3 vb. şekilde bulunurken, haploit yapıdaki çiçek tozu ve yumurta hücrelerinde bu allellerden biri (S_1 veya S_2 ...) bulunmaktadır. Çiçeğin stil dokusu, stigmada çimlenip çim borusu oluşturan polenlerden kendi allelleri ile aynı olanların gelişmesine izin vermediğinden, çiçekler kendi polenleriyle veya aynı alleli taşıyan başka çeşide ait polenlerle döllenememektedir.

Kirazdaki bu sorunlar dikkate alınarak uyumsuzluk grupları oluşturulmuş ve her çeşit için tozlayıcı çeşitler belirlenmiştir (Özçağırın ve ark. 2003).

2.1.4. Çoğaltma Yöntemleri

Kirazın kalıtsal yapısı heterozigot olduğundan tohumdan çoğaltıldığında, ana bitkinin özellikleri kendinden sonraki nesle çoğunlukla değişim göstererek geçer. Bundan dolayı kiraz aşılı ile çoğaltılır. Kirazda daha çok ‘T’ göz aşısı uygulanır.

Dünyada ve ülkemizde anaç olarak yabani kiraz (*Prunus avium* L.) ve mahlep (*Prunus mahaleb* L.) çöğürleri ile bunlardan elde edilmiş klonlar kullanılmaktadır. Ülkemizde “kuş kirazı” adı verilen yabani kiraz üzerine aşılı çeşitler, daha büyük taçlı ve uzun ömürlü ağaçlar oluşturur. Aşılı uyumsuzluğu sorunu görülmez. Özellikle fakir ve kıraç topraklar için tavsiye edilen mahlep anaç ise daha küçük taçlı ağaçlar oluşturur. Ağaçların ömrü kuş kirazına aşılı olanlara nispeten daha kısadır ve bazı çeşitlerde uyumsuzluk görülebilir.

Son yıllarda modern yetiştiriciliğin gereği olan klon anaç kullanımı yaygınlaşmıştır. Colt, Maxma, SL-64, Gisela serisi ve daha birçok yeni klon anaç kiraz yetiştiriciliğinde giderek daha fazla yer almaktadır. Çelik, daldırma veya doku kültürü ile çoğaltılan bu anaçların, homojen ağaçlar oluşturması, üzerine aşılı çeşitleri erken meyveye yatırması, kaliteli ve verimli ürün sağlaması önemli avantajlarındandır.

Ayrıca, farklı biyotik ve abiyotik koşullara dayanım bakımından yetiştiricilere alternatif sunmaktadırlar.

2.1.5. Kirazın Pomolojik Özellikleri ve Bazı Önemli Kiraz Çeşitleri

Kültür kiraz çeşitleri, meyve rengi ve meyve eti sertliğine göre iki gruba ayrılır. Heart grubundaki (*Prunus avium* var. Juliana) çeşitlerin meyveleri kalp şeklinde, meyve eti yumuşak ve nazik, bu nedenle de nakliyyeye elverişli değildir. Bigarreau grubunda ise; meyveler daha çok yuvarlak şekilli, meyve eti sert ve gevrek olup yola dayanımı daha iyidir. Bu grubun en önemli problemi; hasada yakın dönemdeki yağış ve sulamaların meyvelerde çatlamaya neden olmasıdır.

Kirazlarda çeşit sayısı oldukça çoktur. Değişik ülkelerde yapılan ıslah çalışmalarıyla, her yıl yeni çeşitler meyve yetiştiriciliği dünyasına sunulmaktadır. Bu çeşitlerden bazıları, olgunlaşma zamanlarına göre gruplandırılarak Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Olgunlaşma zamanlarına göre bazı kiraz çeşitleri (Özçağırın ve ark. 2003)

| Çok Erken | Erken | Orta Erken | Orta | Orta Geç | Geç | Çok Geç |
|-----------|--------------|---------------|-----------|-----------------|--------------------|-----------------------|
| Turfanda | E.Burlat | Vista | Sapıkısa | Van | Lambert | 0900-Ziraat |
| Kırdar | Acı Bursa | Jaboulay | Karakiraz | Stella | Hedelfinger | Dalbastı (Malatya) |
| H. Efendi | Early Rivers | Altıparmak | E.Van | Sunburst | Windsor | Merton Late |
| Çakır | Edirne | Abdullah | Compact | Sylvia | B.Gaucher | Ferblus |
| | B.Moreau | Tabanlı | Adriana | Summit | Jubilee | Tardive Gautier |
| | | Yakacık | Fercer | Larian | Karabodur | Bianca |
| | | Macesse | Noir de | Schmidt | Reverchon | |
| | | Merpet | Guben | Bing | Merton Marvel | |
| | | Honaz | Diana | B.Napolyon | Noble | |
| | | S.H.Giant | | Bela di Pistoia | Lapins | |
| | | Honey Heart | | Merton | Karakiraz | |
| | | Berryessa | | Bigarreau | (Elazığ) | |
| | | Merton | | Napolyon(k) | Alma | |
| | | Premier | | Sam | B. Rote Knorpel | |
| | | Merton Bounty | | | | |

2.1.6. Ekonomik Önemi

Kiraz, anavatan bölgesinden çeşitli yollarla dünyanın diğer bölgelerine yayılmış, ılıman iklim kuşağında ve genellikle de nispeten nemli ve serin bölgelerde iyi sonuç vermiştir. Dünya kiraz üretiminin büyük bir kısmı kuzey yarım küreden elde edilmektedir.

Dünyanın en önemli kiraz üreticisi ülkeleri sırasıyla Türkiye (%19), ABD (%15), İran (%11), İtalya (%7), Rusya (%5), Suriye (%4), İspanya (%4), Ukrayna (%3) ve Romanya (%3)'dür (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Dünya kiraz üretiminde başlıca ülkeler (x1000 ton) (FAO 2009)

| Ülkeler | 1995 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Türkiye | 186 | 230 | 250 | 210 | 265 | 245 | 280 | 310 | 398 |
| ABD | 150 | 185 | 209 | 165 | 161 | 257 | 228 | 266 | 311 |
| İran | 157 | 216 | 219 | 220 | 222 | 175 | 225 | 225 | 225 |
| İtalya | 120 | 146 | 111 | 126 | 102 | 95 | 101 | 111 | 145 |
| Rusya | 62 | 85 | 88 | 85 | 90 | 100 | 93 | 50 | 100 |
| Suriye | 41 | 56 | 51 | 40 | 55 | 35 | 53 | 63 | 75 |
| İspanya | 56 | 113 | 86 | 115 | 108 | 83 | 96 | 94 | 73 |
| Ukrayna | 47 | 76 | 55 | 73 | 74 | 85 | 100 | 49 | 68 |
| Romanya | 61 | 74 | 91 | 66 | 99 | 51 | 118 | 105 | 65 |
| DÜNYA | 1.627 | 1.899 | 1.821 | 1.715 | 1.716 | 1.709 | 1.841 | 1.886 | 2.083 |

Türkiye son yıllarda dünyanın en önemli kiraz üreticisi ülkesi konumuna gelmiştir. Türkiye'nin hemen hemen tüm bölgelerinde kiraz üretimi yapılmaktadır. Kiraz üretiminde bazı yıllar olumsuz koşullardan kaynaklanan dalgalanmalar görülmekle beraber, üretimde genelde devamlı bir artış görülmektedir.

Türkiye'de bugüne kadar yabancı anaçlar üzerine aşı, yüksek taçlı, verime geç yatan üretim biçimi süregelmiştir. Son yıllarda yayılan ve benimsenen, klon anaçlar

sayesinde elde edilen bodur ve yarı bodur ağaçlar kiraz yetiştiriciliğine yeni bir anlayış getirmiştir (Anonim 2005).

Üretim genel olarak Ege ve Marmara bölgelerindeki illerde yoğunlaşmış durumdadır. Üretim miktarı bakımından İzmir (62.870 ton) ve Afyon (43.899 ton) illeri başı çekmekte ve bunları Manisa (35.491 ton), Konya (28.135 ton) ve Bursa (24.392 ton) illeri izlemektedir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Türkiye’de kiraz üreticisi başlıca iller (2007) (TÜİK 2009)

| İller | Üretim (ton) | Ağaç Sayısı (adet) | | |
|----------------|----------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| | | Meyve Veren Yaşta | Meyve Vermeyen Yaşta | Toplam |
| İzmir | 62.870 | 1.878.742 | 798.668 | 2.677.410 |
| Afyon | 43.899 | 441.559 | 86.565 | 528.124 |
| Manisa | 35.491 | 1.481.180 | 1.246.560 | 2.727.740 |
| Konya | 28.135 | 917.133 | 532.043 | 1.449.176 |
| Bursa | 24.392 | 706.760 | 152.170 | 858.930 |
| Amasya | 18.089 | 468.250 | 257.100 | 725.350 |
| Isparta | 16.587 | 468.185 | 189.120 | 657.305 |
| Denizli | 16.075 | 307.256 | 306.286 | 613.542 |
| Sakarya | 10.651 | 386.680 | 17.060 | 403.740 |
| TÜRKİYE | 398.141 | 12.048.104 | 6.433.506 | 18.481.610 |

2.1.7. Beslenmedeki Önemi

Kiraz meyvesi, ilkbaharda can eriği ve yenidoğuş dışında diğşer meyvelerin henüz çıkmadığı bir dönemde pazara girdiğinden tüketicinin arzu ettiğı bir meyvedir. Rengi, görünüşü, tadı ve aroması ile çok cazip bir meyve olan kiraz, daha çok sofralık olarak tüketilmektedir. Meyve suyu üretimi için meyve özellikleri pek uygun değildir.

Kiraz meyveleri özellikle mineral madde açısından oldukça zengindir. İçeriğindeki Ca ve P mineralleri ile Vitamin C miktarı dikkat çekici düzeydedir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Kiraz meyvesinin kimyasal içeriği (100 g meyve etinde)
(Özçağırın ve ark. 2003)

| İçerik | Ortalama Değerler |
|-------------------|-------------------|
| Su (g) | 83.60 |
| Protein (g) | 0.80 |
| Yağ (g) | 0.50 |
| Karbonhidrat (g) | 14.00 |
| Mineral madde (g) | 0.60 |
| Sodyum (mg) | 1.83 |
| Potasyum (mg) | 227.00 |
| Magnezyum (mg) | 0.80 |
| Kalsiyum (mg) | 16.00 |
| Manganez (mg) | 0.03 |
| Demir (mg) | 0.45 |
| Kobalt (mg) | 0.50 |
| Bakır (mg) | 0.10 |
| Fosfor (mg) | 25.00 |
| Klor (mg) | 61.00 |
| Karoten (mg) | 0.30 |
| Vitamin B1(mg) | 0.03 |
| Vitamin B2 (mg) | 0.03 |
| Nikotinamid (mg) | 0.25 |
| Vitamin B6 (mg) | 0.04 |
| Vitamin C (mg) | 10.50 |
| Limon Asidi (mg) | 15.00 |
| Total Asit (mg) | 680.00 |

2.2. *Prunus* TÜRLERİNDE *in vitro* ÇOĞALTIM ÇALIŞMALARI

Sert çekirdekli meyveler gurubunun yer aldığı *Prunus* cinsi, türlerinin ekonomik önemi nedeniyle üzerinde oldukça fazla sayıda *in vitro* çalışma yapılan bir taksondur. Bu cins içerisinde; başta *Prunus avium* L. (kiraz), *P. cerasus* L. (vişne), *P. armeniaca* L. (kayısı), *P. persica* (L.) Batsch (şeftali), *P. cerasifera* Ehrh. (can erikleri), *P. domestica* L. (Avrupa erikleri), *P. salicina* Lindl. (Japon erikleri), *P. amygdalus* Batsch. (*P. dulcis* Mill.) (badem) olmak üzere meyvesi için üretilen birçok tür yanında; *P. mahaleb* L., *P. marianna*, *P. institia* gibi anaç olarak önem taşıyan veya *P. serotina* Ehrh., *P. fruticosa* L. *P. tomentosa* L. *P. chinensis*, *P. serrulata*, *P. laurocerasus* (L.) Mill, *P. mume* Sieb. et Zucc. gibi peyzaj amaçlı kullanılan daha onlarca tür bulunmaktadır. Bu bölümde, kiraz çeşit ve anaçlarına öncelik verilmek kaydıyla, aynı cins içerisinde yer alan türlerde yürütülmüş olan *in vitro* çoğaltım çalışmaları irdelenecektir.

In vitro çalışmalarda temel olarak; mikroçoğaltım protokolü geliştirmek, yapraktan rejenerasyon, kotiledondan rejenerasyon, embriyo kültürü, somatik embriyogenesis gibi konular ele alınmıştır. Daha çok, *in vitro* araştırmaların ana safhaları olan, kültür başlatma, sürgün çoğaltımı, köklendirme ve aklimatizasyon aşamalarında başarıyı etkileyen parametreler üzerinde durulmuştur. Eksplant alma zamanı, eksplant tipi ve kaynağı, besi ortamının bileşimi ve yoğunluğu, büyüme düzenleyicilerin ve karbon kaynaklarının tip, konsantrasyon ve kombinasyonları, üzerinde en fazla çalışma yapılan konulardır.

Hammatt ve Grant (1997), bazı yabancı kiraz klonları ile beraber Charger ve F12/1 anaçlarının mikroçoğaltım protokolünü geliştirmek amacıyla yürüttükleri çalışmada, başlangıç materyali olarak sürgün ucu kullanmışlardır. Kültür başlatma aşaması Mayıs-Haziran döneminde yapılmış, sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonu %10 NaOCl içerisinde 10 dakika bekletildikten sonra birkaç defa steril saf suda çalkalanarak tamamlanmıştır. Besi ortamı olarak Murashige ve Skoog (1962) (MS) besi ortamı ile Quoirin ve Lepoivre (1977) (QL) ve Lloyd ve McCown (1981) (WPM) ortamlarının modifiye edilmiş bir kombinasyonu kullanılmış, tüm aşamalarda besi ortamına 30 g^l⁻¹ sukroz ve 6 g^l⁻¹ agar ilave edilmiş, pH 5.6 olarak ayarlanmıştır. Kültür başlatma aşamasında tüm eksplantlar için 1 mg^l⁻¹ 6-Benzilaminopurin (BAP), 0.1 mg^l⁻¹ İndol-3-

Butirik Asit (IBA), 0.1 mg l^{-1} Gibberellik Asit (GA_3) ve 126 mg l^{-1} Floroglukinol ile destekli modifiye MS besi ortamından faydalanılmıştır. Yabani kiraz klonlarının ve Changer anacının sürgün çoğaltımı, 0.5 mg l^{-1} BAP, 0.1 mg l^{-1} IBA ve 126 mg l^{-1} Floroglukinol ile destekli MS besi ortamında, F 12/1 anacı ise 1 mg l^{-1} BAP, 0.1 mg l^{-1} IBA ve 0.1 mg l^{-1} GA_3 ile destekli MS besi ortamında gerçekleştirilmiştir. Sürgün çoğaltma aşamasında kullanılan klonların ortalama sürgün sayılarının 1.2 ± 0.5 ile 6.6 ± 0.8 arasında değiştiği bildirilmiştir. Köklendirme çalışmalarında 3 mg l^{-1} IBA ile destekli MS besi ortamı temel olmak üzere 162.14 mg l^{-1} Floroglukinol kullanılan ve kullanılmayan ortamlar üzerinde durulmuştur. Köklenme ortamlarında Floroglukinol'un gerekli olduğu sonucuna varılan çalışma ile elde edilen köklü bitkilerin tamamına yakını dış ortama aktarılmıştır. Ayrıca çalışmada yer alan klonlardan birinde, kültür başlatma aşamasında petiyolden adventif sürgün gelişimine rastlanmıştır.

Muna ve ark. (1999), yarı bodur kiraz anacı Maxma-14'ün *in vitro* çoğaltım protokolünü geliştirmek üzere yürüttükleri çalışmada; 7-8 yaşlarındaki ağaçlardan alınan sürgün uçları ve lateral tomurcuklar ile kültür başlatmışlardır. Yüze sterilizasyonu için, sabunla ön yıkama ve 0.01 HgCl_2 ile 0.01 Tween-20 içeren solüsyonda 8 dakika bekleterek steril saf suda çalkalama uygulamaları yapılmış, ancak HgCl_2 'ün neden olduğu toksik etkinin oranının 50 'den fazla olduğu bildirilmiştir. NaOCl ve Ca(OCl)_2 'nin arazideki ağaçlardan alınmış eksplantların sterilizasyonunda etkili olmadığı belirtilmiştir. Mikrobiyal bulaşma sorunlarına karşı eksplantlar öncelikle deney tüplerinde bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda kültüre alınmış, 1-2 hafta sonra temiz görünen eksplantlar asıl ortamlara aktarılmıştır. Sürgün çoğaltımına BAP ve kinetinin etkisi incelenmiş, tüm konsantrasyonlarda BAP'ın kinetinden daha başarılı olduğu, en yüksek çoğaltma katsayısının 1 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} IBA içerikli ortamda (ortalama 5.4 sürgün) gerçekleştiği belirtilmiştir. Köklendirme aşamasında tam ve yarım yoğunlukta MS besi ortamının katı ve sıvı formları ile farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları denenmiş ve 0.5 mg l^{-1} IBA ile destekli $\frac{1}{2}$ MS'in sıvı ortamında kök uzunluğu 6.3 cm, kök sayısı 4.9 adet ve köklenme oranının 95 olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Köklendirme aşamasında kullanılan oksinlerden α -Naftalen Asetik Asit'in (NAA) yüksek oranda, IBA'in düşük oranda kallus oluşturduğu görülmüş bu nedenle NAA'in kullanımından vazgeçilmiştir. İndol-3-Asetik Asit'in (IAA) ise hiç kallus oluşturmadığı fakat köklenmede de etkin olmadığı gözlemlenmiştir. Elde edilen köklü

bitkilerin aklimatizasyon işlemleri de başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Sıvı ortamda köklendirilen bitkilerin aklimatizasyonu, katı ortamdakilerden daha başarılı olmuştur.

Grant ve Hammatt (1999), F12/1 kiraz anacı ve M9 elma anacının mikroçoğaltımında sürgün ve kök gelişimi üzerine alt kültür sayısının etkisini belirlemek üzere yürüttükleri araştırmada, başlangıç materyali olarak sürgün uçları kullanmış ve yüzey sterilizasyonunu ticari çamaşır suyunun %10'luk çözeltisinde yapmışlardır. Sürgün çoğaltımı için, içeriğine 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.1 mg^l⁻¹ GA₃, 0.1 mg^l⁻¹ IBA ve 126 mg^l⁻¹ Floroglukinol ilave edilmiş olan modifiye MS besi ortamı kullanılmıştır. Köklendirme için, 3 mg^l⁻¹ IBA ile desteklenen MS besi ortamı kullanılmıştır. Her iki anaçta da, alt kültür süresinin sürgün ve kök gelişimini etkilediği, ancak alt kültür sayısının etkili olmadığı bildirilmiştir.

Theiler-Hedtrich ve Feucht (1985), vişne anaçlarının *in vitro* kültüründe besi ortamı içeriklerinin gelişmeye etkilerini inceledikleri çalışmalarında; tepe tomurcukları içerisinden mikroskop altında çıkarılan 0.3-0.5 mm uzunluktaki eksplantlarla kültür başlatmışlardır. Yarım yoğunlukta makro elementli MS besi ortamına, BAP'ın 0, 0.01, 0.1 ve 1 mg^l⁻¹ konsantrasyonları yalnız olarak ve 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ ya da 100 mg^l⁻¹ myo-Inositol ile kombine olarak ilave edilmiştir. BAP'ın kullanılmadığı ortamda gelişme olmamış, en düşük konsantrasyon olan 0.01 mg^l⁻¹ BAP'lı üç kombinasyonda ise, başlangıç aşamasında iyi sonuçlar alınırken 2. alt kültürde hemen hemen bütün eksplantlar ölmüştür. Kullanılan vişne anacının sürgün uçları için en uygun BAP konsantrasyonunun 0.1-1 mg^l⁻¹ arası olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, kültür başlatma ve ilk alt kültürde kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin, daha sonraki alt kültürlerde de etkisini devam ettirdiği ve gelişmeyi etkilediği bildirilmiştir. Buna göre başlangıçta kullanılan 1 mg^l⁻¹ BAP'lı tüm kombinasyonlar, düşük BAP'lı kombinasyonlara göre, ileriki alt kültürlerde daha yüksek çoğaltma katsayıları sağlamışlardır. En yüksek çoğaltma katsayısı olan 5.7; ilk iki kültürü 1 mg^l⁻¹ BAP, sonraki alt kültürleri 1 mg^l⁻¹ BAP ve 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ içeren ortamdan elde edilmiş, bu uygulamayı 4.3'lük çoğaltma katsayısı ile kültür başlatması ve tüm alt kültürleri 1 mg^l⁻¹ BAP ve 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ içeren ortam izlemiştir.

Borkowska (1985), Schattenmorelle vişne çeşidinin mikroçoğaltımı üzerine yürüttüğü çalışmada, vejetasyon dönemindeki aktif sürgün uçları başlangıç eksplantı olarak kullanılmış ve yüzey sterilizasyonu %0.1 HgCl₂ içerisinde 10 dk çalkalanarak gerçekleştirilmiştir. Kültür başlatma ve sürgün çoğaltımı için 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.1 mg^l⁻¹ NAA ve 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ ile destekli MS besi ortamı kullanılmış, pH otoklavdan önce 5.2-5.3'e ayarlanmıştır. Sürgünlerden 1.5-2.0 cm uzunluğa ulaşanlar köklenmeye alınmış, bu aşamada IBA destekli ½ makro elementli MS besi ortamı kullanılmıştır. Ayrıca Floroglukinol'un 0, 50, 100, 150 mg^l⁻¹ ilavelerinin köklenmeye etkisi de incelenmiştir. Kültürlerin ilk 5 haftasında hızlı bir gelişmenin ve yüksek oranda sürgün oluşumu görüldüğü, sonraki iki haftada durgunluk görüldüğü, yedinci haftadan sonra ise artık yaşlanmanın ortaya çıktığı bildirilmiştir. Köklenmeye alınan sürgünlerin hemen hemen tamamı köklenmiş, bunların sera şartlarına aktarılmasında ise yaşama oranı %85-90'ı bulmuştur. Köklendirme ortamına Floroglukinol ilavesi ile ilgili olarak; farklı çeşitlerin Floroglukinol ile etkileşiminin farklı olabildiği ve buna göre bu vişne çeşidinin sürgünlerinin köklenmesinde etkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Sürgün başına düşen ortalama kök sayısı 4.2 ile 4.8 adet arasında, ortalama kök uzunluğu ise 29.0 mm ile 37.8 mm arasında gerçekleşmiştir.

Dradi ve ark. (1996), 11 farklı *Prunus mahaleb* L. ekotipinin kitlesel *in vitro* çoğaltımı üzerine bir protokol geliştirmek amacıyla yaptıkları araştırmada; başlangıç eksplantı olarak 2 mm uzunluğundaki tomurcuk uçlarını kullanmıştır. Çalışmada, MS, Schenk and Hildebrandt (1972) (SH), QL ve Cheng (1978) besi ortamlarının farklı modifikasyonları ve kombinasyonları ile bitki büyüme düzenleyici ve diğer bileşenlerin değişik dozları denemeye alınmıştır. Başlangıç besi ortamında, 0.5 mg^l⁻¹ BAP, 0.5 mg^l⁻¹ GA₃ ve 0.01 mg^l⁻¹ NAA ile destekli SH makro elementleri ve MS mikro elementleri ile vitaminler kullanılmıştır. Sürgün çoğaltımı için 4 farklı besi ortamı kombinasyonu kullanılmış ve her biri 21 günlük 3 alt kültür yapılmıştır. Sonuçta, SH makro elementleri, MS mikro elementleri ve Cheng vitaminleri ile 0.8 mg^l⁻¹ BAP ve 0.01 mg^l⁻¹ NAA ile hazırlanan besi ortamı diğerlerinden daha öne çıkmış, bu ortamdaki kültürlerde ortalama çoğaltım oranı 3.4 olarak belirlenmiştir. Köklendirme için de 6 farklı besi ortamı kullanılmış, 0.8-3.0 mg^l⁻¹ IBA ile 50 mg^l⁻¹ aktif karbon içeren ortamlarda yeterli köklenmenin sağlandığı, en yüksek köklenme oranının %66 olduğu bildirilmiştir.

Demiral ve Ülger (2008), Gisela-5 kiraz anacının *in vitro* çoğaltılması üzerine yürüttükleri çalışmada, kültür başlatmak için tepe ve yan tomurcuklar kullanılmıştır. Tomurcukların yüzey sterilizasyonu; fungusit çözültisi, farklı NaOCl konsantrasyonları, alkol ve steril su kullanılarak, birkaç aşamada tamamlanmıştır. MS besi ortamının kullanıldığı kültürlerde, sürgün çoğaltma aşamasında BAP ve IBA'nın farklı miktar ve kombinasyonları, köklendirme aşamasında ise farklı NAA konsantrasyonları denenmiştir. Çoğaltım aşamasında en iyi sürgün sayısı 2.9 adet ile 1.0 mg^l⁻¹ IBA + 0.75 mg^l⁻¹ BAP; en iyi sürgün boyu 1.7 cm ile 2.0 mg^l⁻¹ IBA + 1.0 mg^l⁻¹ BAP uygulamalarından elde edilmiştir. En iyi köklenme oranı, %93 ile 6 mg^l⁻¹ NAA uygulamasında saptanmıştır.

Petrevica ve Bite (2003), 5 vişne çeşidini (Tamaris, Latvijas Zemais, Desertnaja Morozovoi, Bulatnikovskaja, Sokoladnica) kullanarak, mikrosürgün çoğalma oranına, sürgün uzunluğu ve köklenme üzerine kısa süreli soğukta bırakmanın (6 hafta +4°C) etkisini değerlendirmişlerdir. Kültür başlatılması, 8-10 yaşlarındaki vişne ağaçlarından alınan apikal ve lateral meristemler ile gerçekleştirilmiştir. Kültür başlatılmasında, MS besi ortamı, 20 gl⁻¹ sukroz, 0.5 mg^l⁻¹ BAP, 0.2 mg^l⁻¹ GA₃ ve 6 mg^l⁻¹ agar kullanılmış ve pH 6.0'a ayarlanmıştır. Çoğaltma aşamasında, MS besi ortamı, 20 gl⁻¹ sukroz, 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.5 mg^l⁻¹ IAA ve 0.3 mg^l⁻¹ GA₃ kullanılmıştır. Köklendirme 20 gl⁻¹ sukroz ve 0.1 mg^l⁻¹ NAA içeren MS ortamında gerçekleştirilmiştir. Soğukta bekletme uygulaması için köklenmiş sürgünler bitki büyüme düzenleyici içermeyen besi ortamına aktararak soğutucuya bırakılmış, 6 haftanın ardından 1 hafta süreyle de karanlıkta bırakıldıktan sonra kökleri kesilip çoğaltma ortamına alınmıştır. Kısa süreli soğukta muhafaza edilen kültürlerin yaşama oranı ve sürgün uzunluğu diğerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Sürgün uzunluğunun artmasının, çoğalma ve köklenmeyi olumlu etkilediği belirtilmiştir. Elde edilen sürgün uzunlukları 11.0-16.4 mm arasında, köklenme oranı %56-95 arasında, ortalama kök sayısı 1.9-3.0 arasında, kök uzunluğu 51.2-67.4 mm arasında değişmiştir. Aklimatizasyonu sağlanan bitkilerde ise, çeşitlere göre %85-100 arasında değişen sonuçların elde edildiği bildirilmiştir.

Đurkovič (2006), yabani kiraz ağaçlarının mikroçoğaltımında etkin ve güvenilir bir metod geliştirmek amacıyla yürüttüğü çalışmada, yaşlı ağaçlardan alınan hafif patlamış aksillar tomurcukları kullanarak kültür başlatmıştır. WPM besi ortamının kullanıldığı çalışmada, BAP ve Thidiazuron'un (TDZ) yalnız kullanımı ve

kombinasyonları ile BAP'a IBA ve NAA ilavesinin etkisi incelenmiştir. BAP'ın yalnız ve IBA/NAA ile kombine kullanıldığı 15 uygulamadan en yüksek çoğaltma oranı (6.3), 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.01 mg^l⁻¹ NAA ilaveli ortamdan alınmıştır. Araştırmacı 0-1 mg^l⁻¹ arasında kullandığı 5 farklı BAP konsantrasyonunda, dozun artmasıyla sürgün sayısının da arttığını, ancak 3 mg^l⁻¹'nin üzerindeki dozlarda sürgünlerin uzamadığını, yapraklarda küçülme ve kıvrılma olduğunu bildirmiştir. Köklendirme için yarım yoğunlukta WPM besi ortamı kullanılmış, farklı IBA dozları ile IBA ve 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit'in (2,4-D) kombinasyonları denenmiştir. En düşük köklenme frekansının %43 olduğu, en iyi köklenmenin 0.3 mg^l⁻¹ IBA ilaveli ortamda %73 olarak tespit edildiği belirtilmiştir.

Gebhardt (1985), Schattenmorelle vişne çeşidinin sürgün ucu kültürleri yoluyla elde edilen sürgünlerinin köklenmesi üzerine oksinlerin etkisini belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada; başlangıç eksplantı olarak 0.1-0.5 mm uzunluğundaki sürgün uçlarını kullanmıştır. Sürgün çoğaltımı aşamasında 1 mg^l⁻¹ BAP ilaveli MS besi ortamı kullanılmıştır. Köklendirme deneylerinde yarım yoğunlukta makro elementli MS besi ortamı kullanılmıştır. Beş farklı uygulama denenmiş; bitki büyüme düzenleyici içermeyen (1), 1 mg^l⁻¹ IBA ilaveli (2) besi ortamları ile 200 mg^l⁻¹ IBA çözeltisinde 3 saniye bekletip bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda kültüre alma (3), 3 gün (4) ve 8 gün (5) IBA'lı ortamda kültüre aldıktan sonra bitki büyüme düzenleyici içermeyen besi ortamına ekim işlemleri uygulanmıştır. En iyi sonuç, 200 mg^l⁻¹ IBA çözeltisinde 3 saniye bekletip bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda kültüre alma uygulamasında görülmüş ve 21 gün sonra eksplant başına 2 mm'den büyük kök sayısı 4.1 adet olarak gerçekleşmiştir.

Sauer (1985), kirazın *in vitro* çoğaltımıyla ilgili olarak yaptığı çalışmada; başlangıç materyali olarak genç dallardaki tepe tomurcuklarından çıkardığı meristemleri kullanmıştır. Sürgün gelişimi için 2 mg^l⁻¹ BAP ve 0.1 mg^l⁻¹ NAA ile desteklenen MS besi ortamı, köklenme aşamasında ise 2 mg^l⁻¹ IAA ilaveli katı ya da sıvı 1/3 yoğunlukta MS besi ortamının kullanıldığı bildirilmiştir. Çalışmada, kiraz kültürlerinin 2 °C sıcaklık ve 50 Lux ışıktaki 6 ay süreyle alt kültüre almadan muhafaza edilebildiği, ancak muhafaza için köklü bitkiciklerin kullanılması gerektiği belirtilmiştir.

Özzambak ve Hepaksoy (1997a), Heimanns Rubinweichsel vişne çeşidinin *in vitro* çoğaltımında, başlangıç materyali olan sürgün uçlarının alındığı mevsimlerin

etkisini karşılaştırmıştır. Yüze sterilizasyonu, birkaç damla Tween 20 ilaveli %2 NaOCl'de 20 dk süreyle yapılmıştır. En iyi sonuç, ilkbahar döneminde 0.5 mg^l⁻¹ BAP + 0.1 mg^l⁻¹ NAA içeren MS besi ortamında başlatılan kültürlerden alınmıştır. Alt kültürlerde sürgün çoğaltımı için 1.0-1.5 mg^l⁻¹ BAP destekli MS besi ortamının ideal olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, 0.5-1 mg^l⁻¹ konsantrasyonunda IAA, IBA ve NAA kullanımı arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır.

Hepaksoy (2004) tarafından, Gisela-5 ve Gisela-6 kiraz anaçlarında sürgün çoğaltımı ve gelişimi üzerine yürütülen çalışmada, Haziran ayında alınan 3-5 cm uzunluğundaki sürgün uçları ile kültür başlatılmıştır. Bütün deneylerde besi ortamı olarak MS kullanılmıştır. Kültür başlatma aşamasında kullanılan 4 bitki büyüme düzenleyici kombinasyonu (BAP, IBA, NAA ve GA₃) arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Alt kültürlerde yeteri kadar sürgün elde edildikten sonra, 1 mg^l⁻¹ BAP sabit olmak üzere, IBA, NAA ve GA₃'ün farklı kombinasyonları kullanılarak hazırlanan 18 besi ortamında oluşan sürgün sayıları ve uzunlukları incelenmiştir. Sonuçta, her iki anacın da *in vitro* çoğaltmaya uygun olduğu, ancak Gisela-6 anacının çoğalma eğiliminin daha yüksek olduğu saptanmıştır. İki anaca ait çoğaltma katsayıları, besi ortamlarına göre 1.0-8.0 arasında değişmiştir. Besi ortamında 1 mg^l⁻¹ BAP ile birlikte IBA veya NAA kullanılması arasında önemli bir farklılık tespit edilememiş, ancak 0.5 mg^l⁻¹ oksin konsantrasyonunun, 0.25 veya 0.1 mg^l⁻¹'a göre daha olumlu sonuç verdiği belirlenmiştir. Genel olarak çoğalma ve meydana gelen yeni sürgünlerin gelişmesi üzerine düşük konsantrasyonda (0.1 mg^l⁻¹) GA₃ etkisi önemli bulunmamış, buna karşılık konsantrasyonun arttırılması (0.25 mg^l⁻¹) halinde çoğalma olumsuz yönde etkilenmiştir. Çalışmada en uygun besin ortamı 1 mg^l⁻¹ BAP + 0.5 mg^l⁻¹ IBA / NAA olarak belirlenmiştir.

Sedlák ve Paprštejn (2008), Karešova ve Rivan kiraz çeşitlerinde sürgün çoğaltımı üzerine yürüttükleri araştırmada, Mart ayında alınan sürgün uçlarını kullanmışlardır. MS besi ortamına BAP (1, 2 ve 4 mg^l⁻¹), TDZ (0.5 ve 1 mg^l⁻¹) ve 2iP (10 mg^l⁻¹) ilave edilerek yapılan deneyde, Rivan çeşidi 2 mg^l⁻¹ BAP içeren ortamda en iyi çoğalmayı (3.0 sürgün/eksplant) göstermiş, Karešova çeşidi ise geniş çaplı bir *in vitro* çoğaltım için kullanılan ortamların hiçbirinde tatminkar sonuç vermemiştir.

Bouzari ve ark. (2009), kiraz x vişne melezlemesiyle elde edilen bodur kiraz anacı PHL-A üzerinde mikroçoğaltım çalışmaları yürütmüşler ve farklı besi ortamları ile büyüme düzenleyicilerin sürgün çoğaltımına etkisini incelemişlerdir. Yazlık sürgünlerin lateral tomurcukları ve sürgün uçlarının kullanıldığı çalışmada, yüzey sterilizasyonu için önce %50 NaOCl 15 dk uygulanmış ancak bulaşma sorunları nedeniyle bu sterilizasyon solüsyonundan vazgeçilerek, %0.01 HgCl₂ + birkaç damla Tween 20 ile 10 dk uygulaması benimsenmiştir. Kullanılan farklı besi ortamları ve büyüme düzenleyiciler arasında, en yüksek çoğaltım oranı (5.4 sürgün/eksplant) 0.5 mg⁻¹ BAP içeren MS besi ortamından elde edilmiş, bunu 0.5 mg⁻¹ BAP içeren Driver ve Kuniyuki (1984) (DKW) (5.3 sürgün/eksplant) ve 1 mg⁻¹ BAP içeren MS (4.5 sürgün/eksplant) besi ortamları izlemiştir. Köklenme oranı bakımından en başarılı ortamlar sırasıyla; bitki büyüme düzenleyici içermeyen DKW (%100), 0.5 mg⁻¹ IBA ilaveli MS (%85) ve bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS (%75) besi ortamları olmuştur. Aklimatizasyon aşamasında bitkilerin iyi köklenmiş olmasının, yaşama oranını yükselttiği bildirilmiştir.

Ružić ve Vujović (2008) tarafından yapılan araştırmada, Lapins kiraz çeşidinin *in vitro* kültürlerinde, sitokinin tip ve konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. Sitokininlerden BAP, 2iP, kinetin ve TDZ'nin 5 farklı konsantrasyonu tek başına veya IBA'nın 3 konsantrasyonu ile kombine edilerek denenmiş ve hepsinde MS besi ortamı kullanılmıştır. Çoğaltım indeksi, aksillar ve lateral sürgün uzunluğu, yaş ve kuru ağırlık gibi parametrelerin incelendiği çalışmada, BAP içeren besi ortamları çoğaltım indeksi ve sürgün uzunlukları bakımından en başarılı sonuçları vermiştir. En yüksek aksillar sürgün uzunluğu (1.9 cm), 1.1 mg⁻¹ BAP + 0.5 mg⁻¹ IBA içerikli ortamdan; en yüksek çoğaltım indeksi (2.8) ise, 1.1 mg⁻¹ BAP + 0.1 mg⁻¹ IBA ilaveli ortamdan elde edilmiştir. TDZ, kinetin ve 2iP içerikli tüm ortamlarda, çok düşük çoğaltım oranları ile birlikte uzun sürgünler ve büyük yapraklar dikkati çekmiştir. Bazı 2iP kombinasyonları ile bütün kinetin kombinasyonlarında köklenme görülmüştür. Araştırmacılar, kiraz kültürlerinin çoğaltım aşamasında kullanılabilecek tek sitokininin BAP olduğu; kinetin ve 2iP'nin ise sürgün uzaması aşamasında ve köklendirme öncesinde kuvvetli sürgün oluşumunu sağlamak için kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Osterc ve ark. (2004), kirazın mikroçoğaltımında kışın uyur haldeki tomurcukların yüzey sterilizasyonu üzerine çalışmışlar, alkol ve dikloroizosiyanürik

asitin sodyum tuzunu (DICA) kullanarak oluşturulan iki sterilizasyon protokolünü karşılaştırmışlardır. Bulaşma oranı ve sürgün gelişimi bakımından, 16.6 gl^{-1} DICA x 15 dk uygulaması diğer protokoldeki %70 alkol x 30 sn, 20.0 gl^{-1} DICA x 20 dk uygulamasından daha başarılı bulunmuştur. Çalışmada MS besisi ortamından yararlanılmış, kültür başlatma aşamasında 1 mgL^{-1} BAP + 0.1 mgL^{-1} IBA + 0.1 mgL^{-1} GA₃; sürgün çoğaltımı aşamasında 0.5 mgL^{-1} BAP + 0.1 mgL^{-1} IBA + 0.1 mgL^{-1} GA₃; köklendirmede ise yarım veya tam yoğunluktaki MS ile 1 mgL^{-1} IBA kullanılmıştır. Kullanılan 3 genotipe ait sürgünlerin materyalin köklenme oranları %75, %100 ve %100; kök sayıları ise 1.7, 4.4 ve 5.2 kök/eksplant olarak belirlenmiştir.

Sedlak ve ark. (2008), P-HL serisi bodur kiraz anaçlarının *in vitro* çoğaltımı üzerine yürüttükleri çalışmada, aktif gelişme halindeki sürgün uçları ile kültür başlatılmıştır. Serinin üç anacında, MS besisi ortamına filtre sterilizasyonu ile ilave edilen 0.2, 0.75, 1.0, 1.5 ve 2.0 mgL^{-1} BAP konsantrasyonlarının etkisi incelenmiş, 1.5 mgL^{-1} 'lik konsantrasyon üç anaçta da en yüksek sürgün sayısını (7.7-10.9 sürgün/eksplant) vermiştir. En yüksek BAP dozunun (2 mgL^{-1}), sürgün çoğalması ve gelişmesine olumsuz etki yaptığı bildirilmiştir. Elde edilen sürgünler 2.5 mgL^{-1} IBA içeren MS besisi ortamında köklendirilmiştir. Araştırmacılar, bakteriyel bulaşmalara karşı antibiyotik (200 mgL^{-1} Cefotaxime) kullanımının etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Günel (2006), Gisela-5 ve Maxma-14 anaçlarının *in vitro* kültürlerinde sürgün çoğaltımı üzerine değişik BAP ve 2,4-D düzeylerinin etkilerini incelediği çalışmada, temel besisi ortamı olarak MS kullanılmıştır. Haziran-Ağustos aylarında alınan sürgünlerin yüzey sterilizasyonu %70 etil alkol x 3 dk, %20 NaOCl (1-2 damla Tween 20) x 20 dk uygulamaları ile yapılmıştır. Sürgün çoğaltma çalışmalarında, 0.25 mgL^{-1} GA₃ sabit olmak üzere, BAP'ın 0.1, 0.5 ve 1.0 mgL^{-1} dozları ile 2,4-D'nin 0.01, 0.1 ve 0.5 mgL^{-1} dozları tek başlarına veya kombine edilerek denenmiştir. Araştırmada sürgün çoğaltımında, BAP'ın hem tek başına düşük dozları (0.1 ve 0.5 mgL^{-1}) hem de düşük dozdaki 2,4-D (0.01 mgL^{-1}) ile kombinasyonları diğer uygulamalara göre daha başarılı bulunmuştur. Ayrıca çoğalma safhasında alt kültür sayısı arttıkça yan sürgün sayısının da arttığı ve üçüncü alt kültürde her sürgünden ortalama 3.3 yan sürgün elde edilebileceği saptanmıştır. Üç alt kültür sonunda en yüksek ortalama sürgün uzunluğu, Gisela-5 anacında (2.7 cm) 0.1 mgL^{-1} BAP içeren ortamdan, Maxma-14 anacında (2.8 cm) 0.5 mgL^{-1} BAP + 0.1 mgL^{-1} IBA içeren ortamdan alınmıştır.

Ružić ve ark. (2000), Gisela-5 kiraz anacının *in vitro* çoğaltımında besi ortamı yoğunluklarının etkisini inceledikleri çalışmada, MS besi ortamının makro elementlerini 2, 1, ½ ve ¼ yoğunlukta kullanmışlardır. Tüm ortamlara 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.09 mg^l⁻¹ NAA ve 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ ilave edilmiştir. Kültür başlangıcından sonra ilk gün, 20. gün ve 40. günde tüm özellikler incelenmiş, kültüre alma süresince dokuların yaş ve kuru ağırlığı artarken, besi ortamının yaş ve kuru ağırlığının azaldığı görülmüştür. Kültüre alma süresince ortamın pH'sı azalmış, daha sonra ½ MS ve ¼ MS ortamlarında az bir artış olmuştur. Gisela-5, en yüksek azot ve fosfor seviyelerine sahip olan 2xMS ve MS ortamlarında en iyi büyüme ve gelişmeyi göstermiştir. En yüksek çoğaltma indeksi, sırasıyla MS (3.5 sürgün/eksplant) ve 2x MS (3.3. sürgün/eksplant) besi ortamlarından alınmıştır.

Erbenová ve ark. (2001), P-HL bodur kiraz anaçlarının ticari olarak *in vitro* üretiminde MS besi ortamına değişik dozlarda BAP ilavesiyle yaptıkları bir çalışmada sürgün çoğaltımı için optimum BAP dozunu 1.5 mg^l⁻¹ olarak tespit etmişlerdir. Sürgün çoğaltım oranının kontrole göre %50 fazla olduğunu ve köklenme safhasında ilave edilen Floroglukinol'ün sürgün gelişimini teşvik ettiğini belirtmişlerdir.

Pevalek-Kozlina ve Jelaska (1987), yabani kirazın (*Prunus avium* L.) *in vitro* hızlı çoğaltımını konu alan çalışmalarında, başlangıç eksplantı olarak apikal ve aksillar tomurcukları kullanmışlardır. Bütün deneylerde modifiye WPM besi ortamı kullanılmış; kültür başlatma, sürgün çoğaltma ve geliştirme aşamalarında 0.5 mg^l⁻¹ BAP, 0.5 mg^l⁻¹ IBA ve 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ içeren besi ortamı başarıyla kullanılmıştır. Sürgünlerin köklendirilmesi 1 mg^l⁻¹ IBA içeren besi ortamında veya 50 mg^l⁻¹ IBA solüsyonuna batırılmak suretiyle sağlanmıştır.

Hammatt ve Grant (1993), F 12/1 (*Prunus avium*), Colt (*Prunus avium* × *Prunus pseudocerasus*) kiraz anaçlarında, yetişkin ağaçlardan aldıkları sürgün uçları ile kültür başlatmışlardır. Bu çalışmada, besi ortamının pH'sının 5.0'a ayarlanması, BAP konsantrasyonunun (0.5 mg^l⁻¹) ve agar miktarının (5.5 veya 6.5 g^l⁻¹) düşük olması, GA₃ kullanılmaması ve besi ortamına 126 mg^l⁻¹ Floroglukinol ilave edilmesi, sürgün çoğaltımını artıran uygulamalar olarak sıralanmıştır.

Zilkah ve ark. (1992), *Prunus avium* ve *Prunus mahaleb* melezi olan üç klon anacın *in vitro* üretimiyle ilgili olarak yaptıkları bir çalışmada, tomurcuklardan kültür

başlatma aşamasında MxM 2 ve MxM 60 klonları için Boxus (1974) ortamının, MxM 46 klonu için Tabachnik ve Kester (1977) (TK) ortamının en iyi neticeyi verdiğini bildirmişlerdir. Sürgün çoğaltımında, Almehdi ve Parfitt (1986) (AP) besi ortamına, 0.2 mg^l⁻¹ BAP ve 0.01 mg^l⁻¹ IBA ilavesiyle MxM 2 klonunda; 6 mg^l⁻¹ BAP ve 0.01 mg^l⁻¹ IBA ilavesiyle MxM 46 klonunda; 0.5 mg^l⁻¹ BAP, 0.2 mg^l⁻¹ GA₃ ve 0.01 mg^l⁻¹ IBA ilavesiyle MxM 60 klonunda en iyi sonuçlar alınmıştır. Sürgün uzamasını teşvik aşamasında, yine AP besi ortamına 0.2 mg^l⁻¹ BAP ve 0.01 mg^l⁻¹ IBA ilave edilerek kullanılmıştır. Köklenme ise, 0.5 mg^l⁻¹ NAA içeren yarı yoğunlukta MS besi ortamında gerçekleştirilmiştir. Köklenmiş mikro sürgünlerin sera ve arazi şartlarında aklimatizasyonu başarıyla tamamlanmıştır.

Ružić ve Cerović tarafından (1998) yürütülen araştırmada, Gisela-5 kiraz anacının doku kültürü ile üretiminde, en iyi sürgün çoğaltımı sağlayacak ve vitrifikasyona neden olmayacak agar tip ve konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Sürgün uçları 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.1 mg^l⁻¹ NAA, 0.1 mg^l⁻¹GA₃ ve 20 gl⁻¹ sukroz içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu besi ortamına farklı marka veya tipte 6 agar çeşidi, 6.0, 6.5 ve 7.0 gl⁻¹ dozlarında ilave edilmiştir. Vitrifikasyon görülmeden optimum sürgün çoğaltımı, 3 agar tipinin (Kalys 575, Kalys 500 ve Sigma) 6.0 gl⁻¹ veya özellikle 6.5 gl⁻¹ konsantrasyonlarında sağlanmıştır. Diğer agar tipleri kullanıldığı zaman vitrifikasyon belirtileri ancak agarın 7 gl⁻¹ olması durumunda azalmıştır. Bütün agar tiplerinde konsantrasyonun artmasıyla birlikte sürgün gelişimi ile yaş ve kuru ağırlık azalmıştır.

Xilogiannis ve ark. (2008), CAB 6P (*Prunus cerasus*) ve SL 64 (*Prunus mahaleb*) kiraz anaçlarının mikroçoğaltım yoluyla elde edilmiş bitkilerinin, fidanlık ve bahçe şartlarındaki performansını araştırmışlardır. Lateral tomurcuklar %2'lik NaOCl ile 20 dk steril edilerek WPM besi ortamında kültüre alınmışlardır. Sürgün çoğaltımında modifiye MS besi ortamı kullanmış, CAB 6P için 0.6 mg^l⁻¹ BAP + 0.01 mg^l⁻¹ NAA; SL 64 için 1 mg^l⁻¹ BAP + 0.01 mg^l⁻¹ NAA ilave edilmiştir. Araştırmacılar, kullanılan bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarının bu anaçların sürgün çoğaltımı için en etkili kombinasyonlar olduğunu ifade etmiştir. Çoğaltma oranlarının, CAB 6P'de 2.5-3.0, SL 64'de 4.0-5.0 olduğu bildirilmiştir. Sürgün uzaması aşamasında da aynı içerikli ortamlar kullanılmış, sadece BAP konsantrasyonları azaltılarak, CAB 6P için 0.3 mg^l⁻¹, SL 64 için 0.5 mg^l⁻¹ kullanılmıştır. Yarı yoğunlukta MS besi ortamında yapılan

köklendirmelerde CAB 6P için 1 mg^l⁻¹ IBA, SL 64 için 2 mg^l⁻¹ IBA ilave edilmiştir. Köklenen sürgünler başarılı bir şekilde seraya aktarılmıştır. Dört kiraz çeşidi ile aşılılarak fidanlık ve bahçe performansları incelenmiş ve her iki anaç da oldukça başarılı bulunmuştur.

Ružić ve ark. (2005), *Prunus* ve *Pyrus* genotiplerinin mikroçoğaltımında farklı karbon kaynaklarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışma, *Prunus* cinsinden Tabel Edabriz kiraz anacı ve Lapins kiraz çeşidi üzerinde yürütülmüş ve 1 mg^l⁻¹ BAP, 1 mg^l⁻¹ IBA ve 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak sukroz, fruktoz, glikoz, sorbitol ve mannitol farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. Sürgün çoğaltma safhasında her 2 genotipte de sorbitol, fruktoz ve glikozun sukroza göre daha etkili olduğu görülmüştür. Genotiplerin köklenme oranı %85–100 arasında değişmiş, Lapins çeşidinde 20 gl⁻¹ sukroz Tabel Edabriz anacı için 20 gl⁻¹ fruktoz konsantrasyonları en iyi bitki kalitesini sağlamıştır.

Fidancı ve ark. (2008), Gisela-5, Maxma-14 ve Tabel Edabriz kiraz anaçlarının *in vitro* hızlı çoğaltım teknikleri üzerine yaptıkları araştırmada, sürgün ucu ve yan tomurcukları kullanarak kültür başlatmışlardır. Yüzey sterilizasyonu %10 NaOCl çözeltisinde 20 dk bırakarak tamamlanmıştır. Araştırmacılar, tomurcukların alınması için en uygun dönemin Nisan sonu Haziran başı arası olduğunu, daha erken dönemde alındığında bulaşma sorunlarının arttığını, daha geç dönemde başlatılan kültürlerde ise sürgün çoğaltımı ve gelişmenin azaldığını belirtmişlerdir. Kültür başlatmak için, MS besin ortamına 0.1 mg^l⁻¹ GA₃, 0.1 mg^l⁻¹ NAA veya IBA, 0.5 mg^l⁻¹ BAP ilave edilerek kullanılmıştır. MS besin ortamına ilave edilen 0, 0.25, 0.50, 0.75 ve 1 mg^l⁻¹ BAP konsantrasyonlarının sürgün çoğaltımına etkisi incelenmiş, üç anaçta da BAP konsantrasyonu yükseldikçe yeni sürgün oluşumunun arttığı ancak vitrifikasyonun görüldüğü bildirilmiştir. En yüksek çoğaltım oranı Tabel Edabriz anacında 9.4 sürgün/eksplant olarak belirlenmiştir. Köklendirme aşamasında MS besin ortamının tam ve ½ yoğunlukları ile IBA ve NAA konsantrasyonları kullanılmış, MS + 1 mg^l⁻¹ IBA kombinasyonunda 3 hafta içinde %95-100 köklenme sağlanmıştır. Köklenen bitkicikler 1:1 torf-perlit karışımına alınarak başarı ile adaptasyonu sağlanmıştır.

Büyükdemirci (2008), Gisela-5 ve Maxma-14 kiraz anaçlarının *in vitro* sürgün çoğaltımı üzerine besin ortamı içeriği ile sukroz, tiamin ve büyüme düzenleyicilerin

konsantrasyonlarının etkilerini incelemiştir. Her iki anacın çoğaltımı için; tam yoğunlukta MS besi ortamı, 30 mg^l⁻¹ sukroz, 6 gl⁻¹ agar ve 25 mg^l⁻¹ thiamin uygun bulunmuştur. Büyüme düzenleyicilerden, Gisela-5 için, 0.5 mg^l⁻¹ BAP + 0.01 mg^l⁻¹ IBA + 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ kombinasyonu; Maxma-14 için, 0.5 mg^l⁻¹ BAP + 0.1 mg^l⁻¹ IBA + 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ kombinasyonu en başarılı uygulamalar olmuştur. Besi ortamının nitrat içeriğinin azaltılması Gisela-5 anacında köklenmeyi olumlu etkilemiştir. En iyi köklenme, Gisela-5'de 0.5-1 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamda, Maxma-14 anacında ise bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda gerçekleşmiştir.

Buzkan ve ark. (1997) tarafından, kiraz anaçlarından *Prunus mahaleb* L., Gisela 1, Damil ve Tabel Edabriz üzerinde meristem kültürü yoluyla hastalıktan arı çoğaltım yapmak üzere yürütülen araştırmada, apikal ve lateral tomurcuklar ilkbahar (Mayıs), yaz (Temmuz-Ağustos) ve sonbahar (Eylül-Ekim) dönemlerinde alınarak kültür başlatılmıştır. Meristemlerden kültür başlatmak için en uygun dönemin bahar dönemi olduğu, yaz döneminde kültürlerin yaşama oranlarının oldukça düşük, bakteriyel bulaşmaların ise çok fazla olduğu belirtilmiştir. En düşük yaşama oranı sonbahar döneminde alınmıştır. Çalışmadaki genotiplerin başarısı büyük farklılık göstermiş, mahlep anacının meristemlerinden %92 oranında canlılık elde edilirken, Gisela 1 anacı çoğalmamış ve birkaç alt kültürden sonra kallus gelişmiştir. Damil anacında ise, eksplantların çoğu kültür başlangıcından 2-3 hafta sonra canlılığını kaybetmiştir. Mahlep sürgünleri 0.5-1.0 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamda başarıyla köklendirilmiştir. Bu aşamada, 0.5 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamda eksplantların %50'si, 1.0 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamda eksplantların %75-85'i iyi bir köklenme göstermiştir.

Ružić ve ark. (2003/4), Camil GM 79 (*Prunus canescens*) kiraz anacının *in vitro* çoğaltımında besi ortamı yoğunluklarının etkisini inceledikleri araştırmada, MS besi ortamının ½, 1 ve 2 yoğunluklarını kullanmışlardır. Bütün besi ortamlarına 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.1 mg^l⁻¹ NAA, 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ ve 20 gl⁻¹ sukroz ilave edilmiştir. Yarım yoğunlukta MS besi ortamında gelişen sürgünlerde daha yüksek yaş ve kuru ağırlık tespit edilmiş ve Ca ile Mg içeriği daha zengin bulunmuştur.

Cerović ve Ružić (1987), Šumadinka vişne çeşidinde mikroçoğaltım çalışmaları yürütmüşler ve kendi kökleri üzerinde hızlı çoğaltımın protokolünü geliştirmeyi amaçlamışlardır. Sürgün çoğaltımı için en başarılı uygulama, 0.5 mg^l⁻¹ BAP, 0.1 mg^l⁻¹

IBA ve 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ ilave edilen MS besi ortamı olmuştur. Köklendirme aşamasında, 10 gün süreyle 1 mg^l⁻¹ IBA ile desteklenen ½ MS besi ortamında ön kültüre alınan sürgünlerin, daha sonra 5-10 gün bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortama alınmasıyla %88 oranında başarı elde edilmiştir. Köklenen bitkicikler sisleme uygulaması altında aklimatize edilmiş ve %90'dan fazlasının yaşaması sağlanmıştır.

Aka-Kaçar ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada, Damil, Edabriz, Gisela-5 ve Maxma kiraz anaçlarının *in vitro* çoğaltılmasında MS besi ortamı kullanılarak farklı jel yapıcıların ve farklı pH seviyelerinin etkileri incelenmiştir. Agar 7 mg^l⁻¹, agarjel 5 mg^l⁻¹ ve phytigel 3 mg^l⁻¹ konsantrasyonda kullanılarak denenmiş ve pH seviyesi 5.0, 5.7 ve 6.2'ye ayarlanmıştır. Büyüme halindeki ağaçların sürgün uçları kullanılarak başlatılan kültürlerde 1 mg^l⁻¹ BAP ile desteklenen MS besi ortamından faydalanılmıştır. Bütün anaçların genel ortalaması dikkate alındığında, en iyi sürgün çoğaltımı agargel'den (5.8 sürgün/eksplant), en yüksek sürgün uzunluğu phytigel'den (2.5 cm) elde edilmiştir. pH seviyeleri sürgün çoğaltımına etkileri farklı olmuş ve en iyi sonuç pH 6.2'de (3.6 sürgün/eksplant) alınmıştır.

Sülüsoğlu ve Çelik (2001), sarı ve kara idris (*Prunus mahaleb* L.) anaçlarında mikroçoğaltım çalışmaları yapmış ve sürgün uçları, farklı BAP (0.5, 1.0 ve 2.0 mg^l⁻¹) ve IBA (0.1, 0.5 ve 1.0 mg^l⁻¹) kombinasyonlarını içeren MS ve WPM besi ortamlarında kültüre alınmıştır. WPM besi ortamı, her iki anaçta da düşük yaşama oranı ve vitrifikasyon nedeniyle başarısız olmuş ve sonraki alt kültürlerde kullanılmamıştır. Sarı idris anacı için en başarılı kombinasyon olan 1 mg^l⁻¹ BAP + 0.5 mg^l⁻¹ IBA'da, yaşama oranı %93, çoğaltma oranı %87 ve sürgün sayısı 1.6 sürgün/eksplant olarak belirlenmiştir. Kara idris ise, 2 mg^l⁻¹ BAP + 0.1 veya 0.5 mg^l⁻¹ IBA'da %100 yaşama oranı, %93 sürgün çoğaltımı ve 1.6 sürgün/eksplant çoğaltma oranı göstermiştir. Yüksek bitki büyüme düzenleyici dozları, özellikle IBA, vitrifikasyon oluşumunu artırmıştır.

Sülüsoğlu ve Çelik (2007), sarı ve kara idris (*Prunus mahaleb* L.) anaçlarının *in vitro* sürgünlerinin köklendirilmesi üzerine yaptıkları araştırmada MS besi ortamını kullanmışlardır. Çalışmada IBA'nın 0, 0.1, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg^l⁻¹ konsantrasyonları denenmiş, kara idris anacında en yüksek köklenme oranı ilk yıl 2 mg^l⁻¹ IBA ilaveli ortamda, ikinci yıl 0.5 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamda (her ikisinde de %79) elde edilmiştir.

Sürgünlerden 0.5 mg^l⁻¹ IBA ilaveli ortamda köklendirilenler daha sağlıklı kökler oluşturmuş ve alıştırma aşamasında 0.1 mg^l⁻¹ (%86) ve 0.5 mg^l⁻¹ (%83) IBA daha yüksek başarı göstermiştir. Sarı idris anacında ise, köklenme oranı her iki yıl 2.0 mg^l⁻¹ dozunda (%81, %92), kök sayısı birinci yıl 0.5 mg^l⁻¹ (4.6 adet), ikinci yıl 2.0 mg^l⁻¹ (3.9 adet) dozunda en yüksek bulunmuştur. Alıştırma safhasında 1.0 mg^l⁻¹ IBA'lı ortamda köklendirilenler en yüksek yaşama oranını (%83) vermiştir.

Fidancı ve ark. (2001), Gisela-5, Maxma-14 ve Tabel Edabriz kiraz anaçlarının *in vitro* hızlı çoğaltım tekniklerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, sürgün ucu ve lateral tomurcukları kullanarak kültür başlatmışlardır. İlk aşamada, 0.5-1.0 mg^l⁻¹ BAP, 0.1 mg^l⁻¹ IBA veya NAA, 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ ile desteklenen MS besi ortamından yararlanılmıştır. Kültür başlatmak için, Nisan sonu - Haziran başı arasındaki dönem en uygun dönem olarak tespit edilmiştir. BAP konsantrasyonu bakımından en iyi sonuç (9 sürgün/eksplant) 1 mg^l⁻¹ BAP'dan elde edilmiştir. Köklenme aşamasında, 1 mg^l⁻¹ IBA ilaveli ½ MS besi ortamında %100 köklenme elde edilmiş ve ortalama kök sayısı 12 adet, kök uzunluğu 3.8 cm olarak belirlenmiştir. Gisela-5 ve Maxma-14 anaçlarında alt kültürler sırasında vitrifikasyon meydana gelmiş ve bu anaçlarda deneyler yürütülememiştir.

Kitin ve ark. (2005), kirazın *in vitro* oluşan sürgünlerinden, normal ve anormal (yassılaştı) olanların histolojik karşılaştırmasını yaptıkları çalışmada; kök çeliklerinin serada geliştirilmesi ile elde edilen 15-25 mm uzunluğundaki sürgünler ile kültür başlatılmıştır. Besi ortamı olarak MS kullanılmış, 0.5 mg^l⁻¹ IBA, 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ ve BAP'ın 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 ve 1.5 mg^l⁻¹ konsantrasyonları ilave edilmiştir. BAP içermeyen ortamdaki kültürler 1 hafta içinde ölmüş, yeni sürgün oluşumu sadece 0.5-1.25 mg^l⁻¹ BAP konsantrasyonları arasında görülmüştür. En yüksek adventif sürgün sayısı (8.9 ± 0.2), 1 mg^l⁻¹ BAP içerikli besi ortamından sağlanmıştır.

Skirvin ve ark. (1979), şeftali, kayısı, vişne ve kirazda sürgün ucundan hızlı çoğaltma amacıyla yürüttükleri çalışmada MS besi ortamını kullanmış ve 2 mg^l⁻¹ BAP ve 0.1 mg^l⁻¹ NAA ilave etmişlerdir. Montmorency vişne çeşidinde az sayıda fakat iyi gelişmiş sürgün elde edilirken, Early Rivers kiraz çeşidinde çok sayıda küçük sürgün oluşmuştur. Çalışmada kullanılan bütün *Prunus* tür ve çeşitlerinde çok sınırlı oranda köklenme sağlanabilmiştir.

Özzambak ve Hepaksoy (1997b), Heimanns Rubinweichsel vişne çeşidine ait mikro sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesi ve aklimatizasyonu ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada; ½ yoğunlukta MS besi ortamı kullanmış ve IAA, IBA ve NAA'nın, 1, 2, 3 ve 4 mg l⁻¹'lik konsantrasyonlarını denemişlerdir. Elde edilen köklenme sonuçları bakımından IAA (%79), IBA (%74) ve NAA (%79) arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. NAA ve IBA'nın sürgün tabanında kallus oluşumuna neden olduğu görülmüş, bu durum bu iki bitki büyüme düzenleyicinin dezavantajı olarak değerlendirilmiştir. Aklimatizasyon aşamasında perlit, ponza, cüruf, torf ve toprak-kum-gübre karışımının etkileri incelenmiş, bu ortamlardaki yaşama oranı sırasıyla %82, %79, %77, %70 ve %40 olarak belirlenmiştir. İnorganik ortamlardaki başarı, su tutma ve havalanma kapasitelerinin yüksek olmasına bağlanmıştır. Bununla birlikte, bu sıralamada sonda kalan iki ortamda, sürgün ve kök gelişimi en yüksek seviyede olmuş ve toprak-kum-gübre karışımında 76.5 mm, torfta 66.6 mm kök gelişimi tespit edilmiştir.

Hepaksoy ve Tanrıseven (2004), Gisela-5 ve Gisela-6 kiraz anaçlarının doku kültürü ile elde edilmiş sürgünlerinin köklendirilmesi üzerine çalışmışlardır. Başlangıçta, Jones ve ark. (1977), Snir ve Erez (1980) ve Hedtrich (1979)'e göre hazırlanan besi ortamlarının kullanıldığı, ancak bu ortamlarda tatmin edici oranda köklenme sağlanamadığı için sonraki deneylerde ½ yoğunlukta MS besi ortamına geçildiği bildirilmiştir. Çalışmada, IBA ve NAA'nın 2 konsantrasyonu tek başlarına ve BAP ilave edilerek denenmiş, ancak bu uygulamalarda sadece %8-33 arasında köklenme elde edilebilmiştir. Kullanılan 9 farklı besin ortamında da yeterli köklenme elde edilememesi nedeni ile ortamlara 2 gl⁻¹ aktif kömür ilave edilerek deney tekrarlanmış, köklenme oranı %25-50 aralığına yükselmiştir. Ayrıca, sürgünlerin dikimden önce, 666 mg l⁻¹ NAA çözeltisine 1 sn batırılması uygulaması yapılmış ve bu sürgünlerde %59 köklenme elde edilirken, kontrol grubunda bu oran %38 olarak belirlenmiştir. Köklü *in vitro* bitkilerin dış ortama aktarılması sırasında torf, perlit, cüruf ve harç kullanılmış ve en iyi ortamın torf olduğu saptanmıştır.

Pedrotti ve ark. (1994), yabancı kirazın mikro sürgünlerinin köklendirilmesine aminoasitlerin otoklavlanmasının etkisini incelemişlerdir. Köklenmeyi uyarmak için 1.1 mg l⁻¹ IBA ilaveli MS besi ortamında 5 gün bırakılan sürgünler, otoklavdan önce veya sonra eklenmiş farklı aminoasitleri içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Kök sayıları

bakımından bütün uygulamalar benzer sonuçlar (9-10 kök/sürgün) verirken, kök uzunlukları farklılık göstermiştir. Besi ortamına ilave edilen 200 mg l^{-1} glutamin, filtre sterilizasyonundan geçirilerek eklendiğinde kökler 48 mm'ye ulaşmış, otoklavlandığında ise sadece 9 mm uzunluğunda kökler elde edilmiştir.

Bozena ve Szczerba (1991), *in vitro* vişne kültürlerinde sürgün çoğaltımına farklı şeker tiplerinin etkisi ve invertaz aktivitesi üzerine çalışmışlardır. Karbon kaynağı olarak sukroz, glikoz ve fruktoz şekerleri ile sorbitol alkol şekeri, geniş bir konsantrasyon aralığında denenmiş ve hepsinde de en uygun dozun %2-3 olduğu belirlenmiştir. Sukroz ve glikoz ilave edilen ortamlarda yüksek çoğaltım oranı elde edilirken, fruktoz içeren ortamda daha uzun sürgünler oluşmuştur.

Franck ve ark. (2004), kirazın *in vitro* kültürlerinde vitrifikasyon sorunlarına ilişkin olarak yaptıkları çalışmada, besi ortamlarında katılaştırıcı olarak kullanılan gelrite ve agar'ın etkileri üzerinde durmuşlardır. Kiraz sürgünlerinde, poliaminler, prolin ve etilenin yüksek miktarlarının vitrifikasyona neden olduğunu belirtmişlerdir.

Vasar (2003), kiraz mikro sürgünlerinin *ex vitro* köklendirilmesi ve aklimatizasyonu üzerine yürüttüğü çalışmada; modifiye MS besi ortamına 1 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} IBA ilave ederek elde ettiği sürgünleri her 2 haftada bir alt kültüre almıştır. *Ex vitro* köklendirme aşamasında %0.3'lük IBA çözeltisi ile sulanan mikro sürgünler farklı dozlarda askorbik asit ve sitrik asit ile muamele edilerek kök ve sürgün gelişimleri incelenmiş, askorbik asitin özellikle düşük konsantrasyonunun (88 mg l^{-1}) sitrik asite göre daha etkin bir şekilde kök ve sürgün ağırlığını artırdığı bildirilmiştir.

Bhagwat ve Lane (2004), Lapins ve Sweetheart kiraz çeşitlerinin yapraklarından sürgün rejenerasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada; başlangıç materyali olarak kullanılan sürgün uçlarını %5.6 NaOCl'de 10 dakika steril ederek, yaklaşık 3 mm'lik kısmı pul ve yapraklardan temizleyerek kültüre almışlardır. Deneylerde 6 ay süren alt kültür çalışmalarının sonunda elde edilen yapraklar kullanılmıştır. Kültür başlatma aşamasında, yaklaşık 0.7 mg l^{-1} BAP ve 30 g l^{-1} sukroz içeren MS besi ortamı kullanılmıştır. Yapraklardan sürgün rejenerasyonu için, başlangıç aşamasında MS besi ortamına göre daha başarılı olduğu gözlemlenen WPM besi ortamı kullanılmış, TDZ ya da BAP ile NAA'in farklı kombinasyonları ile 20 mg l^{-1} sukroz ilave edilmiştir. Tüm bitki büyüme düzenleyicilerde çözücü olarak dimetilsülfoksit kullanılmış ve filtre sterilizasyonu

yapılarak besi ortamının sıcaklığı 55 °C'ye indiğinde ilave edilmiştir. Yapraklardan en iyi rejenerasyon, 0.5 mg^l⁻¹ ya da 1 mg^l⁻¹ TDZ ile 0.05 NAA kombinasyonlarından elde edilmiştir. Sürgün uzaması için 0.7 mg^l⁻¹ BAP ve 0.2 mg^l⁻¹ IBA ilaveli MS besi ortamı kullanılmıştır. Köklendirme aşamasında, mineralleri yarım yoğunlukta olan MS besi ortamına, 0.5 mg^l⁻¹ NAA ve 20 mg^l⁻¹ sukroz ilave edilerek kullanılmıştır. Sweetheart çeşidinde %20, Lapins çeşidinde ise %85 köklenme sağlanmış, aklimatizasyon oranları ise çeşitlerde sıra ile %40 ve %20 olarak gerçekleşmiştir.

Takashina ve ark. (2003) tarafından yürütülen çalışmada, 4 kiraz çeşidinin *in vitro*'da yaprak eksplantlarından çoğaltımı amaçlanmış, kültür başlangıcında sürgün uçlarının kültüre alındığı modifiye MS besi ortamına 126 mg^l⁻¹ Floroglukinol, 0.5 mg^l⁻¹ BAP ve 0.1 mg^l⁻¹ IBA ilave edilmiştir. Deneyde kullanılacak yapraklar, 5 mg^l⁻¹ 2,4-D içeren sıvı WPM besi ortamında bir gün bekletildikten sonra rejenerasyon için 5 mg^l⁻¹ TDZ ilave edilmiş katı WPM besi ortamında kültüre alınmıştır. Benisyuhou çeşidinde, kıvrık yapraklardan sürgün rejenerasyonu (%77) geniş yapraklardakinden (%26) daha yüksek bulunmuş, genç yaprakların rejenerasyona cevabının yaşlı yapraklardan daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Yaprakların 2,4-D içeren ortamda ön kültüre alınmasının, adventif sürgün oluşumunu teşvik ettiği kaydedilmiştir.

Song ve Sing (2005), Montmorency vişne çeşidinin genetik transformasyonu ve sürgün rejenerasyon protokolünün geliştirilmesi üzerine yürüttükleri çalışmada, sürgün ucundan başlatılan kültürlerde stok ortamı olarak 0.5 mg^l⁻¹ BAP, 0.05 mg^l⁻¹ IBA, 20 g^l⁻¹ sukroz ve 6 g^l⁻¹ agar içeren QL besi ortamı kullanılmış ve pH otoklavdan önce 5.2'ye ayarlanmıştır. Yapraklardan sürgün rejenerasyonu için, farklı sıvı ortamlarda ön ıslatma aşamalarından sonra, 3 mg^l⁻¹ BAP, 0.5 mg^l⁻¹ NAA, 40 g^l⁻¹ sukroz ve 6 g^l⁻¹ agar içeren QL besi ortamı kullanılmıştır. Araştırmacılar, ön ıslatma şeklinde tatbik edilen, kısa süreli ve düşük konsantrasyonlu (0.05, 0.1 ve 0.25 mg^l⁻¹) TDZ uygulamalarının, yeni sürgün gelişimini teşvik ettiği belirlenmişlerdir. Köklendirme aşamasında 1 mg^l⁻¹ NAA veya 1 mg^l⁻¹ IBA ilave edilen WPM besi ortamının etkisi incelenmiş, kültüre alınan yeni sürgünler bu aşamada ilk 1 hafta karanlıkta bırakılmıştır. NAA içeren ortamda %73 oranında direk köklenme elde edilirken, IBA'nın kullanıldığı kültürlerde kallustan kök gelişimi sağlanmış ve oran %43 olarak gerçekleşmiştir. NAA'de köklendirilen rejenerantların aklimatizasyon aşamasında yaşama oranı %85 olmuştur.

Grant ve Hammatt (2000), 8 yabancı kiraz genotipi ile F12/1 ve Charger kiraz anaçlarının yapraklarından adventif sürgün gelişimi sağlamak üzere yürüttükleri çalışmada, kültür başlatma aşamasında Hammatt ve Grant (1997)'a göre; 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.1 mg^l⁻¹ IBA ve 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ ve 126 mg^l⁻¹ Floroglukinol ile destekli modifiye MS besi ortamından faydalanmışlardır. Rejenerasyon ortamı olarak 0.1 mg^l⁻¹ NAA ve 1 mg^l⁻¹ TDZ ile desteklenen WPM kullanmışlardır. Besi ortamlarını katılaştırmak için agar 6 gl⁻¹ oranında kullanılmış ve otoklavda sterilizasyon 10 dakika ile sınırlı tutulmuştur. En yüksek rejenerasyon oranı Charger anacından elde edilmiş, yaprak başına ortalama 0.95 adet sürgün alınmıştır. Kirazın yapraktan rejenerasyonunda, başarıyı etkileyen en önemli hususun genotip olduğu bildirilmiştir.

Tang ve ark.(2002), 5 kiraz ve 2 vişne çeşidi üzerinde yürüttükleri yapraktan rejenerasyon çalışmalarında; kültür başlatmak için virüsten âri ağaçlardan alınan lateral tomurcukları kullanmıştır. Kùltürler 1.5 yıl boyunca 1 mg^l⁻¹ BAP ve 0.1 mg^l⁻¹ IBA içeren MS besi ortamında 3 haftada bir alt kùltüre alınmak suretiyle geliştirilmiştir. Yapraktan rejenerasyon için MS, DKW, QL ve WPM besi ortamları, BAP ve TDZ'nin 1-2 mg^l⁻¹ dozları ile NAA ve IBA'nın 0.5-1.0 mg^l⁻¹ konsantrasyonları kombine edilerek denenmiştir. Besi ortamını katılaştırmak için 7 gl⁻¹ agar (Sigma) kullanılmış ve tüm büyüme düzenleyiciler otoklavdan sonra filtre sterilizasyonundan geçirilerek ortama ilave edilmiştir. Deney sonucunda 2 mg^l⁻¹ BAP ve 0.5-1 mg^l⁻¹ NAA ile destekli WPM besi ortamı sürgün gelişimi üzerinde diğer ortamlardan daha başarılı bulunmuştur. BAP'ın TDZ'ye oranla sürgün rejenerasyonunda daha etkili olduğu belirtilmiştir. Elde edilen mikro sürgünlerin geliştirilmesi ve köklendirilmesi farklı içerikli besi ortamları ile 3 alt kùltürden geçirilerek sağlanmıştır. İlk olarak sürgünlerin uzamasını sağlamak için 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.1 mg^l⁻¹ IBA ve 0.5 mg^l⁻¹ GA₃ içeren MS besi ortamında 4 hafta kùltüre alınmış, ardından yine 4 hafta bu ortamın aynısı GA₃ ilave edilmeden kullanılmıştır. Son olarak 3-4 cm uzunluğa ulaşan sürgünler 2 mg^l⁻¹ IBA veya NAA ilaveli MS besi ortamında kùltüre alınarak, doğrudan veya 1 hafta karanlık uygulaması ile büyüme odasına bırakılmıştır. Sonuçta, 2 mg^l⁻¹ IBA veya NAA ile destekli ½ MS besi ortamında yeterli oranda köklenmenin sağlandığı, 1 hafta karanlıkta bekletilen ve doğrudan büyüme odasına bırakılan kùltürler arasında köklenmede bir farklılığın oluşmadığı bildirilmiştir.

Matt ve Jehle (2005), beş kiraz çeşidinde yaprak ve internod eksplantlarından bitki rejenerasyonu üzerine yürüttükleri çalışmada, Aralık ayında virüssüz bitkilerden alınan 1 yaşlı dallar, ilk olarak %1.5 benomil içerisinde 10 dk bekletilmiş ardından %10 Ca(OCl)₂ ile 20 dk sterilize edilmiştir. Tomurcukların pulları temizlenerek içerisinde izole edilen büyüme konisi, sürgün çoğaltımı için 100 mg⁻¹ Fe-EDDHA, 1 mg⁻¹ BAP ve 20 g⁻¹ sukroz ilave edilmiş QL besi ortamında kültüre alınmış ve elde edilen sürgünler aynı ortamda alt kültüre alınarak yaklaşık 4 ay sonra deneylerde kullanılmıştır. Çalışmada, QL, MS, Chee ve Pool (1987) (CP) , WPM ve DKW besi ortamları ve bunların kombinasyonları kullanılmış ve sitokininlerden BAP ve TDZ ile oksinlerden IBA, IAA ve NAA'ın farklı doz ve kombinasyonları denenmiştir. Sürgün oluşumunu teşvik bakımından, besi ortamlarından DKW/WPM kombinasyonu ve QL besi ortamı diğerlerinden daha başarılı bulunmuştur. En iyi sürgün rejenerasyonu genelde TDZ ve IBA kombinasyonundan elde edilmiştir. Adventif sürgün oluşumu yaprak eksplantlarında %11, internodlarda %50 oranında gerçekleşmiştir. İnternod ve yapraklardan rejenerasyon sonucu elde edilen sürgünler, önce sürgün çoğaltım ortamına alınmış, sonra köklenmesi amacıyla 170 mg⁻¹ IAA içeren sıvı ortamda karanlıkta 4 °C'de 1 hafta bekletilerek, bitki büyüme düzenleyici içermeyen ½ MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Sürgünlerden 8 hafta sonra köklenme elde edilmiş, köklenme oranlarının %50-88 arasında değiştiği bildirilmiştir.

Hammatt ve Grant (1998), kara kiraz (*Prunus serotina* Ehrh.) ve yabani kirazda (*Prunus avium* L.) yapraktan sürgün rejenerasyonu konulu çalışmalarında, materyal olarak her iki türe ait çok sayıda farklı genotipleri ve besi ortamı olarak da WPM, DKW ve MS kullanmışlardır. *Prunus serotina* Ehrh. için hem başlangıçta hem de alt kültürlerde modifiye DKW besi ortamı 1 mg⁻¹ BAP ve 0.1 mg⁻¹ IBA ilave edilerek kullanılmıştır. *Prunus avium* L. ve hibritleri için başlangıçta 1 mg⁻¹ BAP, 0.1 mg⁻¹ IBA, 0.1 mg⁻¹ GA₃ ve 126 mg⁻¹ Floroglukinol ile destekli modifiye MS besi ortamından faydalanılmış, sürgün çoğaltımı aşamasında, 0.5 mg⁻¹ BAP, 0.1 mg⁻¹ IBA ve 126 mg⁻¹ Floroglukinol içeren MS besi ortamı kullanılmıştır. Çalışmada bütün genotipler, besi ortamları ve büyüme düzenleyiciler farklı kombinasyonlarda bir araya getirilerek çok sayıda deney yapılmıştır. İki genotipte yapraktan rejenerasyon üzerine TDZ'nin etkisi BAP'dan daha yüksek bulunmuştur. *Prunus serotina* yaprakları DKW

besi ortamına nispeten WPM'da daha başarılı sonuç vermiştir. Yapraktan rejenerasyon oranları aynı türün değişik genotipleri arasında da farklılık göstermiştir.

Schmidt ve Ketzl (1996), melezleme ile elde edilen tohumların düşük çimlenme oranını ve her tohumdan sadece bir bitkinin alınabilmesini, kiraz ıslah çalışmalarında önemli bir sorun olarak görmüşler ve kotiledonlardan adventif sürgün oluşumunun sağlanması için deneyler yapmışlardır. Kiraz çeşitlerinin melezlenmesiyle elde edilen çok sayıda tohum, kabuğundan arındırılıp embriyonik uç çıkarılarak, 2 mg l^{-1} BAP ve 1 mg l^{-1} IAA ilave edilen MS besi ortamında kültüre alınmıştır. İlk sürgün oluşumu 10-14 gün sonra başlamış, sürgünler gelişmeleri için 1000 mg l^{-1} kalsiyum nitrat, 0.5 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} NAA ile destekli MS besi ortamına aktarılmıştır. Köklenme için 500 mg l^{-1} kalsiyum nitrat, 0.5 mg l^{-1} NAA içeren $\frac{1}{2}$ yoğunlukta MS besi ortamına aktarılmıştır. Tohumu kullanılacak meyvelerin olgunlaşma süresi uzadıkça, boş tohum oranının azalıp rejenerasyon oranının arttığı bildirilmiştir.

Canlı ve Tian (2008), 5 kiraz çeşidine ait olgun kotiledonlardan sürgün rejenerasyon çalışmaları yürütmüşlerdir. Temel besin içeriği olarak, 0.5 mg l^{-1} IBA, 25 g l^{-1} sukroz ve vitaminler ilave edilen QL besi ortamı kullanılmış, bu ortama TDZ ve BAP'ın farklı miktarları filtre sterilizasyonundan geçirilerek ilave edilerek denenmiştir. Kotiledonlardan sürgün gelişiminde TDZ, BAP'a göre daha etkin bulunmuştur. Araştırmada en iyi rejenerasyon oranı, TDZ'nin orta seviyedeki konsantrasyonları ($0.8-1.5 \text{ mg l}^{-1}$) ile 10 gün karanlıkta bekletme uygulamasının kombinasyonundan elde edilmiştir. Mikro sürgünlerin uzamasını sağlamak üzere, 0.1 mg l^{-1} IBA, 1 mg l^{-1} BAP ve 30 g l^{-1} sukroz içeren QL besi ortamına tek veya grup halindeki sürgünler aktararak 3 hafta kültüre alınmıştır. Köklendirme için 1.5-2.0 cm uzunluktaki sürgünler, 3 mg l^{-1} IBA veya 1 mg l^{-1} NAA ile 25 g l^{-1} sukroz içeren yarım yoğunlukta MS besi ortamına alınmış ve 1 hafta karanlıkta bırakılmıştır. Çeşitlerden birinde kök oluşumu hiç görülmemiş, diğerlerinde ise köklenme oranı %22 ile %40 arasında gerçekleşmiştir. Çalışmadaki üç kiraz çeşidinde, 1 mg l^{-1} NAA içerikli ortam, 3 mg l^{-1} IBA'lı ortamdaki daha iyi köklenme sağlamıştır. Köklenen bitkicikler küçük saksılara alınmış ve üzeri 1 hafta şeffaf kapak ile kapatılmış, ardından 5 hafta daha büyüme odasında kaldıktan sonra seraya nakledilmiştir. Bu şekilde bitkilerin %80'i dış şartlara alıştılabilmektedir.

Balla ve Brozik (1996), kirazda melezleme ıslahı çalışmalarında hibrit tohumların çimlenmelerinin yetersiz ve gelişmeleri zayıf olmasını önemli bir problem olarak görmüşler ve çözüm olarak embriyo kültürü çalışmaları yürütmüşlerdir. Tohumların yüzey sterilizasyonu %9'luk NaOCl'de 15 dk bırakılarak yapılmıştır. İzole edilen embriyolar deney tüplerindeki modifiye MS besi ortamında kültüre alınarak 120 gün boyunca 4 °C'de muhafaza edilmiştir, bu sürenin sonunda büyüme odasına alınmıştır. Melezleme yoluyla elde edilmiş 11 farklı kombinasyona ait tohumlarda, çimlenme oranları %3 ile %36 arasında değişmiştir.

Mandegaran ve ark. (1999), Colt (*Prunus avium* x *Prunus pseudocerasus*) anacı ile kirazın somatik embriyogenesis kabiliyetleri arasındaki farklılığı irdeledikleri çalışmada, MS besi ortamı kullanılmış, sürgün çoğaltımı için 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.1 mg^l⁻¹ IBA, köklendirme için 0.05 mg^l⁻¹ IBA ve 0.05 mg^l⁻¹ NAA ilave edilmiştir. Çoğaltım oranı kiraz çeşitlerinde 1.4 ± 0.2 ile 3.2 ± 0.8 arasında değişmiş Colt anacında 5.4 ± 2.1 olarak belirlenmiştir. Köklenen sürgün oranı ise, aynı sırayla %23, %64 ve %95 olarak gerçekleşmiştir. Colt anacında somatik embriyo oluşumu için en uygun bitki büyüme düzenleyici kombinasyonunun 0.3 mg^l⁻¹ BAP + 3.3 mg^l⁻¹ 2,4-D olduğu; kiraz çeşitlerinde ise kök ve sürgünlerden embriyogenesis sağlanamadığı sadece zigotik embriyodan düşük oranda elde edilebildiği bildirilmiştir.

Reidiboym-Talleux ve ark. (1999), tarafından, kirazda somatik embriyogenesis üzerine, besi ortamına maltoz ve absisik asit ilavesinin etkilerinin incelendiği çalışmada, çoğaltma ortamı olarak, MS besi ortamına Morel vitaminleri (Morel ve Wetmore, 1951), 250 mg^l⁻¹ glutamine, 2 mg^l⁻¹ glisin, 500 mg^l⁻¹ kazein hidrolizat (CH), 0.1 mg^l⁻¹ NAA, 0.1 mg^l⁻¹ kinetin ve 0.1 mg^l⁻¹ BAP ilave edilerek kullanılmıştır. Çalışmada, beyaz ve yarısaydam olmak üzere iki tip somatik embriyo oluşumu görülmüş, denenen maltoz ve absisik asit kombinasyonlarında hem kullanılan genetik hatlar hem de bu embriyo oluşumları bakımından çok farklı sonuçlar alınmıştır.

Tang ve ark. (2000), ticari öneme sahip Gerema, Scharö ve Schattenmorelle vişne çeşitlerinde yaptıkları somatik embriyogenesis çalışmalarında, henüz olgunlaşmamış meyvelerden alınıp embriyo ucu uzaklaştırılan kotiledonları, uç, orta ve dip kısmı olmak üzere üçe bölerek ayrı ayrı kültüre almışlardır. MS besi ortamı, 30 gl⁻¹ sukroz, 7 gl⁻¹ Sigma agar ve 1 gl⁻¹ CH ile desteklenerek kullanılmış, bitki büyüme

düzenleyicileri otoklavdan sonra filtre sterilizasyonundan geçirilerek ilave edilmiştir. Oksinlerden 2,4-D, NAA ve IBA, sitokininlerden BAP ve kinetin, farklı miktarlarda ve 10 farklı kombinasyonda denenmiş, kültürler deney boyunca karanlıkta bırakılmıştır. Somatik embriyolar ya teker teker veya gurup halinde direk olarak kotiledonlardan ve özellikle de uç parçadan oluşmuşlardır. Gerema ve Schattenmorelle çeşitlerindeki eksplantların sırasıyla %3 ve %2'si embriyonik gelişme göstermiş, Scharö çeşidinde bu oran %0.04 gibi çok küçük bir seviyede kalmıştır. Somatik embriyogenesis, genel olarak 2,4-D ve kinetin kombinasyonlarının kullanıldığı ortamlarda elde edilmiş, 2 mg^l⁻¹ 2,4-D ve 1 mg^l⁻¹ Kinetin içeren ortamların uygun olduğu ortaya çıkmıştır. NAA veya BAP kullanılması somatik embriyogenesis oranını azaltmış, buna karşın, yaprak, sürgün, kök ve kotiledon benzeri yapıların oluşumu artmıştır. Kültür başlatma ortamına 0.1 mg^l⁻¹ IBA ilavesi, somatik embriyogenesisin teşvikinde faydalı olmuştur.

Pruski ve ark. (2005), dünyada kıtalar arası yayılmış, meyvesi yenen ve peyzaj amaçlı kullanılan *Prunus fruticosa* L. (Moğol kirazı - Step kirazı) ve *Prunus tomentosa* L. (Nanking kirazı - Tüylü kiraz) üzerinde yürüttükleri çalışmada; kültür başlatma, sürgün çoğaltımı ve *ex vitro* köklendirme üzerine, büyüme düzenleyicilerin farklı kombinasyonlarının etkilerini incelemişlerdir. Kültür başlatmak için dormant haldeki tepe tomurcukları Aralık ayında alınmış ve %1 Sodyum hipoklorit ile 10 dakika steril edilip 3 mm'lik boyutlarda hazırlanmıştır. Kültür başlatma aşamasında MS besi ortamına 1 ve 2 mg^l⁻¹ BAP ile 0.1 mg^l⁻¹ NAA veya 0.1 mg^l⁻¹ IBA kombinasyonları ilave edilerek denenmiş, BAP'ın iki dozu arasında önemli bir fark bulunmamıştır. BAP'a ilave olarak kullanılan oksinlerden IBA daha başarılı sonuç vermiştir. Sürgün çoğaltımında yine MS besi ortamı BAP'ın 0, 0.5, 1, 2, 5 mg^l⁻¹ ve TDZ'nin 0, 0.1, 0.2, 0.4 mg^l⁻¹ dozlarında ilavesiyle kullanılmıştır. Yapılan analizlerde, BAP konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısı artarken sürgün uzunluğunun azaldığı ve bu durumun yaklaşık 3.4 mg^l⁻¹ seviyesine kadar devam ettiği bundan sonra durumun tersine döndüğü görülmüştür. Ayrıca 5 mg^l⁻¹ BAP uygulamasında yaprak renklerinin koyulaşarak vitrifikasyon belirtisi gösterdiği bildirilmiştir. Her iki tür için de sürgün çoğaltımında BAP'ın 2.0-3.4 mg^l⁻¹ arası dozlarının uygun olduğu belirtilmiştir. TDZ ise sürgün sayısı bakımından etkisiz bulunmakla beraber, düşük konsantrasyonlarda kaliteli sürgünlerin oluşmasını sağlarken, 0.4 mg^l⁻¹ dozda sürgünlerin koyu renkli, kısa boylu kitleler haline

gelmesine neden olmuştur. *Ex vitro* yapılan köklendirmede, IBA/NAA karışımı ($2 \text{ mg l}^{-1}/0.5 \text{ mg l}^{-1}$) %73 köklenme ile en başarılı uygulama olmuştur.

Espinosa ve ark. (2006) tarafından, kara kirazın (*Prunus serotina*) *in vitro* kültürleri yoluyla sürgün rejenerasyonu ve elde edilen sürgünlerin köklenmesi üzerine yapılan çalışmada, başlangıç materyali olarak lateral tomurcuklar 2 cm sürgün parçasıyla birlikte kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonu; %70 alkolde 30 sn, %15 NaOCl'de 20 dk ve steril saf su ile durulama uygulamalarıyla tamamlanmıştır. İlk aşamada 20 g l^{-1} sukroz, 1 mg l^{-1} BAP, 0.1 mg l^{-1} IBA ve 0.1 mg l^{-1} GA₃ ile destekli MS besi ortamına ekilmiştir. Elde edilen sürgünlerin yeni alt kültürlerle çoğaltılması sağlanarak yaprakтан rejenerasyon çalışmalarında kullanılmıştır. WPM besi ortamı, farklı TDZ-NAA kombinasyonları ve karanlık uygulamalarının denendiği çalışmada, en yüksek rejenerasyon oranı (%42) ve en yüksek ortalama sürgün sayısı (4.1 sürgün/eksplant), 0.2 mg l^{-1} NAA + 1.5 mg l^{-1} TDZ kombinasyonundaki yapraklardan elde edilmiştir. Mikro sürgünlerin köklenmesi, 0.5 mg l^{-1} IBA + 0, 7, 14 gün karanlık uygulamaları ile 1 mg l^{-1} IBA + 4 gün karanlık uygulamalarında başarılı olmuştur.

Ainsley ve ark. (2000), badem (*Prunus dulcis* Mill.) yapraklarından sürgün rejenerasyonu üzerine yürüttükleri çalışmada, Nonpareil ve Ne Plus Ultra çeşitlerini kullanmışlardır. Kültür başlatma QL besi ortamında yapılırken, sürgün çoğaltımı aşamasında, bir çeşitte 1 mg l^{-1} BAP ve 0.01 mg l^{-1} IBA ilaveli MS besi ortamı, diğer çeşitte 0.7 mg l^{-1} BAP ve 0.01 mg l^{-1} IBA ilaveli AP besi ortamı kullanılmıştır. Araştırmada, badem yapraklarından rejenerasyona 2,4-D, NAA ve IBA'nın etkisi ile CH, BAP ve TDZ'nin etkisi iki ayrı deneyde çok sayıda kombinasyon kullanılarak yapılmış, besi ortamı olarak AP kullanılmıştır. Deneyde kullanılan oksinlerden, Ne Plus Ultra çeşidinde NAA ve IBA, Nonpareil çeşidinde sadece IBA sürgün oluşumu sağlamıştır. En yüksek rejenerasyon frekansı Ne Plus Ultra için %44, Nonpareil için %6 olarak belirlenmiş ve bu değerler %0.1 CH, 2 mg l^{-1} IBA ve 1.5 mg l^{-1} ya da 5 mg l^{-1} TDZ içeren AP besi ortamından alınmıştır.

Pruski ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada, bir *Prunus virginiana* L. çeşidi olan Garrington ile *Prunus pensylvanica* L. türüne ait Mary Liss ve Jumping Pound çeşitleri üzerinde kültür başlatma, sürgün çoğaltma ve *ex vitro* köklenme denemeleri yapılmıştır. Kış döneminde dinlenme halindeki tomurcuklar kullanılarak

kültür başlatılmış ve yüzey sterilizasyonu; 30 dk musluk suyu, 10 dk %1 NaOCl + %0.1 Tween-20 ve son olarak 3 defa steril saf su uygulamaları ile tamamlanmıştır. Kültür başlatma çalışmalarında, 0.1 mg^l⁻¹ NAA veya IBA, 1 veya 2 mg^l⁻¹ BAP ve 0 veya 10 mg^l⁻¹ GA₃ kombinasyonları denenmiş, her üç çeşitte de 0.1 IBA ve 1 ya da 2 mg^l⁻¹ BAP içeren besi ortamından en iyi sonuçlar alınmıştır. Tüm aşamalarda MS besi ortamının kullanıldığı çalışmada, sürgün çoğaltımı için Garrington çeşidinde 2-3 mg^l⁻¹ BAP, diğer iki çeşitte ise 1 mg^l⁻¹ BAP en uygun konsantrasyon olarak bildirilmiştir. *Ex vitro* yapılan köklendirmede, IBA/NAA karışımı (2 mg^l⁻¹ / 0.5 mg^l⁻¹) %84 köklenme ile en başarılı uygulama olmuştur.

Srinivasan ve ark. (2005), *Prunus* cinsinde yer alan meyve türlerinde, mikroçoğaltım, mikro aşılama, somatik embriyogenesis, organogenesis ve moleküler genetik gibi konularda yapılan çalışmaların bir derlemesini yapmışlardır. Bu konularda, badem, kayısı, kiraz, vişne, nektarin, şeftali ve erik meyve türlerinde yapılan çalışmalardan örnek sonuçlar derlenmiştir. *Prunus* türlerinde mikroçoğaltımın temel olarak virüs eliminasyonu ve anaç çoğaltımı için kullanıldığı, ana çoğaltım materyalinin sürgün ucu ve nodal çelikler olduğu, BAP'ın sürgün çoğaltımı için en sık kullanılan sitokinin olduğu ve uygun konsantrasyonun genotipe göre farklılık gösterdiği, yaşlı bitkilerin çoğaltımının genç olanlara nispeten daha zor olduğu gibi bilgiler verilmektedir.

Cheong ve Pooler (2004), *Prunus incisa* cv. February Pink üzerinde yürüttükleri çalışmada somatik embriyogenesisi etkileyen faktörleri incelemişlerdir. Erken ilkbaharda sürgün uçlarından alınan materyalin yüzey sterilizasyonu, sırasıyla 10 dk musluk suyu, 1 dk %70 alkol, 15 dk %15 ticari çamaşır suyu + %0.01 tween 20 uygulamalarıyla tamamlanmıştır. İlk olarak, 25 g^l⁻¹ sukroz, 0.1 mg^l⁻¹ BAP ve 0.01 mg^l⁻¹ IBA içeren MS besi ortamında kültüre alınmış, elde edilen bitkicikler somatik embriyogenesis deneyleri için kullanılacak kökleri geliştirmek üzere 30 g^l⁻¹ sukroz ve 0.2 mg^l⁻¹ IBA ilaveli MS ortamına nakledilmiştir. Araştırmada somatik embriyo oluşumuna, ışık, bitki büyüme düzenleyiciler, aminoasitler ve karbon kaynaklarının etkisi, yapılan deneylerle belirlenmiştir. Ön denemelerde başarılı bulunan 2.2 mg^l⁻¹ 2,4-D bütün deneylerde standart olarak yer almış ve somatik embriyo gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir. Diğer taraftan BAP, TDZ ve GA₃ ise inhibe edici etki yapmış,

aminoasitler ile ışık/karanlık uygulamaları ise etkisiz bulunmuştur. Karbon kaynaklarından sukroz ve glikoz olumlu, sorbitol ve mannitol olumsuz etki göstermiştir.

Molassiotis ve ark. (2003/4), GF-677 anacının *in vitro* koşullarda üretilen sürgünlerin köklenmesi üzerine, besi ortamına ilave edilen organik (Fe-EDTA ve Fe-EDDHA) ve inorganik (FeCl₃) demir formlarının etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, 30 gl⁻¹ sukroz, 7 gl⁻¹ agar, 0.6 mg⁻¹ BAP, 0.2 mg⁻¹ GA₃ ve 0.05 mg⁻¹ IBA içeren MS besi ortamı kullanılmış, üç demir formunun her biri 3 konsantrasyonda denenmiştir. Fe-EDDHA en iyi sonuç veren demir formu olduğu tespit edilmiş, besi ortamına 87 mg⁻¹ Fe-EDDHA ilavesiyle, köklenme oranı %100, ortalama kök sayısı 7.3 adet, ortalama kök uzunluğu ise 3.8 cm olarak gerçekleşmiştir.

Younas ve ark. (2008), tarafından yürütülen çalışmada, GF-677 anacının sürgün çoğaltımı ve köklenmesine farklı karbon kaynaklarının etkisi incelenmiştir. Sukroz ve glikoz farklı doz ve kombinasyonlarda kullanıldığı deneylerde, 0.6 mg⁻¹ BAP ilaveli MS besi ortamı kullanılmıştır. Denemeye alınan 6 uygulamadan, 15 gl⁻¹ sukroz + 15 gl⁻¹ glikoz kombinasyonu sürgün çoğaltımı için en başarılı uygulama olurken, köklenme aşamasında 20 gl⁻¹ glikoz aynı miktardaki sukroza oranla daha iyi sonuç vermiştir. Kültüre alınan materyalin gelişmesinde karbon kaynağı tipi ve konsantrasyonunun büyük önem taşıdığı vurgulanmıştır.

Marino ve ark. (1991), San Castrese ve Portici kayısı çeşitlerinin *in vitro* çoğaltımı üzerine bazı karbon kaynaklarının ve bitki büyüme düzenleyicilerin etkilerinin incelendiği araştırmada, deneylerde kullanılacak materyali üretmek üzere standart sürgün çoğaltım ortamı olarak, 0.75 mg⁻¹ BAP, 0.05 mg⁻¹ IBA ve 0.1 mg⁻¹ GA₃ ile destekli MS besi ortamı kullanılmıştır. Sürgün çoğaltımı için 0.5-2 mg⁻¹ arasındaki BAP konsantrasyonlarının uygun olduğu ve bu ortamlarda sukroz kullanılmasının gerektiği sonucuna varılmıştır. Ortamda sorbitol kullanılmasıyla lateral sürgün gelişiminin arttığı belirtilmiştir. Sürgünlerin köklendirilmesi aşamasında IBA'nın 0.5-1 mg⁻¹ konsantrasyonlarının uygun olduğu görülmüş, Portici çeşidinde %60, San Castrese çeşidinde ise %80 oranında köklenme elde edilmiştir. Çalışmada sukrozun köklenmeyi teşvik ettiği, sorbitol kullanımının köklenmeyi teşvik etmediği hatta bazen inhibe ettiği ve dolayısıyla bu bitkilerin yaşama oranlarının azalttığı görülmüştür.

Manganaris ve ark. (2003), Armking nektarin çeşidinde termoterapi ve meristem ucu kültürü ile virüs eliminasyonu üzerinde çalışmışlardır. Farklı protokoller kullanılarak hazırlanan meristemler, bitki büyüme düzenleyici içermeyen WPM besi ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün çoğaltımı için aynı besi ortamı, 1.8 mg l^{-1} BAP ve 0.14 mg l^{-1} IAA ile desteklenerek kullanılmış, en yüksek rejenerasyon oranı %38 ile termoterapi uygulamasından sağlanmıştır. Köklendirme aşamasında ise 0.4 mg l^{-1} IBA ile destekli yarım yoğunlukta WPM besi ortamı kullanılmıştır.

Errea ve ark. (2001), aşı uyumsuzluğunu *in vitro* şartlarda tespit etmek üzere yürüttükleri çalışmada, 2 kayısı çeşidi ve 3 anaç kullanmışlardır. Kültür başlatma aşamasında MS besi ortamına 0.1 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} IBA ilave edilerek kullanılmıştır. Sonraki aşamada, kallus oluşumunu teşvik etmek için bu bitki büyüme düzenleyiciler yerine 0.25 mg l^{-1} 2,4-D kullanılmıştır.

Yıldırım (2006), Hacihaliloğlu kayısı çeşidinin *in vitro* organogenesis protokolünü belirlemek üzere yürüttüğü araştırmada, kültür başlatmak için tohum, sürgün ucu ve tomurcuk kullanmıştır. Tomurcuklar, 0.5 - 1.0 cm uzunluktaki boğum arası parça ile birlikte kültüre alınmıştır. Yüzey sterilizasyonunda tohumlar için %5 NaOCl x 15 dk; lateral tomurcuklarda %5 NaOCl x 10 dk; sürgün uçları için %10 NaOCl x 15 dk uygulamaları başarılı bulunmuştur. Kültür başlatma çalışmaları kapsamında; kayısı tohumlarının çimlenmesi bakımından 1 mg l^{-1} BAP'lı ortamda çimlenme oranının %67 olduğu ve ortalama sürgün uzunluğunun 18.0 mm olarak gerçekleştiği görülmüştür. Lateral tomurcuklarla kültür başlatmak için Mayıs-Haziran aylarının uygun olduğu tespit edilmiştir. Sürgün çoğaltım çalışmaları kapsamında; tohum kaynaklı sürgünlerin rejenerasyonu sırasında; 1 mg l^{-1} BAP kullanılmış ve 3.7 ± 0.7 adet sürgün ve 10.7 ± 0.9 mm ortalama sürgün uzunluğu tespit edilmiştir. Lateral tomurcuk kaynaklı sürgünlerin çoğaltımında ise; 1 mg l^{-1} BAP kullanılarak 2.6 ± 0.7 adet sürgün elde edilmiş olup, ortalama sürgün uzunluğu 5.8 ± 0.4 mm olarak bulunmuştur. Sürgün çoğaltımı bakımından her iki materyal tipi için de TDZ ve kinetinin etkili olmadığı görülmüştür. Köklendirme aşamasında, tohum kaynaklı sürgünler 0.5 mg l^{-1} NAA, tomurcuklardan elde edilen sürgünler 2 mg l^{-1} IBA içeren ortamlarda en iyi sonucu vermiş ve her ikisinde %60 oranında köklenme sağlanmıştır. Ayrıca karanlıkta bırakma işleminin köklenme açısından etkili olmadığı sonucuna

varılmıştır. *In vitro* koşullarda çoğaltılan kayısı bitkilerinin aklimatizasyonu için sterilize edilmiş torf kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir.

Pérez-Tornero ve ark. (1999a), dört farklı kayısı çeşidinde meristem ucu kültürü yoluyla *in vitro* sürgün rejenerasyon protokolünü geliştirmek üzere yaptıkları çalışmada, farklı bitki büyüme düzenleyicilerini kullanmışlardır. Tomurcuk pulları temizlenerek hazırlanan meristem uçları, 2 mg^l⁻¹ sorbitol ilaveli QL besi ortamında kültüre alınmıştır, farklı BAP, GA₃ ve IBA konsantrasyonlarıyla oluşturulan kombinasyonlar denenmiştir. Genel olarak içeriğinde BAP olmayan besi ortamlarındaki meristemler yaşamamış, ayrıca besi ortamına 2-4 mg^l⁻¹ GA₃ ilavesinin sürgün uzamasını artırdığı görülmüştür. Canino çeşidinde Aralık ayından Şubat ayına kadar beş farklı dönemde alınan materyallerle yapılan kültürler içerisinde 10 Şubat'ta başlatılan kültür bütün parametreler bakımından en iyi sonuçları vermiştir.

Pérez-Tornero ve ark. (1999b), Canino, Currot, Búlida ve Bergeron kayısı çeşitleri üzerinde, meristem ucundan kültür başlatılması çalışmalarında, farklı büyüme düzenleyicileri ve bunların konsantrasyonları üzerinde denemeler yapmışlar ve tomurcuk dinlenmesi ile kültür başlatma zamanı arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Kullanılacak tomurcukların yüzey sterilizasyonu için, deterjanlı suda yıkama, %70 alkolde 5 dk ve %0.8 NaOCl'de 20 dk uygulamaları yapılmıştır. Tomurcuk pulları temizlenerek hazırlanan meristem uçları, 20 g^l⁻¹ sorbitol ilaveli QL besi ortamında kültüre alınmıştır. Farklı BAP, GA₃ ve IBA konsantrasyonlarıyla oluşturulan 12 bitki büyüme düzenleyici kombinasyonu denenmiş, BAP kullanılmayan ortamlarda başarı sağlanamadığı ve kullanılan GA₃ dozlarının (2-4 mg^l⁻¹) yaşayan sürgün oranında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Kasım ayından Şubat ayına kadar beş farklı dönemde alınan materyallerle yapılan kültürlerde, tomurcukların kabarmaya başladığı son iki dönem en başarılı dönem olarak belirlenmiştir.

Pérez-Tornero ve ark. (1999c), Helena kayısı çeşidinin *in vitro* koşullarda en düşük gelişme şartlarında muhafazası üzerine yaptıkları çalışmada; sürgün çoğaltımı ortamı olarak, 30 g^l⁻¹ sukroz, 0.4 mg^l⁻¹ BAP ve 0.04 mg^l⁻¹ IBA içeren besi ortamı kullanmışlardır. Sürgünlerin muhafazası, karanlık ortamda, 3 farklı sıcaklık (3, 7 ve 14 °C) ve 4 farklı sürede (6, 12, 18 ve 24 hafta) gerçekleştirilmiştir. Deneyin 24. haftasında 3 °C'deki kültürlerin tamamı canlılığını korurken, 14 °C'de muhafaza edilenler 12.

haftadan itibaren hızla canlılıklarını kaybetmiştir. Yine 3 °C'deki sürgünler, soğukta muhafazanın ardından normal sürgün çoğaltım şartlarına bırakıldığında en yüksek rejenerasyon oranı ve sürgün uzunluğunu vermiştir. Çalışmada, Helena kayısı çeşidinin sürgünlerinin, 3 °C'de muhafaza edilmek kaydıyla 6 ay süreyle alt kültür yapmaksızın canlılık ve rejenerasyon kabiliyetinin korunabileceği sonucuna varılmıştır.

Pérez-Tornero ve Burgos (2000) tarafından, Helena, Lorna, Búlida, Canino ve Currot kayısı çeşitlerinin *in vitro* çoğaltım protokolünü geliştirmek üzere yürütülen çalışmada, başlangıç materyali olarak sürgün ucu kullanılmıştır. Besi ortamı denemelerinde standart besi ortamları modifiye edilerek toplam 6 besi ortamının etkisi incelenmiştir. Bu aşamada tüm ortamlarda aynı mikro elementler, vitaminler, 0.4 mg^l⁻¹ BAP ve 0.04 mg^l⁻¹ IBA kullanılmıştır. Sitokin deneylerinde ise BAP'ın 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg^l⁻¹ dozları denenmiştir. Çalışmada besi ortamı ve BAP konsantrasyonunun etkisinin büyük oranda çeşide bağlı olduğu tespit edilmiş, ancak genel olarak en iyi sonuçların QL ve modifiye WPM besi ortamlarından elde edildiği ve en uygun BAP konsantrasyonunun 0.4-0.7 mg^l⁻¹ arasında olduğu belirtilmiştir. MS besi ortamında en fazla sürgün sayısı (3.3 adet) ve en iyi verimlilik (sürgün sayısı x ortalama sürgün uzunluğu) (38.6 mm) Lorna çeşidinden, en yüksek sürgün uzunluğu ise Helena çeşidinden (13.7 mm) elde edilmiştir. Kullanılan tüm ortamların makro elementleri 1/3 oranında, mikro elementleri, organikleri ve vitaminleri 1/2 oranında seyreltilerek köklendirme aşamasında kullanılmıştır. Bu aşamada sukroz 2 gl⁻¹'ye , agar ise 5 gl⁻¹'ye düşürülmüştür. Köklendirme için farklı NAA ve IBA dozları denenmiş, IBA'nın daha etkili olduğu, sürgünlerin köklenmesinde bir problem olmamasına rağmen sürgün uçlarında nekroz görüldüğü ve köklendirme ortamına alınmadan önce sürgünlerin 0.5-1.0 mg^l⁻¹ BAP çözeltisine daldırılması ile bu sorunun çözüldüğü bildirilmiştir. Aklimatizasyon aşamasında ise, 1:1 oranında turba ve perlit kullanarak Helena çeşidinde %71, Lorna çeşidinde %82 oranında bitkinin aklimatizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Pérez-Tornero ve ark. (2000a), Helena, Lorna, Búlida ve Canino kayısı çeşitlerinde yapraklardan sürgün rejenerasyonunu etkileyen faktörleri belirlemek üzere yürüttükleri çalışmada, deneyde kullanılacak sürgünleri çoğaltmak için 0.7 mg^l⁻¹ BAP ve 0.04 mg^l⁻¹ IBA ilaveli QL besi ortamı kullanılmıştır. Sürgünlerin uzamasını sağlamak için de aynı besi ortamı 0.2 mg^l⁻¹ BAP ve 0.04 mg^l⁻¹ IBA ile desteklenerek

kullanılmıştır. Yapraktan rejenerasyon deneylerinde, BAP veya TDZ ile NAA'nın farklı konsantrasyonlarının 26 kombinasyonu denenmiştir. En iyi sonuçlar TDZ bulunan ortamlardan alınmış, BAP içeren ortamlarda çok az rejenerasyon görülmüştür. Yüksek dozda kullanılan NAA'nın önemli bir etkisi, besi ortamına fenolik madde salgısını azaltması olmuştur. Ayrıca, yapraktan adventif sürgün rejenerasyonuna, yaprak eksplantının kaynağı, yaşı, kültür ortamındaki pozisyonu, ışık yoğunluğu, karanlık uygulaması ve genotip gibi faktörlerin etkisi de, bu araştırmada kapsamında incelenmiştir.

Pérez-Tornero ve ark. (2000b), kayısıda farklı besi ortamları ve sitokinin konsantrasyonlarının *in vitro* çoğaltıma etkisini inceledikleri çalışmada, Canino çeşidine ait dinlenme halindeki tomurcuklardan çıkarılan meristem uçları ile kültür başlatmışlardır. Besi ortamı denemelerinde modifiye edilmiş standart besi ortamları yanında yeni bir besi ortamı da kullanılmış, toplam 6 besi ortamının etkisi incelenmiştir. Bu aşamada tüm ortamlarda aynı mikro elementler, vitaminler, 0.4 mg l^{-1} BAP ve 0.04 mg l^{-1} IBA kullanılmıştır. Çalışmada "M3" olarak ifade edilen yeni besi ortamı, standart besi ortamlarına göre daha başarılı bulunmuştur. MS besi ortamında elde edilen sürgün sayısı 2.8 adet, ortalama sürgün uzunluğu 12.4 mm ve verimlilik (sürgün sayısı x ortalama sürgün uzunluğu) ise 32.0 olarak tespit edilmiştir. Sitokinin deneylerinde BAP'ın 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg l^{-1} dozları denenmiş ve yapılan analizlerle $0.5-0.6 \text{ mg l}^{-1}$ konsantrasyonlarının en uygun olduğu belirlenmiştir. Köklendirmeden önce, sürgün uzamasını sağlamak ve sitokinin stresinden kurtarmak için 20 mm uzunluktaki sürgünler 0.2 mg l^{-1} BAP, 1 mg l^{-1} kinetin, 25 mg l^{-1} aktif karbon ve 150 mg l^{-1} Floroglukinol içeren besi ortamında 2 hafta ara kültüre alınmıştır. Köklenme oranı ve sürgün başına kök sayısı bakımından kullanılan IBA ve NAA konsantrasyonları arasında farklılık görülmemiş, ancak kontrole kıyasla tüm oksin uygulamalarının köklenmeyi teşvik ettiği görülmüştür. Köklenme oranları %56 ile %93 arasında değişmiştir.

Pérez-Tornero ve ark. (2001), *in vitro* çoğaltılan Helena ve Lorna kayısı çeşitlerinde çoğaltım kapasitesini düşürmeden, vitrifikasyonun (hiperhidrisiti) kontrol altına alınabilmesini hedefleyen çalışmalarında, Helena çeşidi için QL besi ortamı ile 0.7 mg l^{-1} BAP ve 0.04 mg l^{-1} IBA, Lorna çeşidi için modifiye WPM besi ortamı ile 0.6 mg l^{-1} BAP ve 0.04 mg l^{-1} IBA kullanılmıştır. Besi ortamlarında jel yapıcı olarak

3 agar ve 2 agarjel konsantrasyonu denenmiş, agarın en yüksek konsantrasyonu (8 gl^{-1}) her iki çeşitte, agarjelin iki konsantrasyonu Helena çeşidinde vitrifikasyonu önemli oranda azaltmıştır. Çalışmada ayrıca soğuk uygulamaları ile ışık yoğunluğunun etkileri de incelenmiştir.

Gonzalez Padilla ve ark. (2003), transgenik *Prunus domestica* L. bitkilerinin geliştirilmesini amaçladıkları çalışmada, sürgün rejenerasyon ortamı olarak 1.7 mg l^{-1} TDZ, 0.05 mg l^{-1} IBA ve 20 gl^{-1} sukroz ilaveli $\frac{3}{4}$ yoğunlukta MS besi ortamı kullanmışlardır. Sürgün geliştirme aşamasında aynı ortamda TDZ yerine BAP kullanılmıştır. Transgenik sürgünler 1 mg l^{-1} NAA ve 0.002 mg l^{-1} kinetin içeren $\frac{1}{2}$ yoğunlukta MS besi ortamında %90 oranında köklendirilmiş, aklimatizasyon da %90 yaşama oranı ile tamamlanmıştır.

Gentile ve ark. (2002), farklı şeftali genotiplerinde yapraklardan adventif sürgün oluşumu üzerine yürüttükleri çalışmada, 6 yaşında ağaçlardan alınan tomurcuklarla kültür başlatmışlardır. Çalışmada 3 eksplant tipi kullanılmış, (a) tomurcukların sürmesiyle oluşan sürgünlerden alınan olgun yapraklar, (b) sürgün uçlarındaki yapraklar, (c) adventif sürgünlerdeki yapraklar ile rejenerasyon deneyleri yapılmıştır. Sürgün çoğaltım ortamında QL makro elementleri ile kombine edilmiş MS besi ortamı kullanılmış ve 0.25 mg l^{-1} BAP, 0.025 mg l^{-1} IBA, 0.1 mg l^{-1} GA₃ ve 25 gl^{-1} sukroz ilave edilmiştir. Yapraktan rejenerasyon için, daha çok MS ve QL besi ortamlarının farklı şekillerde kombinasyonundan oluşan ve büyüme düzenleyicilerinin değişik tip ve dozlarının kullanıldığı 5 besi ortamı denenmiştir. Araştırma sonunda, rejenerasyonda kullanılan yaprak eksplantının elde edilme şartlarının önemli olduğu ve petiyol ile birlikte kültüre alınması gerektiği sonuçlarına varılmıştır.

Deogratias ve ark. (1991), Canino kayısı çeşidinde *in vitro* sürgün ucu aşılama tekniği üzerinde çalışmalar yapmışlar, aşıda kullanılan sürgünleri alındığı ana bitkinin optimum fizyolojik devresini ve aşı başarısını etkileyen faktörleri belirlemeyi amaçlamışlardır. Aşılama için kullanılacak sürgün uçları 3 farklı yöntem ile elde edilmiş, (a) kayısı ağaçlarından Kasım-Şubat aylarında alınan dormant tomurcuklar, (b) arazi şartlarında vejetatif gelişme döneminde alınan sürgünler, ve (c) *in vitro* şartlarda elde edilen sürgünler kullanılmış, en iyi sonuç bu üçüncü kaynaktan elde edilmiştir. Aşılama başarısına; kullanılan anaç, sürgün ucunun anaçtaki pozisyonu, sürgün ucu büyüklüğü,

ortamın ışık ve sıcaklık durumu, besi ortamı içeriği, büyüme düzenleyiciler ve soğuk uygulamalarının etkisi de incelenmiştir.

Nowak ve ark. (2004), Weğierka Zwykła erik çeşidinin yaprak eksplantlarından adventif tomurcuk farklılaşması üzerinde çalışmışlar ve besi ortamından şeker alınımını incelemişlerdir. Deneylede kullanılacak yapraklar, 0.5 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} IBA ilaveli MS besi ortamındaki sürgünlerden alınmıştır. Rejenerasyonda karanlık ve fotoperiyotlu aşamalar yer almış ve sukroz ile glikozun beşer farklı konsantrasyonu, 1.65 mg l^{-1} TDZ ve 0.2 mg l^{-1} 2,4-D içeren modifiye MS besi ortamına ilave edilerek denenmiştir. Çalışmada sukroz, glikoza göre daha iyi bir karbon kaynağı olarak öne çıkmış, ayrıca karanlık aşamasında şeker kullanımının daha az olduğu belirlenmiştir.

Morini ve ark. (1991) tarafından, *Prunus cerasifera* popülasyonundan seleksiyon ile elde edilen 7 erik klon anacının mikroçoğaltım kapasitelerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, 1-1.5 cm uzunluğundaki sürgün uçları %15 NaOCl içerisinde 15 dk bekletilerek yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. Sürgün uçları, modifiye MS besi ortamı kullanılarak bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda ön kültüre alınmış, 2 hafta sonra elde edilen sağlıklı sürgünler deneylede kullanılmıştır. Bu aşamada 0.4 mg l^{-1} BAP, 0.15 mg l^{-1} GA₃ ve 0.08 mg l^{-1} IBA ilaveli besi ortamı kullanılmış ve 15 günlük periyotlarla 3 alt kültür yapılmıştır. Deney sonunda elde edilen sürgünler, 1 cm'den küçük, 1-2 cm arası ve 2 cm'den büyük olmak üzere 3 grupta değerlendirilmiş ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı genotiplere göre 20.0 ile 83.3 adet arasında değişmiştir. Köklendirme aşamasında besi ortamına 0.5 mg l^{-1} IBA ilave edilmiş, köklenme oranları %62-83, köklenen sürgün başına kök sayısı ise 3.8-4.8 adet arasında değişmiş ancak klonlar arasındaki bu farklılıklar önemli bulunmamıştır.

Ainsley ve ark. (2001), Ne Plus Ultra, Nonpareil, Carmel ve Parkinson badem çeşitlerinin olgunlaşmamış kotiledonlarından adventif sürgün rejenerasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, açık tozlanan meyveleri tam çiçeklenmeden 100-115 gün sonra toplayarak deneylede kullanmışlardır. Embriyo uzaklaştırıldıktan sonra ikiye bölünen kotiledonlar, TDZ ve IBA'nın farklı doz ve kombinasyonlarda yer aldığı MS besi ortamında kültüre alınmıştır. Çalışmada 8 haftalık kültürlerde en yüksek rejenerasyon oranı 2.2 mg l^{-1} TDZ içeren ortamdan elde edilmiş, ayrıca 0.1 mg l^{-1} IBA'nın adventif sürgün gelişimini olumlu etkilediği belirlenmiştir.

Druart (1991), erik ıslahında *in vitro* kültür tekniklerinin konvansiyonel ıslah yöntemlerini tamamlayıcı olarak kullanılmasına ilişkin olarak yaptığı derlemede, virüsten arı bitki elde etmek için meristem kültürünün önemli olduğunu bildirmektedir. Ayrıca, mikroçoğaltım, embriyo kurtarma, *in vitro* seleksiyon, organogenesis ve somatik embriyogenesis yöntemlerinin, erik üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda öne çıkan konular olduğu bildirilmiştir.

Kamali ve ark. (2001), GF-677 anacının mikroçoğaltım tekniğini geliştirmek üzere yürüttükleri çalışmada, kültür başlatmada kullandıkları apikal ve lateral tomurcukları 6 dk %0.1 HgCl₂ çözeltisinde bırakarak yüzey sterilizasyonunu yapmışlardır. Kullanılan besi ortamlarından modifiye Knop besi ortamı, MS besi ortamına göre daha sağlıklı ve gelişmiş sürgünler vermiştir. Farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA ilave edilerek deneyler yapılmış, BAP'ın en uygun konsantrasyonu sürgün çoğaltımı için 1 mg l⁻¹, sürgün uzaması için 0.1 mg l⁻¹ olarak belirlenmiştir. BAP'ın 1 mg l⁻¹'den yüksek dozlarının vitrifikasyona neden olduğu bildirilmiştir. Köklendirme aşamasında LS besi ortamı kullanılmış ve 0.3 mg l⁻¹ NAA ve 1.6 mg l⁻¹ thiamin içeren ortamda, 7 gün karanlık uygulamasıyla %80'in üzerinde köklenme sağlanmıştır. Besi ortamının yarım yoğunlukta kullanılması ve Floroglukinol seviyesinin artırılması ise köklenmede etkili olmamıştır. *In vitro*dan çıkarırken kullanılan ortamlardan Jiffy-7 hazır fide ortamı, torf-kum karışımına oranla daha başarılı olmuştur.

Kramarenko (1999) tarafından, *in vitro* çoğaltılan bitkilerin arazi performanslarını belirlemek ve kayısının çoğaltımında etkili bir mikroçoğaltım metodu geliştirmek üzere yürütülen çalışmada, kültür başlatma materyali olarak 2-4 çift yaprak taslağı içeren meristemler kullanılmıştır. Çoğaltma aşamasında ilk alt kültürde 1 mg l⁻¹ BAP, sonraki alt kültürlerde 0.1 mg l⁻¹ BAP kullanımının uygun olduğu belirtilmiştir. Köklendirme için farklı IBA konsantrasyonları denenmiş, 10 gün 1 mg l⁻¹ IBA içeren ortamda ve karanlıkta kültüre alınıp ardından bitki büyüme düzenleyici içermeyen besi ortamında ışıklı şartlara bırakılan sürgünler, genotiplere göre %25 ile %100 arası köklenme sağlayarak en başarılı sonuçları vermiştir.

Channuntapipat ve ark. (2003), Nonpareil ve Ne Plus Ultra badem çeşitleri ile bir hibrit anaç (titan bademi x nemaguard) üzerinde geniş kapsamlı olarak yürüttükleri

mikroçoğaltım çalışmalarında, lateral tomurcukları %7 Ca(OCl)₂ + %0.02 Tween 20 çözeltisinde 15 dk steril ederek kullanmışlardır. Kültür başlatmak için QL besi ortamı kullanılmış ve sürgünler 1-2 tomurcuklu halde ortama bırakılmıştır. Çalışmanın başında, denemeye alınan genotipler için uygun besi ortamlarını belirlemek üzere, MS, WPM, AP, TK ve QL besi ortamları denenmiş ve Ne Plus Ultra çeşidi için MS, Nonpareil çeşidi için AP besi ortamı uygun bulunmuştur. Sürgün çoğaltımı için farklı BAP (0, 0.2, 1.1, 2.3 ve 4.5 mg^l⁻¹) ve IBA (0, 0.01, 0.1 mg^l⁻¹) konsantrasyonları ile oluşturulan 15 kombinasyon denenmiş, en başarılı kombinasyonlar, Nonpareil için; AP besi ortamı + 0.7 mg^l⁻¹ BAP + 0.01 IBA + 20 gl⁻¹ sukroz, Ne Plus Ultra için; MS besi ortamı + 1.1 mg^l⁻¹ BAP + 0.01 IBA + 30 gl⁻¹ sukroz, hibrit anaç için; MS besi ortamı + 2.3 mg^l⁻¹ BAP + 30 gl⁻¹ sukroz olarak belirlenmiştir. Hibrit anacın 2 cm'ye ulaşan sürgünleri köklendirmede kullanılmış, IBA'nın 0.3-3.0 mg^l⁻¹ arasındaki 8 konsantrasyonu MS besi ortamında denemiştir. Bunlardan 0.5 mg^l⁻¹ IBA uygulamasından %88 köklenme elde edilmiş, bunun üzerindeki konsantrasyonlarda da yüksek oranda köklenme elde edilmekle beraber aşırı kallus oluşumu görülmüştür. Çalışmada mikro aşılama denemeleri de yapılmış ve ayrıca aklimatizasyonda %92 başarı sağlanmıştır.

Almehdi ve Parfitt (1986) tarafından, Lovell ve NemaGuard şeftali anaçlarının *in vitro* çoğaltımı üzerine yapılan çalışmada, kültür başlatmak için aktif gelişme dönemindeki sürgünler kullanılmış ve yüzey sterilizasyonu %0.79 NaOCl içerisinde 30 dakikada gerçekleştirilmiştir. Sürgün çoğaltımı aşamasında farklı konsantrasyonlarda BAP (0-10 mg^l⁻¹) ve IBA (0-5 mg^l⁻¹) kombinasyonları denenmiş ve 6 mg^l⁻¹ BAP + 0.01 mg^l⁻¹ IBA kombinasyonu en başarılı uygulama olmuştur. Besi ortamı deneylerinde 10 farklı ortam kullanılmış, bütün parametreler bakımından en iyi sonucu bu araştırmacılar tarafından geliştirilen AP besi ortamı vermiştir. Çalışmada AP besi ortamının içeriği de ortaya konmuştur. Bu ortam ve onu takip eden MS besi ortamında sonuçlar sırasıyla; sürgün uzunluğu 30.9-19.6 mm ve yaprak sayısı 18.3-6.6 adet olarak belirlenmiştir. Köklenme aşamasında, 9 mg^l⁻¹ IBA ilaveli ½ yoğunlukta AP besi ortamında %70 oranında köklenme elde edilmiştir. Köklü bitkilerin aklimatizasyonunda %100 başarı sağlanmıştır.

Parfitt ve Almehdi (1986), 56 şeftali ve nektarin çeşidinde, *in vitro* çoğaltım ve sürgün gelişiminin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, AP besi ortamı kullanmışlardır. Sürgün çoğaltımı için besi ortamına 6 mg^l⁻¹ BAP ve 0.01 mg^l⁻¹ IBA

ilave edilmiştir. Çeşitlerin sürgün sayıları 1.3-9.9 adet arasında, sürgün uzunlukları 13.4-19.1 mm arasında değişmiştir. Çalışmada, şeftali ve nektarin çeşitlerinde klonal çoğaltım ve sürgün ucu kültürleri için AP besi ortamının iyi sonuç verdiği ve farklı genotiplerin *in vitro* kültürlerinin büyüme düzenleyici gereksinimlerinin de farklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Sotiropoulos ve Fotopoulos (2005), şeftali x badem melezi olan PR 204/84 anacının mikroçoğaltım çalışmasında, sürgün uzamasına BAP, GA₃ ve aktif kömürün etkisini 2 deney ile incelemiştir. İlk deneyde; BAP'ın 0.02 ve 0.06 mg l⁻¹ konsantrasyonları ile GA₃'ün 0, 0.01, 0.1 ve 1 mg l⁻¹ konsantrasyonları kombine edilerek denenmiş, kombinasyonlar arası istatistiksel fark görülmemiş ancak 0.02 mg l⁻¹ BAP + 0.01 mg l⁻¹ GA₃ uygulamasında sürgünlerin kalitatif ve kantitatif özellikleri daha yüksek bulunmuştur. İkinci deneyde; GA₃'ün 0.01 ve 0.1 mg l⁻¹ konsantrasyonları ile bu defa aktif karbonun 50, 100 ve 250 mg l⁻¹ konsantrasyonları kombine edilmiş ve bütün ortamlara 0.02 mg l⁻¹ BAP ilave edilmiştir. Bu uygulamalar arasında önemli bir farklılık bulunmamış sadece bazı kombinasyonlarda sürgün ve yaprak kalitesinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Fotopoulos ve Sotiropoulos (2004), PR 204-84 şeftali anacının *in vitro* köklenmesi üzerine deneyler yapmışlar ve besi ortamına farklı tip ve dozda eklenen karbon kaynakları ile deney tüplerinin izolasyonunda kullanılan malzemelerin etkilerini incelemiştir. Deneylerde 1 mg l⁻¹ IBA ilaveli MS besi ortamı kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak kullanılan sukrozun 30 g l⁻¹ ve glikozun 16 mg l⁻¹ (her ikisinde de 88 mM) dozlarında %100 köklenme elde edilmiş, ortalama kök sayıları ise sırasıyla 8.0 ile 10.8 adet/sürgün olarak belirlenmiştir. Deney tüplerinin kapatılmasında kullanılan parafilm, kauçuk, pamuk ve alüminyum folyonun köklenmeye etkilerinin incelendiği deneyde kültürün 24. gününde pamukta %58 köklenme elde edilirken diğer üç materyalde bu oran %100 olmuştur. Diğer parametreler bakımından da pamuk en başarısız izolasyon malzemesi olarak belirlenmiştir.

Koubouris ve Vasilakakis (2006), Bebecou kayısı çeşidinin *in vitro* kültürlerinin sürgün çoğaltımı ve köklendirilmesini etkileyen şartlar üzerinde yaptıkları çalışmada, Nisan ve Mayıs aylarında aldıkları sürgünleri kullanarak kültür başlatmışlardır. Yüzey sterilizasyonu için, alkol ve NaOCl farklı kombinasyonlarda uygulanarak denenmiş ve

en yüksek yaşama oranı (%62.5), %70 alkolde 1 dk + %0.75 NaOCl'de 15 dk uygulamasından elde edilmiştir. Çalışmada, soğukta bekletme, büyüme düzenleyicilerden BAP, IAA ve GA₃, antibiyotikler, kültür kapları ve alt kültür sistemlerinin sürgün çoğaltımına etkisi ile NAA ve IBA'nın köklenmeye etkisi incelenmiştir. Tüm deneylerde Balla çoğaltım ortamı (Balla ve Vertesy, 2001) kullanılmış, soğukta bekletme deneyinde en uzun süre olan 300 saatte en yüksek sürgün çoğaltımı sağlanmış (18,7 sürgün/eksplant) ve antibiyotik (Na-cefotaxime) uygulaması 250 mg^l dozunda etkili olurken çoğaltım oranını çok az düşürmüştür. Büyüme düzenleyici deneylerinde, 4 mg^l GA₃'ün 1 veya 2 mg^l BAP'a ilavesinin olumlu etki yaptığı, sürgün uzunluğu bakımından 0.5 mg^l BAP + 4 mg^l GA₃ + 0.1 mg^l IAA kombinasyonunun (2.7 cm), verimlilik bakımından 0.5 mg^l BAP + 0.1 mg^l IAA kombinasyonunun (24.6 cm) en başarılı uygulamalar olduğu belirlenmiştir. Köklendirme aşamasında IBA (2, 4, 6 mg^l) ve NAA (0.5, 1, 2 mg^l) konsantrasyonları denenmiş, kontrol hariç tüm uygulamalarda %90-100 arası köklenme oranı elde edilirken, en yüksek kök sayısı (8.1 kök/eksplant) 2 mg^l IBA içeren besi ortamından sağlanmıştır.

Antonopoulou ve ark. (2005), GF-677 anacının *in vitro* köklendirilmesi üzerine farklı riboflavin konsantrasyonlarının etkisini inceledikleri çalışmada; köklendirme ortamı olarak 1 mg^l IBA ilaveli MS besi ortamı kullanmışlardır. Deneylerde, 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg^l riboflavin konsantrasyonları kullanılmış, dozun artmasıyla birlikte köklenme oranının azaldığı görülmüş, en yüksek doz olan 2 mg^l'de köklenmenin tamamen inhibe olduğu tespit edilmiştir. En yüksek iki konsantrasyonda, sürgün uçlarında nekroz ve sararma meydana gelmiştir. Riboflavin içermeyen kontrol grubunda, köklenme oranı %100, ortalama kök sayısı 5.6 adet ve ortalama kök uzunluğu 5.2 cm olarak tespit edilmiştir.

Yıldırım ve ark. (2007), Hacihaliloglu kayısı çesidi için *in vitro* kosullarda embriyo çimlendirme protokolü geliştirmek üzere yürüttükleri çalışmada, büyüme düzenleyicilerinin ve karbon kaynaklarının tip ve konsantrasyonları ile karanlıkta bekletme uygulamasının etkilerini incelemişlerdir. İzole edilen embriyolar, serada normal şartlarda ve *in vitro* tam tohum yapılan çimlendirmelere göre daha yüksek çimlenme göstermiştir. Büyüme düzenleyici deneyinde, BAP, kinetin, IAA, NAA ve 2,4-D, 1 mg^l konsantrasyonda kullanılmış ve en yüksek çimlenme oranı ve sürgün

uzunluğu BAP'dan elde edilmiştir. Çalışmada, sukrozun denenen 6 dozu içerisinde 30 gl^{-1} uygulaması en yüksek çimlenme oranı (%100) ve sürgün uzunluğunu (14.0 mm) vermiş, tamamen karanlıkta bekletilen embriyolar ışıklı ortamdakilere oranla daha uzun sürgünler oluşturmuş, çimlenme oranları her iki uygulamada da %100 olarak belirlenmiştir. Bütün bitkiler toprak-torf karışımı içerisinde başarıyla aklimatize edilmiştir.

Andreu ve Marín (2005), Adesoto 101 (*Prunus insititia* L.) anacının *in vitro* çoğaltımında eksplant kaynağının ve kültür ortamı içeriğinin etkisini belirlemek üzere yürüttükleri çalışmada, lateral tomurcukların yüzey sterilizasyonunu %0.05 HgCl₂ kullanılarak 15 dk süreyle yapmışlardır. Çalışmada, MS, WPM ve QL besi ortamları, 1.1 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} IBA ilave edilerek kullanılmıştır. Yapılan 9 alt kültürden sonra, QL besi ortamında MS ve WPM besi ortamlarına göre çok daha az sürgün elde edilmiştir. Kültür başlatmak için, mikroçoğaltım yapılan sürgünlerin kullanılmasının ağaçlardan alınan çeliklere göre daha başarılı olduğu belirtilmiştir.

Özkaynak ve Samancı (2005), mikroçoğaltım çalışmalarında alıştırma safhasını ayrıntılı olarak ele alan bir derleme yapmışlardır. Bu derlemede *ex vitro* koşullarda alıştırma sırasındaki fotosentez, su ilişkileri ve yaprak yapısı üzerinde durulmuş ve alıştırma aşamasının hızlandırılması için bitki yaşamasını sağlamanın yolları değerlendirilmiştir. Bitkiler henüz *in vitro* aşamada iken, ortama CO₂ ilavesi, havalandırılmalı kültür kabı, sukrozsuz besi ortamı, ışık şiddetinin artırılması, soğutma gibi uygulamalar yanında, *ex vitro* aşamada, ortam şartlarının bilgisayarlı sistemlerle kontrolü, koruyucu maddelerin kullanılması, farklı ışık ve CO₂ yoğunlukları gibi uygulamalar ele alınmıştır.

Arıcı (2008), sert çekirdekli meyve anaçlarından Myrobolan 29C, Maxma-14, Maxma 60, GF-677 ve GN anaçlarının sürgün uçları ve yan sürgünleri kullanılarak doku kültürü çoğaltma olanakları araştırmıştır. Çalışmada MS besi ortamı kullanılmış ve büyüme düzenleyicilerden 1 veya 2 mg l^{-1} BAP, 0.02 veya 0.2 mg l^{-1} NAA ve 0.5 mg l^{-1} GA₃ kullanılarak oluşturulan 8 kombinasyon denenmiştir. Kültüre alınan anaçlar tüm bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarında çok hızlı bir gelişim göstermiş, ortamlar arasında istatistiki bir fark oluşmamıştır. Besi ortamında bulunan 1 ve 2 mg l^{-1} BAP'ın, kullanılan anaçlarda sürgün oluşumunu ve gelişimini teşvik ettiği,

0.02 mgL⁻¹ NAA içeren ortamda rejenerasyon sonucu oluşan bitkilerin daha iyi büyüdüğü belirtilmiştir.

Fotopoulos ve Sotiropoulos (2005), PR 204-84 şeftali anacının *in vitro* sürgün gelişimi ve köklenmesi üzerine büyüme düzenleyicilerin etkisini inceledikleri çalışmada 3 deney yapmışlardır. İlk olarak BAP'ın 0, 0.09, 0.45, 0.90, 1.80 mgL⁻¹ ve 2-iP'in 0, 0.04, 0.2, 0.4, 0.8 mgL⁻¹ konsantrasyonları kullanılmıştır. BAP'ın konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı olarak sürgün sayısı artmış, 1.80 mgL⁻¹ BAP'ta 7.6 sürgün/eksplant'a ulaşmıştır. Ancak sürgün uzunluğu için bunun aksi söz konusu olmuştur. 2-iP içeren ortamlarda ise sürgün sayısı 1.3 ile 1.5 sürgün/eksplant arasında kalmıştır. İkinci deneyde BAP'ın 3 dozu ile NAA veya IBA'nın 4 dozu kombine edilerek 24 farklı besi ortamı kullanılmıştır. Hem NAA hem de IBA'nın konsantrasyonu arttıkça sürgün çoğaltma oranının azaldığı görülmüş ve tüm parametreler birlikte değerlendirildiğinde kullanılan anacın sürgün çoğaltımı için en başarılı uygulamanın oksin içermeyen 0.45 veya 0.90 mgL⁻¹ BAP olduğu bildirilmiştir. Son deneyde tam ve yarım yoğunlukta MS besi ortamı ile IBA'nın 4 konsantrasyonu kombine edilmiş, bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda hiç köklenme olmazken, IBA'lı ortamların biri hariç hepsinde %100 köklenme sağlanmıştır. Köklü bitkilerin seraya aktarılmasında yaşama oranı %84 olmuştur.

Marín ve Marín (1998), kök kültürü başlatmak üzere yürüttükleri çalışmada, sert çekirdekli anaçlarından Adafuel, Adarcias, A843, Marianna 2624 ve Myrobalan 605AD kullanmışlardır. Deneylerde kullanılacak materyalin çoğaltımı için 1 mgL⁻¹ BAP ve 0.1 mgL⁻¹ IBA ilaveli MS besi ortamı kullanılmış, köklendirme aşamasında ise aynı ortam yarım yoğunlukta kullanılmış ve bu defa sadece 1 mgL⁻¹ IBA eklenmiştir. Çalışmada, sıvı besi ortamı, agarla katılaştırılmış ortama göre; sukrozun %3 oranında kullanımı, daha yüksek oranlara göre; MS besi ortamının tam yoğunlukta kullanılması, ½ ve ¼ yoğunluklarına göre; kök gelişmesinde daha başarılı bulunmuştur. En uygun karbon kaynağının sukroz olduğu, besi ortamına ilave edilen hindistancevizi suyu, kazein hidrolizat ve arpa özünün kök gelişimine etkilemediği bildirilmiştir.

Ning ve ark. (2007), peyzaj amaçlı olarak kullanılan *Prunus mume* türüne ait 6 çeşitte mikroçoğaltım çalışmaları yapmışlar, kültür başlatmak için lateral tomurcukları kullanmışlardır. WPM ve farklı yoğunluklardaki MS besi ortamları ile TDZ, BAP, IBA,

NAA ve 2,4-D'nin farklı dozları kombine edilerek denenmiş, ortalama sürgün sayıları 2.4-5.4 arasında bulunmuştur. Köklendirme aşamasında kullanılan kombinasyonlarda, köklenme oranı ve kök sayısı bakımından en iyi kombinasyonlar; WPM + 1 mg^l⁻¹ IBA (%94, 5.3 adet), ½ MS + 0.5 mg^l⁻¹ IBA (%86, 2.9 adet), ½ MS + 1 mg^l⁻¹ IBA (%85, 3.1 adet) olmuştur.

Katano (1987), *Prunus jamasakura*'nın çoğaltımı üzerine yürüttüğü araştırmada, gelişme halindeki sürgünlerin veya tomurcukların 1 mm uzunluğundaki sürgün uçlarını kullanmıştır. Kültür başlatmak için MS veya Gamborg's (1966) besi ortamı ile, 1, 3 veya 10 mg^l⁻¹ BAP; sürgün çoğaltım aşamasında Gamborg's besi ortamı ile 1 mg^l⁻¹ BAP kullanılmıştır. Kültür başlangıcında kullanılan MS besi ortamındaki eksplantlardan hiçbiri gelişmemiş, 1 mg^l⁻¹ BAP içeren Gamborg's besi ortamında ise eksplantların %81'i gelişmiştir. Köklendirme için 0.2 mg^l⁻¹ IBA kullanılmış ve köklenen bitkiler başarı ile saksıya aktarılmıştır.

Canlı ve ark. (2008), sert çekirdekli meyve türlerinde gen transferi alanındaki gelişmeler ve eğilimleri konu alan derlemesinde; farklı *Prunus* türlerinin yaprak, olgunlaşmamış kotiledon, olgun depolanmış kotiledon, gövde parçaları ve hipokotiller gibi farklı dokularından rejenerasyon protokolleri geliştirildiğini bildirmiştir. Ayrıca, *Prunus* türlerinde rejenerasyon kabiliyetinin kullanılan doku tipi tarafından kuvvetli derecede etkilendiğini, genellikle yaprak ve gövde parçalarının tohum kaynaklı dokulara göre daha güç rejenere olduğunu, tüm *Prunus* türlerinde başarı sağlayan ortak bir besi ortamının bulunmadığını ancak QL tuzlarının rejenerasyonda daha iyi sonuçlar verdiğini belirten çalışmalar bulunduğunu ifade etmiştir.

Ertürk (2000), sert kabuklu meyve türlerinin doku kültürü ile üretim olanakları üzerine yaptığı derlemede, odunlu bitkilerin doku kültürü ile üretiminde en önemli problemlerin; mikroorganizmalarla bulaşma, fenolik oksidasyon ve dış koşullara alıştırmadaki kayıplar olduğunu belirtmiştir. Ortamdan ve eksplantlardan gelebilecek bulaşmayı önlemek için çok iyi bir sterilizasyon prosedürü oluşturulması gerektiğini bildirmiştir. Eksplant ölümlerine, doku ve ortamda kararmalara neden olan fenolik bileşiklerden korunmak için, kültür ortamlarına antioksidant (Potasyum siyanit, askorbik asit, sistein, thiourea, polivinil prolidon) ilave edilmesi yada eksplantların antioksidantlarla yıkanması, kültür başlangıcında ışık yada karanlık uygulamaları, eksplantların sık sık taze

ortama aktarılması gibi yöntemlerin kullanıldığını ifade etmiştir. Meyve türlerinin, otsu bitkilerle karşılaştırıldığında dış koşullara alıştırılmasının oldukça zor olduğu ve bu aşamada ortamın nem, sıcaklık ve ışık durumu, gübreleme ve hastalıkların kontrolü gibi konuların önem kazandığı belirtilmiştir.

Gürel ve Gülşen (1998) tarafından, Texas ve Nonpareil badem çeşitlerinin sürgün ucu kültürü ile *in vitro* çoğaltma olanakları üzerine yürütülen araştırmada; mikroçoğaltımın farklı aşamalarında IBA ve BAP'ın farklı konsantrasyonlarının etkisi test edilmiştir. Çalışmadaki bütün deneylerde MS besi ortamı kullanılmış; sukroz, ilk iki aşamada %5 üçüncü aşamada %3 oranında ilave edilmiştir. İlk olarak kültür başlatma aşamasında bitki büyüme düzenleyici içermeyen veya sadece düşük düzeyde IBA (0.1 mg l^{-1}) içeren ortamların daha uygun olduğu belirlenmiştir. Diğer iki aşamada ise, 0.1 mg l^{-1} IBA ile 1.0 mg l^{-1} BAP kombinasyonu sürgün verimi ve gelişmesi bakımından en iyi sonuçları vermiştir. Yüksek konsantrasyonda (2.0 veya 3.0 mg l^{-1}) BAP içeren ortamların vitrifikasyona ve kallus oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir.

Çelik (2008), klonal anaç genotiplerinin *in vitro* koşullarda bazı *Prunus* türleriyle aşı tutma oranlarının saptanması üzerine yürüttüğü tez çalışmasında, anaç olarak AK-1, AK-2 ve GF-677 badem x şeftali melez anaçlarını, çeşit olarak da Francoise şeftali, Ferragnes badem ve Ninfa kayısı çeşitlerini kullanmıştır. Kültür başlatma ve sürgün çoğaltımı aşamalarında 1 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} GA₃ ilaveli MS besi ortamı kullanılmış, Mayıs ayında alınan sürgünlerin yüzey sterilizasyonu %70'lik etil alkol x 4 dk, %20 NaOCl (birkaç damla Tween 20) x 5 dk uygulamaları ile yapılmıştır. Denemeye alınan genotilerdeki canlılık oranları yukarıdaki sıra ile %50, %25, %38, %1, %85, %1 olarak belirlenmiştir. Sürgün çoğaltımında Ak-2 anacı 8 sürgün/eksplant, Ak-1 anacı 3 sürgün/eksplant, GF-677 anacı 2 sürgün/eksplant, Ferragnes badem çeşidi 3 sürgün/eksplant vermişlerdir. Ferragnes çeşidi ile yapılan aşılmalarda anaçların aşı tutma oranları Ak-1 için %25, Ak-2 için %34, GF-677 için %25 olarak tespit edilmiştir.

Demirkök (2006) tarafından yapılan araştırmada, ana ebeveyni Nonpareil badem çeşidi olan AK-1 ve AK-2 badem x şeftali tesadüf melezlerinin, özellikleri bilinen GF-677 anacı ile çoğalma ve köklenme yetenekleri bakımından *in vitro* koşullarda karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bütün deneylerde MS besi ortamı Fe-NaEDTA ile

birlikte kullanılmış, yüzey sterilizasyonu %70 etil alkol x 4 dk, %20 NaOCl (1-2 damla Tween 20) x 5 dk uygulamaları ile yapılmıştır. Sürgün uçlarındaki büyüme konisi ve 2-3 yaprak taslağı kalacak şekilde yaklaşık 0.5-1.0 mm büyüklüğünde hazırlanarak kültüre alınmıştır. Kültür başlatma ve sürgün çoğaltımı aşamalarında 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ sabit olmak üzere 0, 0.5, 1.0 ve 1.5 mg^l⁻¹ BAP konsantrasyonları, köklendirme aşamasında ise yine 0.1 mg^l⁻¹ GA₃'e ilaveten 0, 0.5, 1.0 ve 1.5 mg^l⁻¹ IBA konsantrasyonları denenmiştir. Kültür başlangıcında besi ortamına ilave edilen BAP önemli bir etki yapmış, BAP'ın her üç konsantrasyonunda genotiplerin hepsinde %100 canlılık görülürken bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda genotipler %40-65 arasında canlı kalabilmişlerdir. Sürgün çoğaltımı bakımından, bitki büyüme düzenleyici uygulamalarından 1.5 mg^l⁻¹ BAP (üç genotip ortalaması 2.4 sürgün/eksplant), genotilerden AK-1 (dört BAP uygulamasının ortalaması 2.4 sürgün/eksplant) en başarılı sonuçları vermişlerdir. En yüksek köklenme oranı (%44) AK-1 genotipinin 1 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamdaki kültürlerinden alınmıştır. IBA konsantrasyonları arasındaki farklılık kontrol gurubu hariç önemsiz bulunmuştur.

Rogalski ve ark. (2003a), *Prunus* anaçlarından Capdeboscq ve GF-677 ile seleksiyonla elde edilmiş VP411 ve VP417 genotiplerinin *in vitro* köklendirilmesi üzerine yürüttükleri çalışmada, IBA'nın 0.1, 0.5, 1.0 ve 2 mg^l⁻¹ dozları denenmiştir. Araştırmacılar, 2-3 cm uzunluğundaki sürgünleri Lepoivre besi ortamında (Quoirin ve ark. 1977) kültüre almışlardır. Köklenme oranı ve kök sayısı bakımından, Capdeboscq anacı en yüksek değerleri vermiştir. En başarılı sonucu veren 1.0 mg^l⁻¹ IBA ilaveli besi ortamında, Capdeboscq, GF-677 ve VP411 anaçlarında sırasıyla %100, %64 ve %64 köklenme elde edilmiş; VP417 anacı ise %64'lük en yüksek köklenme oranını 2 mg^l⁻¹ IBA seviyesinde vermiştir. Ortalama kök sayıları bakımından genotiplerin tepkileri IBA konsantrasyonuna göre farklılık göstermiş, Capdeboscq (9.6 adet) ve GF-677 (5.2 adet) anaçları 2 mg^l⁻¹ dozunda, VP411 genotipi (4.2 adet) 0.5 mg^l⁻¹ dozunda ve VP417 (3.9 adet) ise 1 mg^l⁻¹ IBA içeren besi ortamında en yüksek kök sayısına ulaşmıştır.

Alderson ve ark. (1987), *Prunus tenolla* 'nın Firehill çeşidinin *in vitro* sürgün ucuyla çoğaltımı üzerine çalışmışlar ve MS besi ortamını kullanmışlardır. Besi ortamına 1 mg^l⁻¹ BAP ilavesinin aksillar sürgün oluşumu teşvik ettiği, ancak sürgünlerde nekroz ve vitrifikasyon meydana geldiği bildirilmiştir. Eksplantların yüzey sterilizasyonu sırasında girdiği stres koşullarından ve besi ortamındaki yüksek BAP konsantrasyonundan dolayı

vitrifikasyon meydana geldiği ifade edilmiştir. Elde edilen sürgünler, hem oksin içermeyen hem de oksin ilaveli besi ortamlarında köklendirilebilmiştir. Bu aşamada kullanılan NAA kalın köklere ve kallus oluşumuna neden olurken; oksinsiz ya da IBA ilaveli besi ortamından normal kalınlıkta kökler elde edilmiştir.

Lauri ve ark. (2001), kayısı, badem, şeftali ve erik türlerinde, sürgün uçlarından rejenerasyon protokolü geliştirmek üzere yürüttükleri çalışmada; 2 mg^l⁻¹ BAP, 0.2 mg^l⁻¹ NAA ve 250 mg^l⁻¹ cefotaxime ilave edilen besi ortamındaki kültürler 30 gün karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu sürgünler oksinsiz ve 0.5 mg^l⁻¹ GA₃ içeren ortama transfer edilmiştir. Yapılan histolojik çalışmada, M55 bademinde kallustan adventif sürgün oluşumu gözlemlenmiştir.

Silva ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada, *Prunus* anaçlarından Capdeboscq ve GF-677 ile seleksiyonla elde edilmiş VP411 genotiplerinin *in vitro* çoğaltım potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kültür başlatma aşamasındaki yaşama oranlarını incelemek üzere 0.5 mg^l⁻¹ BAP ve 20 gl⁻¹ sukroz ilaveli Lepoivre ortamı kullanılmıştır. Apikal ve lateral tomurcukların yüzey sterilizasyonu %70 etil alkol x 1 dk, %1.25 NaOCl x 15 dk uygulamaları ile yapılmıştır. Üç genotipin ortalama yaşama oranları apikal tomurcuklarda %63, lateral tomurcuklarda %59 olarak belirlenmiş, kültürlerde sırasıyla %15 ve %30 oranlarında kontaminasyon görülmüştür. Çoğaltım oranlarının, Capdeboscq için 14.7 sürgün/eksplant, GF-677 için 10.5 sürgün/eksplant ve seleksiyon VP411 için 16.0 sürgün/eksplant olduğu, ortalama sürgün uzunluklarının ise sırasıyla 9.3, 8.9 ve 7.8 mm olarak belirlendiği bildirilmiştir.

Rogalski ve ark. (2003b), Capdeboscq, GF-677 ve seleksiyonla elde edilmiş VP411 ile VP417 *Prunus* anaçlarının *in vitro* kültürlerinin aklimatizasyonu üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Sürgünlerden 2-3 cm uzunluğa ulaşanlar köklendirmeye alınmış ve 20 gl⁻¹ sukroz içeren Lepoivre besi ortamına IBA'nın 0.1, 0.5, 1.0 ve 2 mg^l⁻¹ dozları ilave edilerek denenmiştir. Aklimatizasyonda, strafor viol ve "Plantmax" isimli hazır ticari ortama dikilen bitkicikler, cam kapaklı plastik kutular içerisine alınarak alıştırma ortamına bırakılmıştır. Kullanılan IBA konsantrasyonları, genotipler ve her ikisi arasındaki interaksyon istatistiki olarak önemli bulunmuş, dört genotipin genel ortalaması dikkate alındığında en yüksek yaşama oranları, IBA'nın 0.5 mg^l⁻¹ (%66) ve 0.1 mg^l⁻¹ (%65) dozlarında köklendirilen bitkilerden elde edilmiştir. Bununla beraber,

genotipler tek tek ele alındığında en iyi yaşama oranı %92 ile Capdeboscq anacında 1 mg l^{-1} IBA içeren ortamdaki bitkilerden alınmıştır. IBA'nın konsantrasyonunun 2 mg l^{-1} 'ye çıkarılması, bütün genotiplerde yaşama oranını azaltmış ve sürgünlerin taban kısımlarındaki kallus oluşumu yaşama oranını olumsuz etkilemiştir.

Teixeira ve ark. (2004), Carelli şeftali anacının *in vitro* çoğaltımını üzerine yaptıkları çalışmada, farklı BAP konsantrasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Lateral tomurcuklar ile başlatılan kültürlerde Lepoivre besi ortamı kullanılmış ve 0, 0.5, 1, 2 ve 4 mg l^{-1} BAP konsantrasyonları denenmiştir. İncelenen parametreler bakımından kontrol gurubunun dışında önemli bir farklılık görülmemiştir. Kullanılan dört BAP dozunda, çoğaltım oranları 3.3-3.4 sürgün/eksplant arasında; sürgün uzunlukları 6.6-11.0 mm arasında değişmiştir. Kontrol gurubunda yeni sürgün oluşumu söz konusu olmazken sürgün uzunluğu en yüksek (16.2 mm) seviyeye çıkmıştır. Çalışmada, BAP konsantrasyonu ile sürgün uzunluğu ters orantılı olarak değiştiği, en uygun konsantrasyonun 1 mg l^{-1} olduğu ve bunun üzerindeki dozlarda vitrifikasyon görüldüğü bildirilmiştir.

Rogalski ve ark. (2003c), Santarosa erik çeşidinin *in vitro* çoğaltımına BAP konsantrasyonlarının etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, 0.5, 1, 2 ve 3 mg l^{-1} BAP konsantrasyonları denenmiş, en yüksek çoğaltım oranı (3.6 sürgün/eksplant) 2 mg l^{-1} BAP'dan elde edilmiş ancak uygulamalar arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır. Sürgün uzunluğu bakımından önemli farklılık bulunmuş, en iyi sonuçlar sırasıyla 0.5 mg l^{-1} (6.0 mm) ve 1 mg l^{-1} (5.5 mm) konsantrasyonlarından elde edilmiştir.

Silveira ve ark. (2001), *Prunus* anaçlarından GxN₂₂, GF-677, Mr.S 2/5, Marianna ve Myrabolan'ın lateral tomurcuklarından başlatılan kültürlerde, farklı BAP seviyeleri ve besi ortamı yoğunluklarının etkilerini incelemişlerdir. BAP'ın 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.7 mg l^{-1} konsantrasyonları ile MS besi ortamının tam ve $\frac{3}{4}$ yoğunlukları kombine edilerek kullanılmış, genotiplerin bu kombinasyonlarda gösterdikleri performanslar da farklı olmuştur. GxN₂₂ ve Mr.S 2/5 anaçları $\frac{3}{4}$ MS besi ortamında başarılı bulunurken, Marianna anacı en iyi sonucu tam MS ve 0.7 mg l^{-1} BAP kombinasyonunda vermiştir. Myrabolan anacında BAP konsantrasyonunun artmasıyla sürgün uzunluğu azalmış ve en başarılı sonuçlar $\frac{3}{4}$ MS ve 0.5 mg l^{-1} BAP kombinasyonundan elde edilmiştir. GF-677 anacından alınan sonuçlar mikroçoğaltım için yeterli bulunmamıştır.

Murai ve ark. (1996), üç *Prunus mume* çeşidinde *in vitro* sürgün çoğaltımı ve köklendirilmesi üzerinde çalışmışlar ve 3 deney yürütmüşlerdir. İlk olarak, Ichinotani çeşidinde BAP, Zeatin ve N-(2-Kloro-4-pyridil)-N''-Fenil Üre (CPPU) sitokininlerinin 3 konsantrasyonu denenmiş, sürgün çoğaltımında 1.1 ve 2.3 mg^l⁻¹ BAP uygulamaları en başarılı bulunmuş, Zeatin etki göstermemiş, CPPU çok az etkili olmuştur. Sürgünlerin uzatılmasında BAP ve Zeatin başarılı olmuştur. İkinci deneyde, 3 çeşide ait kültürler üzerinde karbon kaynağı olarak sorbitol, sukroz ve glikoz denenmiş, yaşama oranı ve sürgün çoğaltımında sorbitol, sürgün uzamasında glikoz daha etkili olmuştur. Son olarak, yine 3 çeşitte köklendirme deneyleri yapılmış, kullanılan 0, 1 ve 2 mg^l⁻¹ IBA dozlarından Ichinotani çeşidinde 1 mg^l⁻¹, diğer iki çeşitte 2 mg^l⁻¹ dozları köklenme oranı ve kök sayısı bakımından daha başarılı bulunmuştur. Ayrıca, 1 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamda yapılan 10 gün karanlıkta bekletme uygulamasında, kontrol gurubuna göre daha yüksek köklenme oranı ve kök sayısı elde edilmiştir.

Murai ve ark. (1997), Bakuoh junkyou kayısı çeşidinde yürüttükleri mikroçoğaltım çalışmasında, 1 mm uzunluğundaki sürgün uçlarını kullanarak kültür başlatmışlar ve farklı besi ortamları ve sitokininlerin etkilerini incelemişlerdir. Dormant haldeki lateral tomurcukların yüzey sterilizasyonu %70 etil alkolde 2 dk ve Tween 20 damlatılmış %1 NaOCl'de 25 dk uygulamaları ile yapılmıştır. Besi ortamı deneyinde WPM, B5, MS ve ½ MS ortamları 0.5 mg^l⁻¹ BAP ilave edilerek kullanılmış ve WPM ortamı hem yaşama oranı (%100) hem de sürgün uzunluğu (9.9 mm) bakımından en iyi sonuçları vermiş ve sonraki deneylerde bu ortam kullanılmıştır. MS besi ortamındaki sürgünlerde, birkaç alt kültürden sonra kuruma ve vitrifikasyon görülmeye başlanmıştır. Kültür başlatma aşamasındaki diğer deneyde, BAP, CPPU, 2iP ve Zeatin sitokininleri 0.5 mg^l⁻¹ konsantrasyonda kullanılarak karşılaştırılmış ve BAP en uygun sitokinin olarak belirlenmiştir. Sürgün çoğaltımı için besi ortamına BAP, 2iP ve Zeatinin 0.5, 1 ve 3 mg^l⁻¹ konsantrasyonları ilave edilerek denenmiş, sürgün sayısı bakımından BAP belirgin şekilde daha etkili bulunmuş ve 1 mg^l⁻¹ dozunda bir eksplanttan ortalama 6.3 sürgün elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu açısından 2iP ve Zeatin daha öne çıkmıştır. Köklendirme deneyinde IBA'nın 0, 0.2 ve 0.4 mg^l⁻¹ konsantrasyonları denenmiş, kontrol gurubunda köklenme olmazken, 0.4 mg^l⁻¹ dozunda %53.3 köklenme oranı ve 2.3 adet/sürgün kök elde edilmiştir. Alt kültür sayısı arttıkça köklenme kabiliyeti de artmış ve 20. alt kültürden sonra %87'ye ulaşmıştır.

Marino ve ark. (1993), San Castrese ve Portici kayısı çeşitlerinin sürgün çoğaltımı ve köklenme kapasitelerinin test edildiği çalışmada, modifiye MS besisi ortamını kullanmışlardır. Karbon kaynağı olarak 20 gl^{-1} sukroz ve 22 gl^{-1} sorbitol kullanılarak etkileri karşılaştırılmıştır. Her iki çeşidin sürgün çoğaltımı BAP ve sorbitol konsantrasyonları ile orantılı olarak artmış, ancak 2 mg l^{-1} BAP dozunda özellikle sukrozlu besisi ortamında vitrifikasyon görülmüştür. Sorbitol, sürgün çoğaltımı ve uzaması bakımından daha başarılı bulunmuştur. IBA ve sukroz içeren ortamda köklendirilen bitkiciklerin %70'i, dikimden önce %0.075'lik benomil çözeltisine batırılarak başarı ile aklimatize edilmiştir.

Ahmad ve ark. (2003) tarafından yürütülen araştırmada, GF-677 anacının mikroçoğaltımında farklı besisi ortamları ve büyüme düzenleyicilerin etkileri incelenmiştir. MS ve Anderson (1984) besisi ortamları ile BAP'ın 0.3 , 0.6 ve 0.9 mg l^{-1} konsantrasyonları denenmiş, sürgünlerin çoğaltılması, uzaması ve gelişmesi bakımından MS besisi ortamı daha başarılı bulunmuştur. Anderson besisi ortamındaki sürgünler hem zayıf kalmış, hem de sararma ve vitrifikasyon görülmüştür. Çalışmada, 2 cm 'den büyük sürgün sayısı en fazla 0.6 mg l^{-1} BAP içeren besisi ortamından elde edilmiştir. BAP'ın en yüksek konsantrasyonunda kallus oluşumu ve apikal nekrozlar görülmüştür. Köklenme aşamasında en başarılı ortam, 3 mg l^{-1} IBA ilaveli yarım yoğunlukta MS besisi ortamı olmuştur. Daha yüksek (4 mg l^{-1}) IBA dozunda kallus gelişmiş ve normal kök oluşumunun inhibe olduğu bildirilmiştir.

Hammerschlag ve ark. (1987), şeftalide 8 çeşit ve 1 anaç üzerinde yürüttükleri mikroçoğaltım çalışmasında, en başarılı sürgün çoğaltımının 2 mg l^{-1} BAP içeren ortamda gerçekleştiğini bildirmişlerdir. En iyi köklenme, yarım yoğunlukta MS besisi ortamına bırakılan sürgünlerin karanlık ortamda $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 35-40 gün bekletildikten sonra köklenme ortamına alınarak yine karanlıkta $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 14 gün bırakılması ile elde edilmiştir. Aynı konsantrasyonda ($5-6 \text{ mg l}^{-1}$) kullanılan IAA, IBA ve NAA arasında en iyi köklenme NAA uygulamasından alınmıştır. Köklendirme ortamındaki NAA konsantrasyonu 5 kat azaltılarak 1 mg l^{-1} 'ye indirildiğinde çoğu genotipte köklenme oranının yükseldiği belirtilmiştir.

Ambrozic Turk ve ark. (1992), erik (*Prunus domestica*) ekotipi olan "Bistrica" üzerinde yürüttükleri mikroçoğaltım çalışmasında, düşük BAP konsantrasyonlarının

daha etkili olduğunu ve en iyi sürgün çoğaltımının 0.25 mg^l⁻¹ BAP ve 0.1 mg^l⁻¹ IBA içeren MS besi ortamında gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Besi ortamına 0.05 veya 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ ilave edilmesi, sürgün sayısı ve uzunluğu üzerinde olumlu bir etkisi yapmamıştır. Sitokinin olarak 2iP kullanılması durumunda hemen hemen hiç yeni sürgün gelişmemiş fakat iyi bir sürgün uzaması gerçekleşmiştir.

Harada ve Murai (1996), *Prunus mume*'de lateral tomurcuklardan sürgün çoğaltımı üzerine yaptıkları çalışmada, MS ve WPM besi ortamlarının etkilerini incelemişlerdir. En uygun besi ortamı, 0.2-1.1 mg^l⁻¹ BAP ve 30 gl⁻¹ sorbitol ilaveli WPM olarak belirlenmiştir. Çalışmada farklı karbon kaynaklarının etkisi de incelenmiş ve glikoz sürgün çoğaltımında sukroz, fruktoz ve sorbitolden daha etkili bulunmuştur. Sukroz içeren besi ortamında sararmalar görülmüş ve sürgünlerin gelişmesi zamanla azalmıştır. En yüksek köklenme oranı, yaklaşık 0.2 mg^l⁻¹ NAA ile desteklenmiş WPM ortamında elde edilmiştir. Aklimatizasyon aşaması, sisleme kullanılarak yapıldığı halde yaşama oranı %20-30 arasında gerçekleşmiştir.

Hokanson ve Pooler (2000), süs bitkisi olarak kullanılan 8 *Prunus* türünün olgun tohumlarından adventif sürgün gelişimi ve kallus oluşumu üzerine çalışmışlardır. Farklı embriyo parçaları ve BAP, TDZ, 2,4-D, IBA ve NAA'den oluşan 9 bitki büyüme düzenleyici kombinasyonu denenmiş, ancak aynı genotip içinde bu uygulamaların etkileri küçük farklılıklar göstermiştir. Çalışmada yer alan türler arasında ise önemli seviyede fark görülmüştür. *Prunus virginiana* ve *Prunus serrula* türlerinde embriyoların yaklaşık %20-50'si sürgün oluştururken, bu oran *Prunus maackii* türünde %5-30 arasında kalmış, diğer türlerde ise hemen hemen hiç sürgün elde edilememiştir.

Miguel ve ark. (1996), bademde yürüttükleri yapraktan rejenerasyon çalışmalarında genç ve olgun eksplantların etkilerini incelemişlerdir. Mart ayında alınan 5-6 cm uzunluğundaki sürgünler, 2-3 sn %70 alkolde, 30 dk %10 Ca(OCl)₂ çözeltilinde bırakılarak yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır. MS besi ortamı, modifiye QL besi ortamına göre adventif sürgün gelişiminde daha etkili bulunmuştur. Yapraktan sürgün gelişimi için TDZ + oksin (IBA, IAA, 2,4-D) kombinasyonları başarılı olmuş, TDZ yerine BAP kullanıldığında hiç sürgün oluşmamıştır. Eksplant olarak genç yapraklardan kullanıldığında TDZ'nin daha yüksek konsantrasyonlarına gerek duyulmuş ve daha iyi bir rejenerasyon oranı (%38-40) elde edilmiştir.

Tricoli ve ark. (1985), *Prunus serotina*'nın *in vitro* mikroçoğaltım çalışmalarında, ilkbahar başlangıcında kabarmaya başlayan tomurcukları kullanmışlardır. Kültür başlatma ve sürgün uzatma aşamalarında 1 mg l^{-1} BAP, 0.1 mg l^{-1} IBA, 0.1 GA_3 ve 20 gl^{-1} sukroz ile desteklenen MS besi ortamı kullanılmıştır. Sürgünler daha sonra 0.75 mg l^{-1} BAP, 0.1 mg l^{-1} IBA, 0.2 GA_3 ve 30 gl^{-1} sukroz içeren MS besi ortamı alınmış ve her 3-4 haftada bir 5 kat sürgün çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Mikro sürgünler 1 mg l^{-1} IBA ilaveli MS besi ortamında köklendirilmiş, sürekli karanlıkta bırakmanın köklenmeyi teşvik ettiği belirtilmiştir.

Pascual ve Marin (2005), yaprak eksplantlarından sürgün ve kök rejenerasyonuna 2,4-D uygulamalarının etkisini inceledikleri araştırmada, beş farklı *Prunus* anacını kullanmışlardır. Deneylerde kullanılan materyal, 1 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} IBA içeren modifiye DKW besi ortamında geliştirilmiş kültürlerden alınmıştır. Yapraktan rejenerasyon için, yarım yoğunlukta makro elementli QL besi ortamı, 0.5 mg l^{-1} NAA, 0.8 mg l^{-1} BAP ve 20 mg l^{-1} sukroz ilave edilerek kullanılmıştır. Besi ortamına BAP ile birlikte ilave edilen oksinlerin rejenerasyona etkisi de incelenmiş, NAA'nın 2,4-D'ye göre daha başarılı olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu araştırma, Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknoloji Laboratuvarında 2005-2009 yılları arasında yürütülmüştür. Araştırmada, materyal olarak 0900-Ziraat kiraz çeşidinin tomurcuk ve tohumları kullanılmıştır. Kültür başlatmada kullanılan materyaller, D. Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bahçesi'ndeki 4-5 yaşındaki ağaçlardan alınmıştır.

Tomurcuklar için, vejetasyon dönemi içerisinde yapılan kültür başlatma çalışmalarında yıllık sürgünler kullanılmış, dormant dönemdeki çalışmalarda ise bir yaşlı dallardan yararlanılmıştır. Deneylerde, bu sürgün ve dallar üzerindeki lateral tomurcuklar kullanılmıştır.

Tohum çalışmalarında kullanılan materyal, olgun meyvelerdeki tohumların meyve etinden arındırılarak kurutulması ile elde edilmiştir. Bu tohumlar buzdolabında (4 °C) muhafaza edilmiştir.

Çalışmanın farklı aşamalarında değişik kültür kaplarından yararlanılmış, bu kültür kapları ve özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kültür kapları ve özellikleri

| Malzeme | Özellikleri |
|----------------------------------|---|
| Magenta® vessel GA-7 kültür kabı | 77x77x97 mm, polikarbonat gövde, polipropilen kapak |
| Cam kavanoz | Şişecam (kod:102921), Ø66x81 mm, metal kapak |
| Deney tüpü | Ø20x175 mm, Ø24x200 mm |

3.1. Genel Doku Kültürü Teknikleri

Doku kültürü çalışmalarında kullanılan laboratuvar teknikleri, aslında rutin ve standart olarak yapılan işlemlerden oluşmaktadır. Ancak araştırmanın yöntemini ortaya koymak için, sterilizasyon, besi ortamı hazırlığı ve kültür şartları gibi konular ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.1.1. Alet ve Malzemelerin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmaları, bütün aşamaları aseptik şartlarda gerçekleştirilen ve sterilizasyonun çok büyük önem taşıdığı çalışmalardır. Kullanılan alet, malzeme ve ortamların özelliklerine göre farklılık gösteren sterilizasyon yöntemleri aşağıda verilmiştir.

3.1.1.1. Kültür Kaplarının Temizlenmesi ve Sterilizasyonu

Çalışma kapsamında yapılan ilk deneylerde, kültür kaplarından kaynaklanan ciddi bulaşma sorunları görüldüğünden, kullanılan temizleme ve sterilizasyon tekniklerinin uygun olmadığı tespit edilmiş ve farklı özelliklerdeki kültür kaplarında sorunsuz sterilizasyon sağlayan yöntemler belirlenmiştir. Araştırmada üç tip kültür kabı kullanılmıştır. Bunlar; polikarbonat gövdeli ve polipropilen kapaklı kültür kabı (Magenta Vessel GA-7), cam kavanozlar ve deney tüpleridir.

Polikarbon kültür kapları: Eski besi ortamı sterilize edilip boşaltıldıktan sonra ev tipi bulaşık makinesinde yıkanmıştır. Deterjan kalıntısı kalmadığından emin olmak için, sıcak suda en az 1 saat bekletilmiş, daha sonra 3 defa saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kaplar, otoklava ağzı açık ve aşağı bakacak şekilde bırakılarak, kapakları ile birlikte 121 °C’de, 1 atm basınç altında, 30 dk süre ile sterilize edilmiştir.

Cam kavanozlar: Besi ortamı boşaltıldıktan sonra ev tipi bulaşık makinesinde yıkanmış, sıcak suda en az 1 saat bekletilmiş ve 3 defa saf sudan geçirilmiştir. Tepsi içerisinde ağzı aşağı bakacak şekilde kuru hava sterilizatörüne bırakılmış ve 180 °C’de 2 s süre ile steril edilmiştir. Metal malzemedan yapılmış olan kapaklar ise, otoklavda 121 °C’de, 1 atm basınç altında, 30 dk süre ile sterilize edilmiştir.

Deney tüpleri: Sıcak su ile elle yapılan yıkamadan sonra ters vaziyette tüplüklere alınmış ve cam kavanozları ile aynı yöntemle sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Deney tüplerinin ağızlarının, steril edilmiş pamuk ile kapatılması sıkça kullanılan bir yöntem olmakla beraber, bu çalışmada bunun yerine daha basit olarak uygulanan doğrudan parafilm ile kapatılması yöntemi benimsenmiştir.

Her üç kültür kabı da, sterilizasyon işlemi biter bitmez steril kabine alınarak kullanılmıştır.

3.1.1.2. Pens, Bisturi ve Kağıt Malzemelerin Sterilizasyonu

Pens ve bisturiler, %96'lık etil alkol ile temizlenerek kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra alüminyum folyo ile sarılarak, 180 °C'lik bir kuru hava sterilizatöründe 30 dk süre ile sterilize edilmiştir. Steril kabinde çalışırken kullanılan kurutma kağıtları ve kağıt havlular, parşömen kağıdına sarılarak kuru hava sterilizatöründe 180 °C'de 120 dk süre ile sterilize edilmiştir.

3.1.1.3. Transfer Odasının Temizlenmesi

Kültür işlemlerinin gerçekleştirildiği transfer odasında, kültürden 1 gün önce seyreltilmiş ticari çamaşır suyu kullanılarak zemin ve diğer yüzeyler temizlenmiş ve steril kabin %96'lık alkol ile silinmiştir. Kullanılan yatay üflemlerli steril kabinde ultraviyole (UV) lambası bulunmakla birlikte, odaya yerleştirilen ayrı bir UV lambasının kültürden önceki gece 3 s çalışması sağlanarak ortam dezenfekte edilmiştir.

3.1.2. Besi Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Araştırmanın başında modifiye Murashige ve Skoog (1962) (MS) besi ortamının kullanılmasına karar verilmiştir. Ayrıca kültür başlatma aşamasında dört farklı besi ortamı denenmiştir. Besi ortamı, hazır preparatlardan değil, tüm bileşenleri içeren stok çözeltilerden hazırlanmıştır (Şekil 3.1). Stok çözeltilerin ve besi ortamının hazırlanmasında, kuru hava sterilizatöründe 180 °C'de 2 s süreyle steril edilen saf su kullanılmıştır.

3.1.2.1. Besi Ortamı Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

MS besi ortamı hazırlanırken, öncelikle Şekil 3.1'de içerikleri verilen 6 stok çözelti oluşturulmuş ve ihtiyaç duyuldukça kullanılmıştır. Çözeltiler hazırlanırken, ölçülü balonjoje içerisindeki bir miktar steril saf suya, belirtilen bileşikler konulmuş ve manyetik karıştırıcıda çözdürülerek steril saf su ile istenilen hacme tamamlanmıştır. Jelatin çözeltisi hazırlandıktan sonra otoklavda sterilize edilerek jelatlama işleminin tamamlanması sağlanmıştır. “Makro element”, “mikro element-I”, “Jelatin”, “*myo*-inositol”, “mikro element-II” ve “vitamin” olarak adlandırılan bu stok çözeltiler, renkli şişelerde buzdolabında 4 °C'de muhafaza edilmiş ve periyodik aralıklarla yenilenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

| Element | Oran | Hazırlanış |
|--|---|----------------------------------|
| Makro Element | NH ₄ NO ₃ 16.5 g | 1 litre MS Besi Ortamı 100 ml |
| | KNO ₃ 19.0 g | |
| | CaCl ₂ .2H ₂ O 4.4 g | |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O 3.7 g | |
| | KH ₂ PO ₄ 1.7 g | |
| | Steril saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır | |
| Mikro Element-I | H ₃ BO ₃ 620 mg | 10 ml |
| | MnSO ₄ .H ₂ O 1690 mg | |
| | ZnSO ₄ .7H ₂ O 860 mg | |
| | KI 83 mg | |
| | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O 25 mg | |
| | Steril saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır | |
| Jelat | FeSO ₄ .7H ₂ O 2.78 g | 10 ml |
| | Na ₂ EDTA 3.73 g | |
| Steril saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır | | |
| myo-inositol | myo-inositol 10 g | 10 ml |
| Steril saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır | | |
| Mikro Element-II | CuSO ₄ .5H ₂ O 2.5 mg | 1 ml |
| | CoCl ₂ .6H ₂ O 2.5 mg | |
| Steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanır | | |
| Vitamin | Glisin 200 mg | 1 ml |
| | Nikotik Asit 50 mg | |
| | Pridoksin-HCl 50 mg | |
| | Tiamin-HCl 10 mg | |
| | Steril saf su ile 100 ml'ye tamamlanır | |
| Şeker ve büyüme düzenleyici ilave edildikten sonra, steril saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır. | | |

Şekil 3.1. MS besi ortamının stok çözeltileri ve hazırlanışı

3.1.2.2. Büyüme Düzenleyici Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bütün büyüme düzenleyicilerin, 1 mgml⁻¹ konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmış ve ihtiyaç duyuldukça besi ortamlarına gerekli miktarlarda ilave edilmiştir. Stok çözeltiler hazırlanırken, 100 mg tartılan büyüme düzenleyici 100 ml'lik ölçülü balonjodaki birkaç ml çözücü içinde manyetik karıştırıcı ile çözdürülmüştür. Ardından steril saf su ile istenilen hacme tamamlanmıştır. Sadece NAA'de, hacmi tamamlamak için su yerine yine çözücü kullanılması gerekmiştir. Hazırlanan stok çözeltiler, renkli şişeler içerisinde, buzdolabında 4 °C'de muhafaza edilmiş ve periyodik olarak yeniden hazırlanmıştır.

Büyüme düzenleyicilerin çoğu suda çözünmemektedir. Bu çalışmada yer alan bitki büyüme düzenleyicilerin stok çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan çözücüler Çizelge 3.2'de verilmiştir. Ayrıca, bazı literatürlerde konsantrasyonlar molarite cinsinden verildiği için, birimleri dönüştürürken gerekli olan molekül ağırlıkları da belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmadaki büyüme düzenleyicilerin molekül ağırlığı ve kullanılan çözücüler

| Büyüme Düzenleyici | Molekül Ağırlığı (g/mol) | Çözücü |
|--|--------------------------|-----------|
| 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi asetik asit) | 221.0 | EtOH |
| IAA (İndol-3-asetik asit) | 175.2 | EtOH |
| IBA (İndol-3-butirik asit) | 203.2 | EtOH-NaOH |
| NAA (α -Naftalen asetik asit) | 186.2 | EtOH |
| BAP (6-Benzilaminopurin) | 225.3 | NaOH |
| TDZ (Thidiazuron) | 220.3 | KOH |
| Kin (Kinetin) | 215.2 | NaOH |
| GA ₃ (Gibberellik asit) | 346.4 | Su |

3.1.2.3. Besi Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

MS besi ortamından bir litre hazırlamak için, bir litrelik erlenmayer içerisine öncelikle 500 ml steril saf su bırakılmıştır. Şeker deneyleri dışındaki tüm deneylerde

standart olarak kullanılan 30 g sukroz eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Daha önce hazırlanmış olan stok çözeltiler, Şekil 3.1'de belirtilen miktarlarda ilave edilerek karıştırılmıştır. 30 g sukrozun 18 ml hacim teşkil ettiği de dikkate alınarak, 350 ml steril saf su ilavesiyle çözelti 1 litreye tamamlanmıştır. Besi ortamının pH'sı, 1 N NaOH ve 1 N HCl kullanılarak 5.8'e ayarlanmıştır. Son olarak 6.4 gl⁻¹ oranında agar (Sigma, Kat. No: A-1296) ilave edilerek besi ortamı otoklava hazır hale getirilmiştir. Besi ortamı, ağzı alüminyum tıpa ile kapatılan erlenmayer veya otoklavlanabilir kapaklı şişeler içerisinde, 1 atm basınçta, 121 °C'de, hacmine bağlı olarak 20-40 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Otoklavdan çıkarılan besi ortamları hafifçe çalkalanarak agarın homojen dağılması sağlanmış ve transfer odasında soğumaya bırakılmıştır. El yakmayacak kadar soğuyan besi ortamları, steril kabin içerisinde, deneyin özelliğine göre 40-70 ml miktarında kültür kaplarına aktarılmıştır.

3.1.3. Kültür Şartları

Kültür odası, beyaz floresan lamba ile aydınlatılmış ve kültür kaplarındaki eksplantlar için 50 µmol m⁻² s⁻¹ ışık yoğunluğu sağlanmıştır. Sıcaklık, klima yardımı ile 25 ± 2 °C'de tutulmuş ve muhtemel klima arızalarına karşı, sıcaklığın 30 °C'nin üzerine çıkması durumunda lambaları kapatan bir termostat yerleştirilmiştir. Bitkisel materyalin gelişimi için gerekli olan fotoperiyot, ışıklandırma sisteminin 16 s aydınlık ve 8 s karanlık olacak şekilde ayarlanması ile temin edilmiştir. Dış ortama alıştırmaya aşamasında ihtiyaç duyulan yüksek ışık yoğunluğunu sağlamak için bazı raflara daha fazla lamba yerleştirilmiştir.

Besi ortamından torf vb. yetiştirme ortamına aktarılan bitkiler, belirli bir süre yine kültür odasında kaldıktan sonra alıştırmaya odasına alınmışlardır. Bitkilerin doğal iklim şartlarına kademeli olarak alıştırılmasını sağlamak için kullanılan bu odanın bir cephesi camekanlı olup, doğrudan güneş ışığı almaktadır. Rafly bir tezgah sistemi ile bitkilerin daha iyi ışıklanması sağlanmış ve gerektiği durumlarda klima ile sıcaklık kontrol altında tutulmuştur.

3.2. Mikroçoğaltım Çalışmaları

Araştırmada kullanılan doku kültürü teknikleri, alet-malzemeler ve laboratuvar şartları hakkında, yukarıda verilen bilgilerden sonra, bu bölümde kirazın mikroçoğaltımı konusunda yapılan deneysel çalışmalarda izlenen yöntemler açıklanacaktır.

Mikroçoğaltım protokollerinde yer alan temel aşamalara paralel olarak (Mansuroğlu ve Gürel, 2002), çalışma kapsamında 5 ana başlık altında deneyler yürütülmüştür.

- Yüzey sterilizasyonu çalışmaları,
- Kültür başlatma çalışmaları,
- Sürgün çoğaltım çalışmaları,
- Köklendirme çalışmaları,
- Aklimatizasyon çalışmaları

3.2.1. Yüzey Sterilizasyonu Çalışmaları

In vitro kültürlerde başlangıç eksplantı olarak kullanılan materyalin yüzey sterilizasyonunda; musluk suyu, %70'lik etil alkol, %53 NaOCl içeren ticari çamaşır suyu, Tween 20 ve steril saf su kullanılmıştır. Materyalin miktarına göre 100, 250, 500 veya 1000 ml'lik erlenmayer içerisinde steril saf su ile hazırlanan NaOCl solüsyonuna, yayıcı-yapıştırıcı olarak her 100 ml için 2 damla Tween 20 ilave edilerek ağız alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Musluk suyunda yıkama dışında, sterilizasyonun bütün aşamaları transfer odasında yapılmıştır.

Kültürlerde, 20 veya 24 mm çaplı deney tüpleri kullanılmıştır. Her tüpe, MS besi ortamından 7-8 ml bırakılmış ve eksplant ekiminden sonra ağızları parafilm ile kapatılarak tüplükler içerisinde kültür odasına bırakılmıştır.

Tomurcuk ve tohum ile yapılan deneylerde, başlangıç eksplantlarının yüzey sterilizasyonuna, solüsyonların konsantrasyon ve uygulama sürelerinin etkileri incelenmiştir. Kültürün 14. gününde sonuçlar alınmış ve her iki materyal için "Temiz Kültür Oranı" ile, tomurcuklar için "Yaşayan Kültür Oranı" ve tohumlar için "Çimlenme Oranı" belirlenmiştir.

Temiz Kültür Oranı (%): Deney sonunda, bakteriyel veya mantarî bulaşma görülmeyen kültürlerin ilk eksplant sayısına oranını ifade etmektedir.

Yaşayan Kültür Oranı (%): Lateral tomurcuklarla yapılan deney sonunda, bakteriyel veya mantarî bulaşma görülmeyen ve canlılığını devam ettiren, alt kültüre alınabilir haldeki kültürlerin ilk eksplant sayısına oranını ifade etmektedir.

Çimlenme Oranı (%): Tohumlarla yapılan deney sonunda, çimlenen tohum sayısının, ekilen tohum sayısına oranını ifade etmektedir.

3.2.1.1. Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonu

Tomurcukların yüzey sterilizasyonu için ilk olarak, kullanılacak sürgünler üzerindeki yapraklar kesilmiş ve akan musluk suyunda 30 d bırakılmıştır. Tomurcukların yanlarındaki stipullar elle temizlenmiş ve budama makası ile 3-4 cm uzunluğunda tek nodlu parçalara ayrılarak saf suda 30 d bekletilmiştir. Etil alkol (%70) ile 30 sn muamele edildikten sonra, yapılan deneyin içeriğine göre farklı konsantrasyon ve sürelerdeki sterilizasyon solüsyonu uygulamalarından geçirilmiştir. Sterilizasyon solüsyonuna Tween 20 ilave edilmiş ve içine bırakılan tomurcuklar hafif çalkalanarak sterilizasyon yapılmıştır. Daha sonra, her tekrarda 5 d olmak üzere 5 defa steril saf su ile durulama yapılmıştır. Son olarak, steril saf suda 1 s boyunca 150 rpm devirde çalışan çalkalayıcıda bekletilmiştir. Kültür esnasında, sürgün parçalarının odun dokusunun alt ve üst yüzeyleri bir miktar kesim yapılarak ve yaprak sapları tamamen uzaklaştırılarak besi ortamına yerleştirilmiştir. Deneyle, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besi ortamı kullanılmıştır.

Kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna, NaOCl'nin farklı konsantrasyonları ve uygulama süreleri ile vejetasyon döneminin ve eksplant hazırlama yönteminin etkisini belirlemek üzere deneyler yapılmıştır.

Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna NaOCl Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde, kiraz lateral tomurcuklarının sterilizasyonuna NaOCl'in %0, %5, %10, %15 ve %20 konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. Nisan ayında yapılan bu deneyde alınan sonuçlar yeterli bulunmadığı için, Haziranda aynı deney tekrarlanmıştır. İlk deneyde 10 d uygulanan sterilizasyon solüsyonları, ikinci deneyde tomurcuk pulları daha belirgin hale geldiğinden 20 d uygulanmıştır.

Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna %15'lik NaOCl'nin Uygulama Sürelerinin Etkisi

Bu deneyde, konsantrasyon deneylerinde en iyi sonucu veren %15 NaOCl içerisinde 10, 20, 25 ve 30 d çalkalamanın sterilizasyona etkisi incelenmiştir. Bu deney Temmuz ayında yapılmıştır.

Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna Vejetasyon Döneminin Etkisi

Bu deneyde, vejetasyon içerisinde farklı dönemlerde kullanılan lateral tomurcuklarda yüzey sterilizasyonunun etkinliği incelenmiştir. Ocak, Mart, Nisan, Haziran, Temmuz ve Aralık aylarında yapılan deneylerde, %15 NaOCl kullanılmış, Nisan ayındaki deneyde 10 d diğer aylarda 20 d uygulanmıştır.

Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna Eksplant Hazırlama Yönteminin Etkisi

Bu deneyde, tomurcukların iki farklı şekilde hazırlanarak kültüre alınmasının etkisi incelenmiştir. Kasım ayında yapılan bu deneyde, NaOCl %15 oranında ve 25 d süreyle uygulanmıştır.

İlk eksplant hazırlama yöntemi; daha önceki deneylerde de kullanılan, 1-1.5 cm sürgün parçası ile birlikte pullu haldeki tek tomurcuktan oluşan eksplant olup, “**mikro çelik**” diye ifade edilmiştir. Sterilizasyondan sonra, sürgün parçalarının odun dokusunun alt ve üst yüzeyleri ile yaprak saplarında bir miktar kesim yapılarak besi ortamına yerleştirilmiştir. İkinci eksplant hazırlama yöntemi ise; odun dokusundan ve pullarından arındırılmış haldeki 3-4 mm uzunluktaki tomurcukları ifade eden “**izole edilmiş tomurcuk**”lardır. Tek nodlu halde sterilizasyonu tamamlanan tomurcuklar, önce tomurcuk pullarından arındırılmış, sonra bazal kısmından kesilerek odun dokusundan ayrılmış ve bu şekilde kültüre alınmıştır.

3.2.1.2. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Deneylerde kullanılan tohumlar, endokarp kırılarak hazırlandıktan sonra 1 d %70'lik alkolde bekletilmiş, sonra yapılan deneyin içeriğine göre farklı konsantrasyon ve sürelerdeki sterilizasyon solüsyonu uygulamalarından geçirilmiştir. Sterilizasyon solüsyonuna 2 damla/100 ml Tween 20 ilave edilmiş ve içine bırakılan tohumlar hafif

çalkalanarak sterilizasyon yapılmıştır. Ardından, her tekrarda 5 d olmak üzere 5 defa steril saf su ile durulama yapılmış ve steril saf suda 1 s boyunca 150 rpm devirde çalışan çalkalayıcıda bırakılmıştır. Kültür sırasında testa temizlenmiş ve tohumlar 1 mg l^{-1} BAP içeren MS besi ortamına ekilmiştir. Kiraz tohumlarının yüzey sterilizasyonuna, NaOCl'nin farklı konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin etkileri incelenmiştir.

Tohumların Yüzey Sterilizasyonuna NaOCl Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde, kiraz tohumlarının sterilizasyonuna NaOCl'in %0, %5, %10, %15 ve %20 konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. Kontrol grubu olarak steril saf su kullanılmış ve 20 d süreyle sterilizasyon yapılmıştır.

Tohumların Yüzey Sterilizasyonuna %15'lik NaOCl'nin Uygulama Sürelerinin Etkisi

Bu deneyde, konsantrasyon deneylerinde en iyi sonucu veren %15 NaOCl içerisinde 5, 10 ve 15 d uygulama süresinin tohumların sterilizasyonuna etkisi incelenmiştir.

3.2.2. Kültür Başlatma Çalışmaları

Mikroçoğaltımın ikinci aşaması olan kültür başlatma çalışmalarında, başlangıç eksplantı olarak lateral tomurcuklar ve tohum materyallerinden yararlanılmıştır. Bu aşamadaki tüm deneylerde MS besi ortamı kullanılmış, jel yapıcı olarak 6.4 g l^{-1} agar kullanılmış ve otoklav öncesi pH 5.8'e ayarlanmıştır. Şeker deneyleri hariç, karbon kaynağı olarak besi ortamına 30 g l^{-1} sukroz ilave edilmiştir. Deneylerde cam kavanoz veya polikarbon kültür kapları kullanılmıştır.

Tomurcuktan kültür başlatma çalışmalarında, ağaçlardan alınan bir yaşlı dallar bekletilmeden kullanılmış ve tek boğumlu hale getirilerek yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Dal veya sürgünler üzerindeki iyi gelişmiş tomurcuklar seçilmiş, uç ve dip kısımdaki tomurcuklar kullanılmamıştır. Tohum materyali ise, sert kabuk kırılarak ayıklandıktan sonra, normal büyüklüğünü almış olanlar yüzey sterilizasyonu yapılarak deneylerde kullanılmıştır.

Yüzey sterilizasyonu tamamlanan materyaller, steril kabin içerisinde gerekli işlemler yapıldıktan sonra kültüre alınmıştır. Lateral tomurcuklar, pulları ve odun

dokusu temizlenerek; tohumlar ise, tohum kabuğu (testa) çıkarılarak besi ortamına ekilmiş ve kültür odasına bırakılmıştır.

Tomurcuktan kültür başlatma çalışmalarında, 4 haftalık kültür süresinin ardından deney sonuçlandırılmış ve “Alt Kültüre Alınabilir Eksplant Oranı”, “Rozet Sürgün Oranı” ve “Ortalama Yaprak Sayısı” belirlenmiştir.

Tohum ile yapılan deneyler ise, 3 haftada sonuçlandırılmış ve “Çimlenme Oranları”, “Ortalama Kök Uzunluğu”, “Ortalama Sürgün Uzunluğu” ve “Ortalama Yaprak Sayısı” tespit edilmiştir.

Alt Kültüre Alınabilir Eksplant Oranı (%): Kültüre alınan tomurcuklardan, canlılığını muhafaza eden ve en azından tomurcuk pulları açılarak yaprak taslakları ortaya çıkacak kadar gelişmiş olanların oranını ifade etmektedir.

Rozet Sürgün Oranı (%): Kültüre alınan tomurcuklardan, en az 1-2 adet tam yaprak geliştirenlerin oranını ifade etmektedir.

Ortalama Yaprak Sayısı (adet): Tomurcuklardan elde edilen rozet sürgünlerdeki normal şeklini almış yaprak sayısının, rozet sürgün sayısına bölümünü ifade etmektedir.

Çimlenme Oranı (%): Tohum ile yapılan deneylerde, çimlenen tohum sayısının toplam tohum sayısına oranını göstermektedir.

Ortalama Kök Uzunluğu (mm): Çimlenen tohumlarda, kök boğazından kök ucuna kadar dijital kumpasla ölçülen uzunlukların ortalamasını ifade etmektedir.

Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm): Çimlenen tohumlarda, kök boğazından sürgünün en uç noktasına kadar dijital kumpasla ölçülen uzunlukların ortalamasını ifade etmektedir.

Ortalama Yaprak Sayısı (adet): Çimlenen tohumlarda, normal şeklini almış yaprak sayısının, sürgün sayısına bölümünü ifade etmektedir.

3.2.2.1. Tomurcuklardan Kültür Başlatma Çalışmaları

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatılmasına büyüme düzenleyicilerin etkisi ayrıntılı olarak ele alınmış, sitokinin, oksin ve giberellin grubu büyüme düzenleyiciler tek başlarına veya kombinasyonlar halinde kullanılmıştır. Ayrıca, besi ortamına ilave edilen şeker tip ve karışımları, tomurcukların kültüre alındığı dönem ve ağaçtaki pozisyonunun kültür başlatmaya etkisi de deneysel olarak incelenmiştir.

Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına Sitokinin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi

Doku kültürü çalışmalarında en çok kullanılan sitokininlerden, BAP, TDZ ve kinetinin farklı konsantrasyonlarının, kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatılmasına etkisi incelenmiştir. Her üç sitokininin 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg^l⁻¹ konsantrasyonları kullanılmış ve TDZ'de bunlara ilaveten 0.05 mg^l⁻¹ konsantrasyonuna yer verilmiştir.

Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına BAP ile Birlikte Kullanılan Oksin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi

İlk aşamada belirlenen en uygun sitokinin tip ve konsantrasyonlarından birincisi olan 2 mg^l⁻¹ BAP'la birlikte, oksin grubu büyüme düzenleyicilerin farklı konsantrasyonlarda besi ortamına ilavesinin kültür başlatmaya etkisi incelenmiştir. Oksinlerden IAA, IBA, NAA ve 2,4-D'nin 0.05, 0.1, 0.3 ve 0.5 mg^l⁻¹ konsantrasyonları kullanılmış, kontrol grubuna sadece 2 mg^l⁻¹ BAP ilave edilmiştir.

Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına TDZ ile Birlikte Kullanılan Oksin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi

Sitokinin deneylerinde belirlenen en uygun sitokinin tip ve konsantrasyonlarından ikincisi olan 2 mg^l⁻¹ TDZ ile birlikte, oksin grubu büyüme düzenleyicilerinden IAA, IBA, NAA ve 2,4-D'nin, 0.05, 0.1, 0.3 ve 0.5 mg^l⁻¹ konsantrasyonları, besi ortamına ilave edilerek etkileri incelenmiştir. Kontrol grubuna sadece 2 mg^l⁻¹ TDZ ilave edilmiştir.

Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına BAP ile Birlikte Kullanılan GA₃'ün Etkisi

Bu deneyde, kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmaya 2 mg^l⁻¹ BAP ile birlikte besi ortamına ilave edilen 0.3 mg^l⁻¹ GA₃'ün etkisi incelenmiştir. Kontrol grubu olarak sadece 2 mg^l⁻¹ BAP içeren besi ortamından yararlanılmıştır.

Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasında Başarılı Bulunan Büyüme Düzenleyicilerin Etkilerinin Tekrarlanabilirliği

Bu deneyde, kültür başlatma çalışmaları kapsamında uygun büyüme düzenleyici kompozisyonunu belirlemek üzere yürütülen çalışmalarda elde edilen en iyi büyüme düzenleyici kombinasyonları tekrar ele alınmıştır. Önceki aşamalarda yapılan, sitokininler ile konsantrasyonları, sitokininlere eklenen oksinler ile konsantrasyonları ve GA₃ ilavesi deneylerinde elde edilen en başarılı uygulamaların, bu deneyde farklı dönemlerde yapılan kültürlerle tekrarlanabilirliği incelenmiştir:

- | | |
|---|---|
| - 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP, | - 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ |
| - 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP + 0.5 mg ^l ⁻¹ IAA | - 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ + 0.5 mg ^l ⁻¹ IAA |
| - 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP + 0.3 mg ^l ⁻¹ NAA | - 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ + 0.3 mg ^l ⁻¹ IBA |
| - 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP + 0.3 mg ^l ⁻¹ 2,4-D | - 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ + 0.3 mg ^l ⁻¹ NAA |
| - 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP + 0.3 mg ^l ⁻¹ GA ₃ | - 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ + 0.3 mg ^l ⁻¹ 2,4-D |

Dormant haldeki tomurcukların kültür başlatılmasında daha başarılı sonuç verdiği dikkate alınarak, kültürler 18 Ekim, 22 Aralık, 27 Şubat ve 23 Mart tarihlerinde yapılmıştır. TDZ içeren kombinasyonlar, ilk iki kültür döneminde başarılı sonuçlar vermediğinden sonraki iki kültürde kullanılmamış ve çalışmaya BAP'lı kombinasyonlarla devam edilmiştir.

Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına Şeker Tip ve Karışımlarının Etkisi

Kültür başlatmaya farklı şeker tiplerinin etkisini belirlemek üzere yapılan bu deneyde; sukroz, glikoz, fruktoz ve laktoz kullanılmış ve her biri besi ortamına 30 gl⁻¹ konsantrasyonda ilave edilmiştir. Standart olarak 2 mg^l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamından yararlanılmıştır.

İlk deneyde başarılı bulunan sukroz, glikoz ve fruktozun karışım halinde kullanılmasının etkisini incelemek üzere yapılan ikinci deneyde, bu üç şeker tipinin her biri 15 gl⁻¹ dozunda ikili kombinasyonlarla besi ortamına ilave edilmiştir. Denemede kontrol olarak sukrozun 30 gl⁻¹ konsantrasyonuna yer verilmiştir. Tüm uygulamalarda 2 mg⁻¹ BAP içeren MS besi ortamından yararlanılmıştır.

Kültür Başlatılmasına Tomurcukların Alındığı Dönemin Etkisi

Kiraz tomurcuklarının kültüre alındığı dönemin kültür başlatmaya etkisini belirlemek üzere yapılan bu deneyde dormant haldeki tomurcuklar kullanılmıştır. Kùltürler, 17 Kasım, 2 Aralık, 25 Aralık ve 11 Ocak tarihlerinde yapılmış ve tüm kùltürlerde 2 mg⁻¹ BAP ve 0.3 mg⁻¹ GA₃ ilave edilen MS besi ortamı kullanılmıştır.

Kültür Başlatılmasına Tomurcukların Ağaçtaki Pozisyonunun Etkisi

Kullanılan tomurcukların damızlık bitkinin farklı kùsùmlarından alınmasının kùltür başlatmaya etkisini belirlemek üzere yapılan bu deneyde, (1) doruk dalın apikal sürgünü, (2) yan dalın apikal sürgünü ve (3) yan dalın lateral sürgünü üzerindeki tomurcuklar ile kùltür yapılmıştır. Besi ortamına 2 mg⁻¹ BAP ilave edilmiştir.

3.2.2.2. Tohumlardan Kùltür Başlatma Çalışmaları

Kiraz tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesine, eksplant hazırlama yöntemlerinin, besi ortamına ilave edilen farklı büyüme düzenleyicilerin ve kùltürleri karanlıkta bekletme uygulamalarının etkileri incelenmiştir.

Tohumların *in vitro* Çimlendirilmesine Eksplant Hazırlama Yönteminin Etkisi

Kiraz tohumlarının farklı şekillerde hazırlanarak kültüre alınmasının, *in vitro* çimlenme üzerine etkisini görmek üzere yapılan bu deneyde; tohumlar “normal”, ortadan enine kesilip embriyonik kùsùm kullanılarak “yarım kotiledonlu embriyonik uç” ve kotiledondan mümkün olduğunca izole edilmiş olarak “embriyonik uç” halinde kültüre alınmıştır. Tohumlarda kesim işleminin yaparken, bistüri yardımıyla testa soyulmuş ve embriyo zarar görmeden kültüre alınmıştır. Bu deneyde 1 mg⁻¹ BAP içeren MS besi ortamı kullanılmıştır.

Tohumların *in vitro* Çimlendirilmesine Büyüme Düzenleyicilerinin Etkisi

Bu deney, kiraz tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesine, büyüme düzenleyicilerinin etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Besi ortamına 1 mg^l⁻¹ konsantrasyonda ilave edilen, gibberellin grubundan GA₃; sitokininlerden BAP ve kinetin; oksinlerden IBA'nın etkileri incelenmiştir. İlk deneyin sonuçları dikkate alınarak, tohumlar enine ikiye bölünerek embriyonik uç ekilmiştir.

Tohumların *in vitro* Çimlendirilmesine BAP Konsantrasyonlarının Etkisi

Kiraz tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine BAP'ın farklı konsantrasyonlarının etkisini belirlemek üzere yapılan bu deneyde, büyüme düzenleyici içermeyen kontrol grubu ile birlikte 1, 2, 4 ve 6 mg^l⁻¹ konsantrasyonları denenmiş ve tohumlar yarım kotiledonlu halde ekilmiştir.

Tohumların *in vitro* Çimlendirilmesine Karanlıkta Bekletme Sürelerinin Etkisi

Bu deney, kiraz tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesine karanlıkta bekletme süresinin etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Besi ortamına ekilen tohumlar, 0 (kontrol), 3, 7 ve 14 gün süreyle büyüme odasında karanlıkta bekletilmiştir. Tüm uygulamalarda kültürün 21. gününde deney sonuçlandırılmıştır. Her uygulamada 45 adet tohum kullanılmıştır ve yine yarım kotiledonlu halde ekilmiştir.

3.2.3. Sürgün Çoğaltım Çalışmaları

Mikroçoğaltım çalışmalarının ikinci aşamasında, kültür başlatma aşamasında elde edilen rozet sürgünlerden sürgün çoğaltımı sağlanması amaçlanmıştır. MS besi ortamı, ilk deneyde incelenen besi ortamları içerisinde en iyi sonucu vermiş ve sonraki bütün deneylerde de bu besi ortamı kullanılmıştır. Jel yapıcı olarak 6.4 gl⁻¹ agar, karbon kaynağı olarak 30 gl⁻¹ sukroz kullanılmış ve otoklav öncesi pH 5.8'e ayarlanmıştır. Deneylerde cam kavanoz veya polikarbon kültür kapları kullanılmıştır.

Kültür başlatma safhasından çıkan en az 3-4 yapraklı haldeki rozet sürgünler, tomurcuk pullarından ve gerekliyse yaşlı yapraklarından arındırılarak deneylerde kullanılmıştır. Eksplantların bazal kısımlarında kallus oluşumu varsa temizlenerek kültüre alınmıştır. Her kültür kabına en fazla 4 eksplant bırakılmıştır.

Sürgün çoğaltım deneyleri genellikle 4 haftalık kültür süresinin ardından sonuçlandırılmış, bazı deneylerde bu süre 1-2 hafta uzatılmıştır. Kültür süresinin sonunda “Alt Kültüre Alınabilir Eksplant Oranı”, “Sürgün Sayısı”, “Ana Sürgün Uzunluğu”, “Yan Sürgün Uzunluğu” belirlenmiştir.

Alt Kültüre Alınabilir Eksplant Oranı (%): Kültüre alınan rozet sürgünlerden, canlılığını muhafaza ederek gelişenlerin oranını ifade etmektedir.

Sürgün Sayısı: Alt kültüre alınabilir eksplantlardan oluşan sürgün sayısının ortalamasını ifade etmektedir.

Ana Sürgün Uzunluğu (mm): Rozet sürgünün gelişmesiyle oluşan ana sürgünlerin, dip kısımdan sürgün ucuna kadar dijital kumpasla ölçülen uzunluklarının ortalamasını ifade etmektedir.

Yan Sürgün Uzunluğu (mm): Ana sürgünden çıkmış olan yan sürgünlerin, dip kısımdan sürgün ucuna kadar dijital kumpasla ölçülen uzunluklarının ortalamasını ifade etmektedir.

Sürgün çoğaltım çalışmalarında ilk olarak uygun besi ortamını belirlemek amacıyla deney düzenlenmiştir. Büyüme düzenleyicilerin etkileri incelenmiş, sitokinin ve gibberellin grubu büyüme düzenleyiciler tek başlarına veya kombinasyonlar halinde kullanılmıştır. Ayrıca, besi ortamına Floroglukinol ilave edilerek sürgün çoğaltımına etkisi incelenmiştir.

3.2.3.1. Sürgün Çoğaltımına Besi Ortamlarının Etkisi

Bu deneyde, kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına farklı besi ortamlarının etkisi incelenmiştir. Murashige ve Skoog (1962) (MS), Quoirin ve Lepoivre (1977) (QL), Woody Plant Medium (Lloyd ve McCown, 1981) (WPM) ve Schenk ve Hildebrandt (1972) (SH) besi ortamları kullanılmıştır. Tüm besi ortamlarına 2 mg^l⁻¹ BAP ve 0.3 mg^l⁻¹ GA₃ ilave edilmiştir.

3.2.3.2. Sürgün Çoğaltımına Sitokinin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi

Sitokinin grubu büyüme düzenleyicilerden BAP, TDZ ve kinetinin farklı konsantrasyonlarda besi ortamına eklenmesinin, kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına

etkisi incelenmiştir. Bu deneyde 3 büyüme düzenleyicinin 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg^l⁻¹ konsantrasyonları denenmiştir.

3.2.3.3. Sürgün Çoğaltımına BAP'ın Yüksek Konsantrasyonlarının Etkisi

Daha önce 4.0 mg^l⁻¹ konsantrasyona kadar kullanılan BAP'ın, besi ortamına daha yüksek oranlarda ilave edilmesinin sürgün çoğaltımına etkisini belirlemek üzere yapılan deneyde, 4.0, 6.0 ve 8.0 mg^l⁻¹ konsantrasyonlar kullanılmıştır.

3.2.3.4. Sürgün Çoğaltımına Sitokininler ile Birlikte Kullanılan GA₃'ün Etkisi

Bu deneyde, besi ortamına BAP ve TDZ sitokininlerinin 1 ve 2 mg^l⁻¹ konsantrasyonları ile birlikte 0.3 mg^l⁻¹ GA₃ ilave edilmesinin kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına etkisi incelenmiştir.

3.2.3.5. Sürgün Çoğaltımına Farklı BAP ve GA₃ Kombinasyonlarının Etkisi

Bir önceki deneyde iyi sonuç veren BAP-GA₃ kombinasyonu, bu deneyde 8 farklı konsantrasyon deseninde denenmiştir. Deneyde; 1 mg^l⁻¹ BAP ile 0.3, 0.5 ve 1.0 mg^l⁻¹ GA₃; 2 mg^l⁻¹ BAP ile 0.3, 0.5 ve 1.0 mg^l⁻¹ GA₃; 4 mg^l⁻¹ BAP ile 1.0 ve 2.0 mg^l⁻¹ GA₃ kombinasyonlarına yer verilmiştir.

3.2.3.6. Sürgün Çoğaltımına Floroglukinol'ün Etkisi

Bu deneyde, besi ortamına 126 mg^l⁻¹ (1 mM) ilave edilen Floroglukinol'ün kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına etkisi incelenmiştir. Besi ortamlarına 2 mg^l⁻¹ BAP ilave edilmiştir.

3.2.3.7. Aksillar Sürgünlerin Gelişmesine BAP ve GA₃ Kombinasyonlarının Etkisi

Sürgün çoğaltım çalışmalarında elde edilen aksillar sürgünlerin tekrar kültüre alınmasında, besi ortamına ilave edilen BAP ve GA₃ kombinasyonlarının etkisi incelenmiştir. Deneyde, 2 mg^l⁻¹ BAP ile 0.5 ve 1.0 mg^l⁻¹ GA₃; 4 mg^l⁻¹ BAP ile 1.0 ve 2.0 mg^l⁻¹ GA₃ kombinasyonları kullanılmıştır.

3.2.3.8. Tohumdan Elde Edilen Sürgünlerin Çoğaltımına BAP Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde, tohumdan başlatılmış kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına BAP konsantrasyonlarının etkisi incelenmiş ve bu amaçla 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg^l⁻¹ konsantrasyonlarından yararlanılmıştır. Tohumların çimlendirilmesi ile elde edilen eksplantlarda, kültür boyunca ana sürgünde boy gelişmesi olmadığından bu deneyde ana sürgün uzunluğu gözlemi alınmamıştır.

3.2.4. Köklendirme Çalışmaları

Bu aşamada sürgün çoğaltımı ile elde edilen ve belirli bir büyüklüğe ulaşan sürgünlerin köklendirilmesi amaçlanmıştır. Tomurcuklardan geliştirilmiş kültürlerde köklenmeye alınacak nitelikte sürgün sağlanamadığı için, köklendirme deneylerinde tohum kaynaklı sürgünler kullanılmıştır.

Köklendirme deneylerinde MS besi ortamı kullanılmış, jel yapıcı olarak 6.4 gl⁻¹ agar, karbon kaynağı olarak 30 gl⁻¹ sukrozdan yararlanılmıştır. Otoklavdan önce pH 5.8'e ayarlanmış ve deneylerde polikarbon kültür kapları kullanılmıştır.

Sürgün çoğaltma aşamasında elde edilen 1-2 cm uzunluktaki sürgünlerin kullanıldığı deneylerde, her kültür kabına 4 sürgün bırakılmıştır. Köklendirme deneyleri 3 haftalık kültür süresinin ardından sonuçlandırılmıştır. Kültür süresinin sonunda "Köklenme Oranı", "Kök Sayısı" ve "Kök Uzunluğu" gözlemleri alınmıştır.

Köklenme Oranı (%): Kültüre alınan sürgünlerden köklenme görülenlerin oranını ifade etmektedir.

Kök Sayısı (adet): Köklenen sürgünlerde meydana gelen kök sayılarının ortalamasıdır.

Kök Uzunluğu (mm): Oluşan bütün köklerin uzunluklarının ortalamasını ifade etmektedir.

Köklendirme deneylerinde ilk olarak oksin grubu büyüme düzenleyicilerden IBA ve NAA'in farklı dozlardaki etkileri incelenmiştir. Diğer deneyde, karanlıkta bekletme uygulamasının kiraz mikro sürgünlerinin köklenmesine etkisi incelenmiştir.

3.2.4.1. Sürgün Köklenmesine IBA ve NAA Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde, kiraz sürgünlerinin köklenmesine besi ortamına ilave edilen oksinlerin etkisi incelenmiştir. IBA ve NAA, besi ortamına 0.5 ve 1.0 mg^l⁻¹ konsantrasyonlarda ilave edilerek denenmiştir.

3.2.4.2. Sürgün Köklenmesine Karanlık Uygulamasının Etkisi

Karanlıkta bekletme uygulamasının kiraz sürgünlerinin köklenmesi üzerine etkisini belirlemek üzere yapılan bu deneyde, 0.5 mg^l⁻¹ IBA ile desteklenmiş besi ortamı kullanılmıştır. Kültür odasına bırakılan kültürlerden kontrol grubundakiler doğrudan 16/8 s fotoperiyotlu ortama konulmuş, diğerleri 7 gün boyunca kutu içerisinde karanlıkta bekletildikten sonra aynı şartlara çıkarılmıştır.

3.2.5. Dış Ortama Alıştırma (Aklimatizasyon) Çalışmaları

Mikroçoğaltımın son aşaması olan aklimatizasyon çalışmalarında, köklü kiraz bitkilerinin dikim ortamlarına ve çevre koşullarına kademeli olarak alıştırılması üzerinde çalışılmıştır.

Köklendirme ortamlarında köklü bitkiler haline gelen materyal, besi ortamından çıkarıldıktan sonra musluk suyunda yıkanarak besi ortamından tamamen arındırılması sağlanmış ve dikime geçilmiştir.

Dikim ortamı olarak yararlanılan materyaller (torf, perlit, vermikulit), parşömen kağıtları içerisinde otoklavda 1 s süreyle steril edildikten sonra kullanılmıştır. Dikimler, 7x8 cm ebatlarında yuvarlak saksılara yapılmış, dikimden sonra bitkilerin üzeri 6x8 cm ebatlarında şeffaf plastik kap ile kapatılmıştır.

Dikimden 45 gün sonra sonuçlandırılan deneylerde yaşayan kiraz bitkilerinin sayısı belirlenerek “Yaşayan Bitki Oranı” hesaplanmıştır.

Yaşayan Bitki Oranı (%): Dikim ortamına aktarılan bitkiler içerisinde deney sonunda canlılığını koruyanların oranını ifade etmektedir.

Aklimatizasyon deneylerinde, farklı dikim ortamlarının, köklendirmede kullanılan büyüme düzenleyicilerin ve soğukta bekletme uygulamalarının etkileri üzerine deneyler yürütülmüştür.

3.2.5.1. Dikim Ortamlarının Aklimatizasyona Etkisi

Mikroçoğaltımla elde edilen kiraz bitkilerinin dikimi için en uygun dikim ortamını belirlemek üzere yapılan bu deneyde 3 farklı ortam kullanılmıştır. Torf, torf-perlit karışımı (2:1 h/h) ve torf-vermikulit karışımı (2:1 h/h) ile yapılan çalışmada, bütün materyaller otoklavda ayrı ayrı steril edildikten sonra kullanılmıştır.

3.2.5.2. Köklendirmede Kullanılan Oksinlerin Aklimatizasyona Etkisi

Bu deneyde, farklı tip ve konsantrasyondaki oksinlerle köklendirilmiş olan kiraz bitkilerinin aklimatizasyonu incelenmiştir. Köklendirilmesi 0.5 ve 1.0 mg^l⁻¹ konsantrasyonda IBA ve NAA içeren besi ortamında yapılan bitkiler, dikim ortamına aktarılarak deney süresi sonunda yaşama oranları belirlenmiştir.

3.2.5.3. Soğuk Uygulamasının Aklimatizasyona Etkisi

Kiraz bitkilerinin dikim ortamına aktarılmadan önce soğukta bekletilmesinin, yaşayan bitki oranına etkisini belirlemek üzere bu deney yapılmıştır. Bitkiler, köklendirme ortamından çıkarılmadan, buzdolabında 4 ± 1 °C'de 3 hafta süreyle bırakılmıştır. Dikimden 4-5 s önce buzdolabından çıkarılıp kültür odasına alınan bitkiler, besi ortamından çıkarılıp yıkama işleminden geçirildikten sonra dikilmiştir.

3.2.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Bütün çalışmalar, tesadüf parselleri deneme desenine göre, en az üç tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Verilerin analizi için SPSS 15.0 paket programı kullanılmıştır. Sonuçlara parametrik istatistik testler uygulanabilmesi ve verilerin normalleştirilmesi için, sayısal değerlere (adet) log₁₀(x+1) transformasyonu uygulanmıştır (Sokal ve Rohlf 2001). Elde edilen veriler, tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Faktörlerin etkisi istatistik olarak önemli bulunması durumunda (P<0.05), çoklu karşılaştırma testlerinden Duncan ile gruplandırılmıştır. Çizelgelerde tüm veriler transforme edilmemiş gerçek değerleri göstermektedir. İki uygulamalı deneylerde, uygulamalar bağımsız iki örnek için t-testi ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yüze Sterilizasyonu Çalışmaları

Başlangıç materyali olarak kullanılan 0900-Ziraat kiraz çeşidine ait lateral tomurcuk ve tohumların yüze sterilizasyon yöntemlerini belirlemek üzere yürütülen deneylerde, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

4.1.1. Tomurcukların Yüze Sterilizasyonu

4.1.1.1. Tomurcukların Yüze Sterilizasyonuna NaOCl Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde, kiraz lateral tomurcuklarının sterilizasyonuna, NaOCl'nin farklı konsantrasyonlarının 10 dk süreyle uygulanmasının etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kiraz lateral tomurcuklarının yüze sterilizasyonuna NaOCl konsantrasyonlarının etkisi-I (10 dk - Nisan)*

| NaOCl Konsantrasyonu ve Uygulama Süresi | Temiz Kültür (%) | Yaşayan Kültür (%) |
|---|--------------------------------|------------------------------|
| %0 x 10 dk (Kontrol) | 55.0 ± 11.4 b | 50.0 ± 11.5 |
| %5 x 10 dk | 85.0 ± 8.2 a | 55.0 ± 11.4 |
| %10 x 10 dk | 85.0 ± 8.2 a | 55.0 ± 11.4 |
| %15 x 10 dk | 95.0 ± 5.0 a | 65.0 ± 10.9 |
| %20 x 10 dk | 95.0 ± 5.0 a | 60.0 ± 11.2 |
| | F= 4.293 sd= 4, 95 P= 0.003 | F= 0.255 sd= 4, 95 P>0.05 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 14. gününde alınmıştır.

Temiz kültür oranı bakımından, kontrol grubu ile kullanılan konsantrasyonlar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$). En yüksek oran %95 ± 5 olup, NaOCl'nin %15 ve %20 konsantrasyonlarından elde edilmiştir. Yaşayan kültür oranı da yine %15 NaOCl'de yüksek bulunmuş ve bu konsantrasyonun en

başarılı uygulama olduğu görülmüştür. Nisan ayında yapılan bu deneyde, yaşayan kültür oranı yeterli bulunmadığından deneyin tekrarlanmasına karar verilmiştir.

NaOCl konsantrasyonlarının etkisinin incelendiği ikinci deney Haziran ayında yapılmış ve bu dönemde tomurcuk pulları daha belirgin hale geldiğinden sterilizasyon solüsyonunun uygulama süresi 20 dakikaya çıkarılmıştır. Deneyde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl konsantrasyonlarının etkisi-II (20 dk - Haziran)*

| NaOCl Konsantrasyonu ve Uygulama Süresi | Temiz Kültür (%) | Yaşayan Kültür (%) |
|---|----------------------------------|--------------------------------|
| %0 x 20 dk (Kontrol) | 20.0 ± 9.2 c | 20.0 ± 9.2 b |
| %5 x 20 dk | 55.0 ± 11.4 b | 15.0 ± 8.2 b |
| %10 x 20 dk | 70.0 ± 10.5 ab | 45.0 ± 11.4 ab |
| %15 x 20 dk | 90.0 ± 6.9 a | 55.0 ± 11.4 a |
| %20 x 20 dk | 90.0 ± 6.9 a | 35.0 ± 10.9 ab |
| | F= 10.125 sd= 4, 95 P= 0.0001 | F= 2.634 sd= 4, 95 P= 0.039 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 14. gününde alınmıştır.

Deneyde test edilen NaOCl konsantrasyonları arasındaki farklılık, istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). NaOCl konsantrasyonu arttıkça temiz kültür oranı da yükselmiş ve %15 ile %20 konsantrasyonlarda %90 ± 7’ye çıkmıştır. En yüksek yaşayan kültür oranı (%55 ± 11) yine %15 NaOCl’de elde edilmiştir.

İki ay ara ile yapılan bu deneylerde, uygulamalardan elde edilen sonuçların sıralanması benzer şekilde gerçekleşmiştir. Ancak ikinci deneyde, sterilizasyon solüsyonunun uygulama süresinin artırılmasına rağmen, hem temiz kültür hem de yaşayan kültür oranlarında azalma görülmüştür. Bunun sebebi, sterilizasyon deneylerinin genel değerlendirilmesinin yapıldığı bölüm 4.1.3’de irdelenmiştir.

Bu deneylerde ortaya çıkan sonuçlara göre, en uygun NaOCl konsantrasyonunun %15 olduğu belirlenmiş ve bu konsantrasyonda farklı uygulama sürelerinin çalışılmasına karar verilmiştir.

4.1.1.2. Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna %15'lik NaOCl'nin Uygulama Sürelerinin Etkisi

Bu deneyde, kiraz lateral tomurcuklarının sterilizasyonuna, %15'lik NaOCl'nin farklı uygulama sürelerinin etkisi incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna %15 NaOCl'nin uygulama sürelerinin etkisi*

| NaOCl Konsantrasyonu ve Uygulama Süresi | Temiz Kültür (%) | Yaşayan Kültür (%) |
|---|------------------------------|------------------------------|
| %15 x 10 dk | 75.0 ± 9.9 | 55.0 ± 11.4 |
| %15 x 20 dk | 75.0 ± 9.9 | 45.0 ± 11.4 |
| %15 x 25 dk | 85.0 ± 8.2 | 50.0 ± 11.5 |
| %15 x 30 dk | 85.0 ± 8.2 | 50.0 ± 11.5 |
| | F= 0.402 sd= 3, 76 P>0.05 | F= 0.127 sd= 3, 76 P>0.05 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 14. gününde alınmıştır.

Alınan sonuçlara göre uygulamalar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Her iki parametrede birbirine benzer değerler elde edilmiş, en iyi sonucu veren %15 NaOCl x 25 dk uygulaması, yapılacak kültür başlatma deneylerinde kullanılmak üzere uygun NaOCl konsantrasyonu ve uygulama süresi kombinasyonu olarak benimsenmiştir.

4.1.1.3. Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna Vejetasyon Döneminin Etkisi

Bu deneyde, vejetasyon içerisinde farklı dönemlerde kullanılan lateral tomurcuklarda yüzey sterilizasyonunun etkinliği incelenmiştir. Ocak, Mart, Nisan, Haziran, Temmuz ve Aralık aylarında yapılan deneylerde, aynı sterilizasyon protokolleri kullanılmış sadece Nisandaki deneyde sterilizasyon solüsyonunun uygulama süresi değiştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna vejetasyon döneminin etkisi*

| Dönem | NaOCl Konsantrasyonu ve Uygulama Süresi | Temiz Kültür (%) | Yaşayan Kültür (%) |
|---------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Ocak | %15 x 20 dk | 5.0 ± 5.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| Mart | %15 x 20 dk | 0.0 ± 0.0 b | 0.0 ± 0.0 b |
| Nisan | %15 x 10 dk | 95.0 ± 5.0 a | 65.0 ± 10.9 a |
| Haziran | %15 x 20 dk | 90.0 ± 6.9 a | 55.0 ± 11.4 a |
| Temmuz | %15 x 20 dk | 75.0 ± 9.9 a | 45.0 ± 11.4 a |
| Aralık | %15 x 20 dk | 20.0 ± 9.2 b | 0.0 ± 0.0 b |
| | | F= 41.265 sd= 5, 114 P= 0.0001 | F= 14.950 sd= 5, 114 P= 0.0001 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 14. gününde alınmıştır.

Sonuçlar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$). Tomurcukların dinlenme halinde olduğu Aralık, Ocak ve Mart aylarında yapılan kültürlerde, dinlenme periyodu ilerledikçe temiz kültür oranının azaldığı görülmüş ancak bu dönemdeki temiz kültürlerden de hiçbirisi gelişmemiştir. Gelişme döneminde yapılan çalışmalarda, en iyi sonuçlar Nisan ayında alınmış, temiz kültür oranı 95 ± 5 ve yaşayan kültür oranı 65 ± 11 olarak belirlenmiştir. Bu oranların mevsim ilerledikçe azaldığı görülmüştür.

4.1.1.4. Tomurcukların Yüzey Sterilizasyonuna Eksplant Hazırlama Yönteminin Etkisi

Bu deneyde, yüzey sterilizasyonu yapılan lateral tomurcukların, 2 farklı eksplant hazırlama yönteminin kültüre alınmasının etkisi incelenmiştir. “Mikro çelik” ve “izole edilmiş tomurcuk” kullanılarak yapılan deneyde, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Sonuçlar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$). Kiraz tomurcuklarından kültür başlatmada, mikro çelik halinde hazırlanan eksplantlarda temiz kültür oranı 6 ± 6 oranında olurken, izole edilmiş tomurcuklardan 100 oranında temiz ve yaşayan kültürler elde edilmiştir (Şekil 4.1, (Sterilizasyon çalışmalarında deney tüpü kullanılmış olup, resimler temsili olarak verilmiştir)).

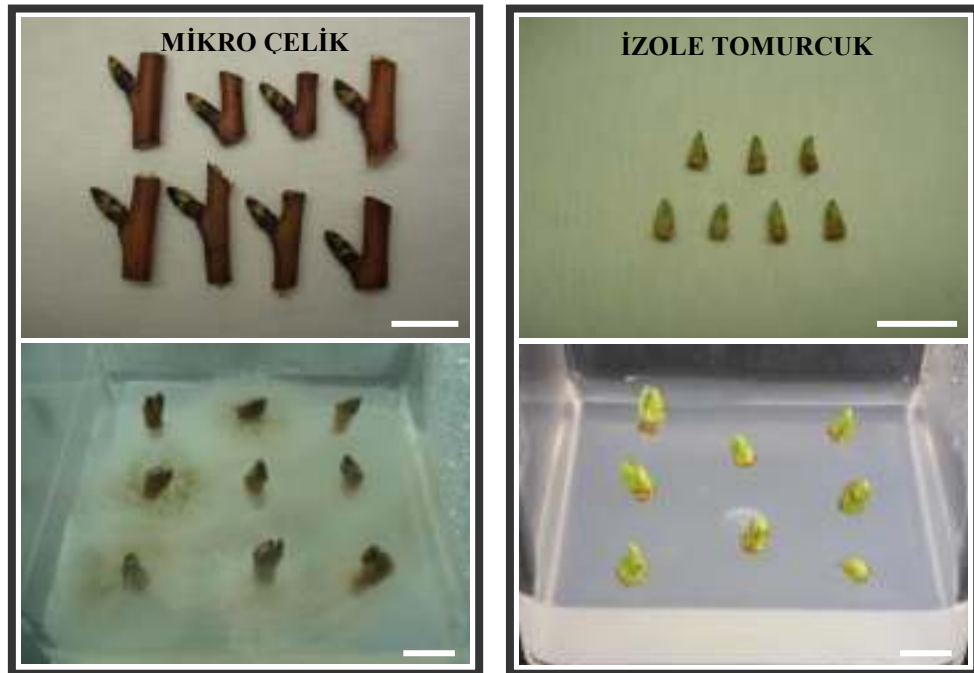
Araştırmanın sonraki aşamalarında yapılacak olan kültür başlatma çalışmalarında, önceki deneylerle belirlenen sterilizasyon protokolünün uygulanmasına ve tomurcukların izole edilerek kültüre alınmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.5. Kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonuna eksplant hazırlama yönteminin etkisi*

| Eksplant Hazırlama Yöntemi | Temiz Kültür (%) | Yaşayan Kültür (%) |
|----------------------------|------------------|--------------------|
| Mikro çelik | 6.3 ± 6.3 b | 0.0 ± 0.0 b |
| İzole edilmiş tomurcuk | 100.0 ± 0.0 a | 100.0 ± 0.0 a |

t= -15.000 sd=30
P=0.0001

* : Her seride 16 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 14. gününde alınmıştır.



Şekil 4.1. Lateral tomurcukların kültüre alınmasında kullanılan eksplant hazırlama yöntemleri ve 5 gün sonraki bulaşma durumları (Bar: 1.0 cm)

4.1.2. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

4.1.2.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonuna NaOCl Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu deneyde, kiraz tohumlarının sterilizasyonuna NaOCl'nin farklı konsantrasyonlarının etkisi incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Kiraz tohumlarının yüzey sterilizasyonuna NaOCl konsantrasyonlarının etkisi*

| NaOCl Konsantrasyonu ve Uygulama Süresi | Temiz Kültür (%) | Çimlenme (%) |
|---|----------------------------------|------------------------------|
| %0 x 20 dk (Kontrol) | 0.0 ± 0.0 c | 12.5 ± 8.5 |
| %5 x 20 dk | 56.3 ± 12.8 b | 31.3 ± 12.0 |
| %10 x 20 dk | 81.3 ± 10.1 a | 18.8 ± 10.1 |
| %15 x 20 dk | 100.0 ± 0.0 a | 18.8 ± 10.1 |
| %20 x 20 dk | 100.0 ± 0.0 a | 18.8 ± 10.1 |
| | F= 32.868 sd= 4, 75 P= 0.0001 | F= 0.450 sd= 4, 75 P>0.05 |

* : Her seride 16 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 14. gününde alınmıştır.

Temiz kültür oranı bakımından uygulamalar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$). NaOCl konsantrasyonu arttıkça temiz kültür oranı da yükselmiş ve %15 ile %20 konsantrasyonlarda %100'e çıkmıştır. Çimlenme oranları oldukça düşük bulunmuştur. Çimlenmeyen tohumların dokularının canlı olduğu gözlenmiş olup, düşük çimlenme oranı, sterilizasyon solüsyonunun konsantrasyonu ile ilgili olarak değil, tohumlardaki dormansinin bir sonucu olarak görülmüştür.

Bu deneyin sonuçlarına göre, NaOCl'nin %15'lik konsantrasyonunun tohumların yüzey sterilizasyonu için uygun olduğu belirlenmiş ve farklı uygulama sürelerinin çalışılmasına karar verilmiştir.

4.1.2.2. Tohumların Yüzeysel Sterilizasyonuna %15'lik NaOCl'nin Uygulama Sürelerinin Etkisi

Bu deneyde, kiraz tohumlarının sterilizasyonuna, %15'lik NaOCl'de farklı süreyle çalkalama uygulamalarının etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Kiraz tohumlarının yüzeysel sterilizasyonuna %15 NaOCl'nin uygulama sürelerinin etkisi*

| NaOCl Konsantrasyonu ve Uygulama Süresi | Temiz Kültür (%) | Yaşayan Kültür (%) |
|---|------------------|------------------------------|
| %15 x 5 dk | 100.0 ± 0.0 | 12.5 ± 8.5 |
| %15 x 10 dk | 100.0 ± 0.0 | 6.3 ± 6.3 |
| %15 x 15 dk | 100.0 ± 0.0 | 12.5 ± 8.5 |
| %15 x 20 dk | 100.0 ± 0.0 | 18.8 ± 10.1 |
| | sd= 3, 60 | F= 0.364 sd= 3, 60 P>0.05 |

* : Her seride 16 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 14. gününde alınmıştır.

Uygulamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Uygulanan sürelerin hiçbirinde bulaşma görülmemiştir. Kiraz tohumları ile yapılacak kültür başlatma deneylerinde, %15 NaOCl kullanılarak yapılan yüzeysel sterilizasyonunda 5 - 20 dk süre ile uygulama yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

4.1.3. Sterilizasyon Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi ve Tartışma

Doku kültürü çalışmalarının en temel prensiplerinden biri, yararlanılan ortam, alet, malzeme ve bitkisel materyalin sterilizasyonuna ilişkin uygulamaların doğru olarak belirlenmesidir. Bunlardan ortam, alet ve malzemelerin sterilizasyonunda kullanılan rutin işlemler, bölüm 3.1.'de verilmiştir. Kültür başlatmak için kullanılan bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonu ise, mikroorganizmalardan arındırma ile birlikte canlı dokulara zarar verilmemesini gerektirdiğinden büyük bir hassasiyet taşımaktadır ve bu bölümde deneysel olarak ele alınmıştır. Araştırmada kullanılan lateral tomurcuk ve tohum materyallerine ait sonuçlar hakkında genel bir değerlendirme yapmakta yarar

vardır. Tomurcukların içerisinde bulunduğu vejetasyon dönemi sonuçları etkilediğinden deneylerin yapıldığı tarihlerin de önem taşıdığı belirlenmiştir.

Kiraz lateral tomurcuklarının sterilizasyon protokolünü belirlemek için yapılan çalışmalarda ilerleme kaydetmek uzun zaman almış ve yukarıda sonuçları verilen deneylerden başka çok sayıda deney yapılmıştır. Muna ve ark. (1999) ve Bouzari ve ark. (2009) gibi araştırmacılar da tomurcuk ve sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonunda problemler ile karşılaşmış ve alternatif kimyasallar kullanarak sorunu aşmaya çalışmışlardır.

Tomurcuklarda yüzey sterilizasyon deneylerine ilk olarak 2005 yılı Ocak ayında başlanmıştır. Bu deneylerde tomurcuklar, boğum arası parça ve pullarıyla birlikte kültüre alınmıştır (Yıldırım 2006; Espinosa ve ark. 2006; Channuntapipat ve ark. 2003). Mart ayının ortasına kadar, tomurcukların dinlenme halinde olduğu dönemde yapılan 3 deneyde, çok yüksek oranda bulaşma görülmüş ve sonuçlar değerlendirilmeye alınmamıştır. Çeşitli ön uygulamalar ve farklı konsantrasyonlarda NaOCl kullanılmasına rağmen, bu deneylerde bulaşmaların önüne geçilememiş ve sterilizasyon solüsyonunun yüksek konsantrasyonlarında (>%30) ise, dokuların canlılığını kaybettiği görülmüştür. Çoğunluğu fungus kaynaklı olan bulaşmaların, ilk olarak tomurcuk pullarından çıktığı görülmüş ve uygulanan sterilizasyon solüsyonunun, dinlenme dönemindeki kalın ve katmanlı yapıdaki tomurcuk pullarına nüfuz edemediği anlaşılmıştır. Çalışmaya, ilkbaharda gelişen sürgünlerin üzerinde bulunan ve pulları henüz kalınlaşıp mantarlaşmamış olan tomurcuklarla devam edilmiştir.

İlkbaharda aktif büyümenin başlaması ve sürgünlerin deney için yeterli olgunluğa ulaşmasıyla birlikte yüzey sterilizasyonu çalışmalarına tekrar başlanmıştır. İlk deneylerde, eksplant hazırlanırken kesim yapılan dokuların zarar görmesi nedeniyle ortaya çıkan fenolik bileşik salgıları önemli sorun oluşturmuştur. Besi ortamının kararmasına ve eksplantın ölmesine neden olan fenolik oksidasyonun engellenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Ertürk 2000). Yapılan çalışmalarda, sterilizasyon tamamlandıktan sonra saf su ile 1-2 s yıkama uygulamasının olumlu sonuç verdiği görülmüştür.

Nisan ayında, NaOCl konsantrasyonlarının etkisi incelendiği deney yapılmış, Haziranda bu deney tekrarlanmıştır (Çizelge 4.1 ve 4.2). İki ay ara ile yapılan bu

deneylerde, uygulamalardan elde edilen sonuçların sıralanması benzer şekilde gerçekleşmiştir. İkinci deneyde, sterilizasyon solüsyonunun uygulama süresinin 10 dakikadan 20 dakikaya çıkarılmasına rağmen, hem temiz kültür hem de yaşayan kültür oranlarında azalma görülmüştür. Bu durumun, hızlı bir büyümenin olduğu Nisan ayında sürgünlerin daha temiz kalıyor olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Her iki deneyde de, en iyi sonucu %15 NaOCl uygulaması vermiştir.

NaOCl'nin %15'lik çözeltisinde farklı uygulama sürelerinin dekontaminasyona etkisi belirlenmiş, en iyi sonucu 25 dk uygulaması vermiştir (Çizelge 4.3). Bu deneylerin sonuçlarına göre, sonraki aşamalarda yapılacak kültür başlatma çalışmalarında, %15 NaOCl x 25 dk uygulamasının kullanılması benimsenmiştir.

Yüzey sterilizasyonu deneylerinde dikkati çeken bir husus, tomurcukların içerisinde bulunduğu döneme göre, sonuçların büyük farklılık göstermesidir. Konuyu daha iyi ortaya koymak için, benzer sterilizasyon uygulamalarının yapıldığı, farklı dönemlerdeki tomurcuklara ait sonuçlar bir araya getirilmiştir (Çizelge 4.4). Dinlenme dönemindeki tomurcukların, pul ve boğum arası parçaları ile birlikte kültüre alınması durumunda, yüzey sterilizasyonunun başarılı olmadığı görülmüştür. Vejetasyon dönemindeki deneylerde ise, ilk yapılan kültürler (Nisan) daha başarılı sonuçlar vermiş ve mevsim ilerledikçe bulaşmaların arttığı tespit edilmiştir. Buna göre, yüzey sterilizasyonunun etkinliğinin büyük ölçüde sürgünlerin büyüme hızı ve tomurcukların gelişme durumu ile ilgili olduğu ve tomurcukların ilk olduğu dönemden dinlenme döneminin sonuna kadar giderek artan oranda bulaşma riski taşıdığı sonucuna varılmıştır. Buzkan ve ark. (1997), kiraz anaçlarından yürüttükleri araştırmada, ilkbahar (Mayıs), yaz (Temmuz-Ağustos) ve sonbahar (Eylül-Ekim) dönemlerinde alınarak tomurcuklarla kültür yapmışlar ve en uygun dönemin bahar dönemi olduğunu, yaz döneminde kültürlerin yaşama oranlarının oldukça düşük, bakteriyel bulaşmaların ise çok fazla olduğunu belirtmişlerdir. Yıldırım (2006), kayısı lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonu üzerine yaptığı çalışmada, diğer araştırmacıların sonuçlarına göre, sterilizasyon solüsyonunu düşük konsantrasyonda ve kısa süreli uygulayarak başarı sağlamanın, lateral tomurcukların kış dinlenme dönemi yerine vejetasyon dönemi içerisinde kullanılmasından kaynaklandığını belirtmiştir.

Vejetasyon dönemi içerisinde yeni sürgünler üzerindeki tomurcuklar, sterilizasyon bakımından başarılı olmakla beraber, gelişmeleri iyi olmamıştır. Deney sonunda yaşayan kültür olarak kaydedilen eksplantların çoğu, kültürün ilerleyen dönemlerinde gelişme göstermemiştir. Bu durumda, olgunlaşmasını tamamlamış dormant dönemdeki tomurcukların kullanılması gerekliliği doğmuştur.

Bazı çalışmalarda dinlenme dönemindeki tomurcuklarda, yapılan yüzey sterilizasyonu sonuç vermediğinden, bulaşmaya neden olduğu anlaşılan tomurcuk pullarının, sterilizasyondan sonra eksplanttan uzaklaştırılması ve tomurcukların sürgün parçası olmaksızın kültüre alınması yöntemi denenmiştir (Dradi ve ark. 1996; Pérez-Tornero ve ark. 1999a; Bhagwat ve Lane 2004; Matt ve Jehle 2005). Bizim çalışmamızda izole edilmiş tomurcuklarla yapılan kültürlerde, kullanılan sterilizasyon yöntemi yeterli olmuş, hiçbir bulaşma görülmemiş ve tomurcuklar oldukça iyi gelişme göstermiştir (Çizelge 4.5). Bu sonuçla birlikte, kiraz lateral tomurcuklarının yüzey sterilizasyonu için yapılan deneyler tamamlanmış ve belirlenen sterilizasyon protokolü Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Kiraz lateral tomurcuklarında yüzeysel sterilizasyon protokolü

1. Yaprakların, bir parça yaprak sapı bırakılarak sürgünden uzaklaştırılma,
 2. Sürgünleri akan çeşme suyunda 30 dk yıkama,
 3. Sürgünlerin tek nodlu hale getirilmesi ve saf suda 30 dk bekletme,
 4. %70’lik alkolde 30 sn bırakma ve saf su ile alkolü uzaklaştırma,
 5. %15’lik NaOCl’de (100 ml’ye 2 damla Tween 20 eklenmiş) 25 dk çalkalama,
 6. Steril saf suda 5 x 5 dk hafif çalkalama,
 7. Steril saf suda en az 1 s çalkalayıcıya (150 rpm) bırakma,
 8. Odun dokusundan ve pullarından izole edilen tomurcukları kültüre aktarma.
-

Kültür başlatmada kullanılan tohum materyalinin yüzey sterilizasyon çalışmaları, tomurcuklara oranla çok daha kolay olmuştur. İlk olarak farklı NaOCl konsantrasyonları denenmiş, %15 ve %20 konsantrasyonlarda hiç bulaşma çıkmamıştır (Çizelge 4.6). Daha sonra %15 NaOCl’de farklı uygulama süreleri çalışılmış, uygulamaların hiçbirinde bulaşma görülmemiş, en yüksek çimlenmenin elde edildiği

20 dk uygulamasının kullanılmasına karar verilmiştir (Çizelge 4.7). Deney sonuçlarına göre, kiraz tohumları için belirlenen sterilizasyon protokolü Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Kiraz tohumlarında yüzeysel sterilizasyon protokolü

1. Sert kabuğu kırarak tohumları hazırlama,
2. %70'lik alkolde 60 sn bırakma ve saf su ile alkolü uzaklaştırma,
3. %15'lik NaOCl'de (100 ml'ye 2 damla Tween 20 eklenmiş) 20 dk çalkalama,
4. Steril saf suda 5 x 5 dk elde çalkalama,
5. Steril saf suda en az 1 s çalkalayıcıya bırakma (150 rpm),
6. Tohum kabuğunu soyarak kültüre aktarma

Mikroorganizmalarla bulaşma ve fenolik oksidasyon olayları, odunsu bitkilerin doku kültürü ile üretiminde en önemli problemlerdendir. Ortamdan ve eksplantlardan gelebilecek bulaşmayı önlemek için çok iyi bir sterilizasyon prosedürü oluşturulması gerekmektedir (Ertürk 2000).

Yüzey sterilizasyonu için en fazla kullanılan maddeler etil alkol (EtOH), NaOCl, Ca(OCl)₂, HgCl₂, AgNO₃ ve H₂O₂'dir. Kullanılan bitki parçasına göre bunlardan bir veya birkaçından yararlanılır. Ayrıca, bütün sterilizasyon solüsyonlarında yayıcı yapıştırıcı olarak Tween 20 kullanılması tavsiye edilir (Babaoğlu ve ark. 2002).

Prunus türleri ile kültür başlatma çalışmaları yürüten birçok araştırmacı, belirlediğimiz NaOCl uygulamasına benzer yöntemlerle yüzey sterilizasyonu yapmışlardır:

Hammatt ve Grant (1997), kiraz anaçlarının mikroçoğaltım protokolünü geliştirmek amacıyla yürüttükleri çalışmada, sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonunu %10 NaOCl içerisinde 10 dk beklettikten sonra birkaç defa steril saf suda çalkalayarak tamamlamışlardır. Günel (2006), Gisela-5 ve Maxma-14 anaçlarında sürgünlerin yüzey sterilizasyonunu %70 etil alkol x 3 dk, %20 NaOCl (1-2 damla Tween 20) x 20 dk uygulamaları ile yapmıştır. Fidancı ve ark. (2008), Gisela-5, Maxma-14 ve Tabel Edabriz kiraz anaçlarının sürgün ucu ve yan tomurcuklarında yüzey sterilizasyonunu

%10 NaOCl çözeltisinde 20 dk bırakarak tamamlamışlardır. Espinosa ve ark. (2006) tarafından, *Prunus serotina* üzerinde yapılan çalışmada, lateral tomurcukların yüzey sterilizasyonu; %70 alkolde 30 sn, %15 NaOCl'de 20 dk ve steril saf su ile durulama uygulamalarıyla tamamlanmıştır. Cheong ve Pooler (2004) tarafından *Prunus incisa* üzerinde yürütülen çalışmada, erken ilkbaharda sürgün uçlarından alınan materyalin yüzey sterilizasyonu, sırasıyla 10 dk musluk suyu, 1 dk %70 alkol, 15 dk %15 ticari çamaşır suyu + %0.01 Tween 20 uygulamalarıyla tamamlanmıştır. Morini ve ark. (1991), *Prunus cerasifera*'nın sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonunu %15 NaOCl içerisinde 15 dk bekleterek tamamlamışlardır. Çelik (2008) ile Demirkök (2006) farklı *Prunus* genotiplerinde yürüttükleri çalışmalarda, sürgünlerin yüzey sterilizasyonunu %70'lik etil alkol x 4 dk, %20 NaOCl (birkaç damla Tween 20) x 5 dk uygulamaları ile yapmışlardır. Yıldırım (2006), Hacıhaliloğlu kayısı çeşidinde yürüttüğü araştırmada, tohumlar için %5 NaOCl x 15 dk; lateral tomurcuklarda %5 NaOCl x 10 dk; sürgün uçları için %10 NaOCl x 15 dk uygulamalarının en başarılı yüzey sterilizasyonunu sağladığını bildirmiştir.

Bazı araştırmalarda ise, NaOCl'nin düşük konsantrasyonlarını kullanarak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Özzambak ve Hepaksoy (1997a) vişnenin sürgün uçlarında %2 x 20 dk; Xilogiannis ve ark. (2008), iki kiraz anacının lateral tomurcuklarında %2 x 20 dk; Pérez-Tornero ve ark. (1999b), kayısı çeşitlerinin tomurcuklarında %0.8 x 20 dk; Koubouris ve Vasilakakis (2006), Bebecou kayısı çeşidinin sürgünlerinde %0.75 x 15 dk; Silva ve ark. (2003) bazı *Prunus* anaçlarının tomurcuklarında %1.25 x 15 dk; Murai ve ark. (1997), kayısının tomurcuklarında %1 x 25 dk; Pruski ve ark. (2000) iki *Prunus* türünün tomurcuklarında %1 x 10 dk uygulamalarını kullanmışlardır.

Prunus türlerinde yapılan çalışmalarda bazen sodyum hipoklorit yerine kalsiyum hipoklorit ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) tercih edilmektedir. Matt ve Jehle (2005), kiraz tomurcuklarında %10 x 20 dk; Channuntapipat ve ark. (2003), badem tomurcuklarında %7 x 15 dk; Miguel ve ark. (1996) bademin yeni sürgünlerinde %10 x 30 dk uygulamaları ile $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ kullanarak yüzey sterilizasyonu yapmışlardır.

HgCl_2 , düşük konsantrasyonda etkili olan ve *in vitro* çalışmalarda kullanılan diğer bir kimyasaldır. Ancak, sağlık üzerine olumsuz etkilerinden dolayı pek tercih edilmemektedir:

Muna ve ark. (1999), Maxma-14 kiraz anacı üzerinde yürüttükleri çalışmada, NaOCl ve Ca(OCl)₂'nin arazideki ağaçlardan alınmış eksplantların sterilizasyonunda etkili olmadığını belirtmişlerdir. Bunların yerine %0.01 HgCl₂ + %0.01 Tween 20 içeren sterilizasyon solüsyonunda 8 dk bekleterek yüzey sterilizasyonu yapmışlar, ancak HgCl₂'ün neden olduğu toksik etkinin oranının %50'den fazla olduğu bildirilmiştir. Bouzari ve ark. (2009), PHL-A kiraz anacı üzerinde yürüttükleri çalışmada tomurcuk ve sürgün uçlarının yüzey sterilizasyonu için önce %50 NaOCl 15 dk uygulanmış ancak bulaşma sorunları nedeniyle bundan vazgeçilerek, %0.01 HgCl₂ + birkaç damla Tween 20 ile 10 dk uygulaması benimsenmiştir. Borkowska (1985), Schattenmorelle vişne çeşidinin aktif dönemdeki sürgün uçlarında %0.1 x 10 dk; Kamali ve ark. (2001), GF-677 anacının tomurcuklarında %0.1 x 6 dk; Andreu ve Marín (2005), Adesoto 101 anacının tomurcuklarında %0.05 x 15 dk uygulamaları ile HgCl₂ kullanarak yüzey sterilizasyonu yapmışlardır.

Bunlardan başka, kullanımı fazla yaygın olmayan dikloroizosiyanürik asit (DICA) gibi kimyasallarla da yüzey sterilizasyonu yapılmaktadır (Osterc ve ark. 2004). Ayrıca, fungus kaynaklı bulaşmaları engellemek için bitkisel materyalin fungusit çözeltileri ile muamele edilmesi uygulamaları da, sterilizasyon protokollerinin ön işlemleri arasında yer almaktadır (Demiral ve Ülger 2008; Matt ve Jehle 2005).

Bulaşma sorunlarının sıkça görüldüğü durumlarda, kültür başlatma çalışmalarının sağlıklı bir şekilde yürütülmesi mümkün olmamaktadır. Bu gibi durumlarda, 1-2 haftalık ön kültür yaparak bulaşma olan materyali elemine edip temiz materyal ile çalışmayı başlatmak uygun olmaktadır (Morini ve ark. 1991; Muna ve ark. 1999; Bouzari ve ark. 2009).

4.2. Kültür Başlatma Çalışmaları

4.2.1. Tomurcuklardan Kültür Başlatma Çalışmaları

4.2.1.1. Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına Sitokinin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatılmasına, sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden BAP, TDZ ve kinetinin farklı konsantrasyonlarının besi ortamına ilave edilmesinin etkisi incelenmiştir. Dört haftalık kültür süresinin sonunda,

“Alt Kültüre Alınabilir Eksplant Oranı”, “Rozet Sürgün Oranı” ve “Ortalama Yaprak Sayısı” belirlenmiştir.

Benzilaminopürin

Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP’ın etkisini incelemek üzere yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP’ın etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|---|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0.0 mg ^l ⁻¹ BAP (Kontrol) | 0.0 ± 0.0 c | - | - |
| 0.1 mg ^l ⁻¹ BAP | 20.0 ± 9.2 c | 25.0 ± 25.0 | 1.00 ± 0.00 |
| 0.5 mg ^l ⁻¹ BAP | 50.0 ± 11.5 b | 60.0 ± 16.3 | 3.33 ± 1.23 |
| 1.0 mg ^l ⁻¹ BAP | 60.0 ± 11.2 ab | 50.0 ± 15.1 | 1.50 ± 0.50 |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP | 80.0 ± 9.2 a | 43.8 ± 12.8 | 1.71 ± 0.36 |
| 4.0 mg ^l ⁻¹ BAP | 65.0 ± 10.9 ab | 53.9 ± 14.4 | 3.86 ± 1.22 |
| | F= 9.935 sd= 5, 114 P= 0.0001 | F= 0.401 sd= 4, 50 P>0.05 | F= 1.514 sd= 4, 23 P>0.05 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Alt kültüre alınabilir eksplant oranı bakımından, uygulamalar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$). En yüksek oran (80 ± 9) 2.0 mg^l⁻¹ BAP uygulamasından elde edilmiştir. Rozet sürgün oluşturma oranı, sırasıyla 0.5 mg^l⁻¹ (60 ± 16) ve 4.0 mg^l⁻¹ (54 ± 14) konsantrasyonlarında en yüksek bulunmuştur. Yaprak sayısı bakımından, 4.0 mg^l⁻¹ BAP en başarılı uygulama olmuş, rozet başına 3.9 ± 1.2 adet yaprak elde edilmiştir. Farklı BAP konsantrasyonlarında elde edilen rozet sürgünlerin hepsi canlı bir görünüme sahip olup, kültür sonuna kadar bu canlılıklarını korumuşlardır.

Thidiazuron

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmaya TDZ'nin farklı konsantrasyonlarının etkisini incelemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Tomurcuklardan kültür başlatmaya TDZ'nin etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|---|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0.0 mg ^l ⁻¹ TDZ (Kontrol) | 0.0 ± 0.0 c | - | - |
| 0.05 mg ^l ⁻¹ TDZ | 0.0 ± 0.0 c | - | - |
| 0.1 mg ^l ⁻¹ TDZ | 0.0 ± 0.0 c | - | - |
| 0.5 mg ^l ⁻¹ TDZ | 60.0 ± 11.2 b | 75.0 ± 13.1 | 2.44 ± 0.53 |
| 1.0 mg ^l ⁻¹ TDZ | 100.0 ± 0.0 a | 90.0 ± 6.9 | 2.00 ± 0.26 |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ | 100.0 ± 0.0 a | 100.0 ± 0.0 | 2.74 ± 0.30 |
| 4.0 mg ^l ⁻¹ TDZ | 95.0 ± 5.0 a | 89.5 ± 7.2 | 2.29 ± 0.28 |
| | F= 110.95 sd= 6, 132 P= 0.0001 | F= 1.735 sd= 3, 66 P>0.05 | F= 1.071 sd= 3, 59 P>0.05 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Bu deneyde, diğer büyüme düzenleyicilerdeki konsantrasyonlara ilaveten, TDZ'nin düşük konsantrasyonda etkili olduğu (Huetteman ve Preece 1993) dikkate alınarak, 0.05 mg^l⁻¹ uygulaması yapılmıştır. Ancak, 0.1 mg^l⁻¹ ve altındaki konsantrasyonlarda hiçbir eksplantta gelişme olmamıştır. Uygulamalar arasındaki fark alt kültüre alınabilir eksplant oranı bakımından istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P<0.01). Bütün parametrelerde en yüksek değerleri 2.0 mg^l⁻¹ TDZ uygulaması vermiş; alt kültüre alınabilir eksplant ve rozet sürgün oranları %100, rozet başına yaprak sayısı 2.7 ± 0.3 adet olarak belirlenmiştir. Kullanılan tüm TDZ konsantrasyonlarında, ilk 2 haftada çok hızlı gelişme olmasına rağmen, daha sonra büyümenin durakladığı ve düşük konsantrasyonlardan başlayarak eksplantların kararır canlılığını kaybettiği gözlenmiştir.

Daha geç ortaya çıkmakla beraber, aynı durum kültür süresinin sonuna doğru yüksek konsantrasyonlarda da belirli oranda görülmüştür.

Kinetin

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmaya farklı kinetin konsantrasyonlarının etkisinin incelendiği çalışmada elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Tomurcuklardan kültür başlatmaya kinetin etkisi*

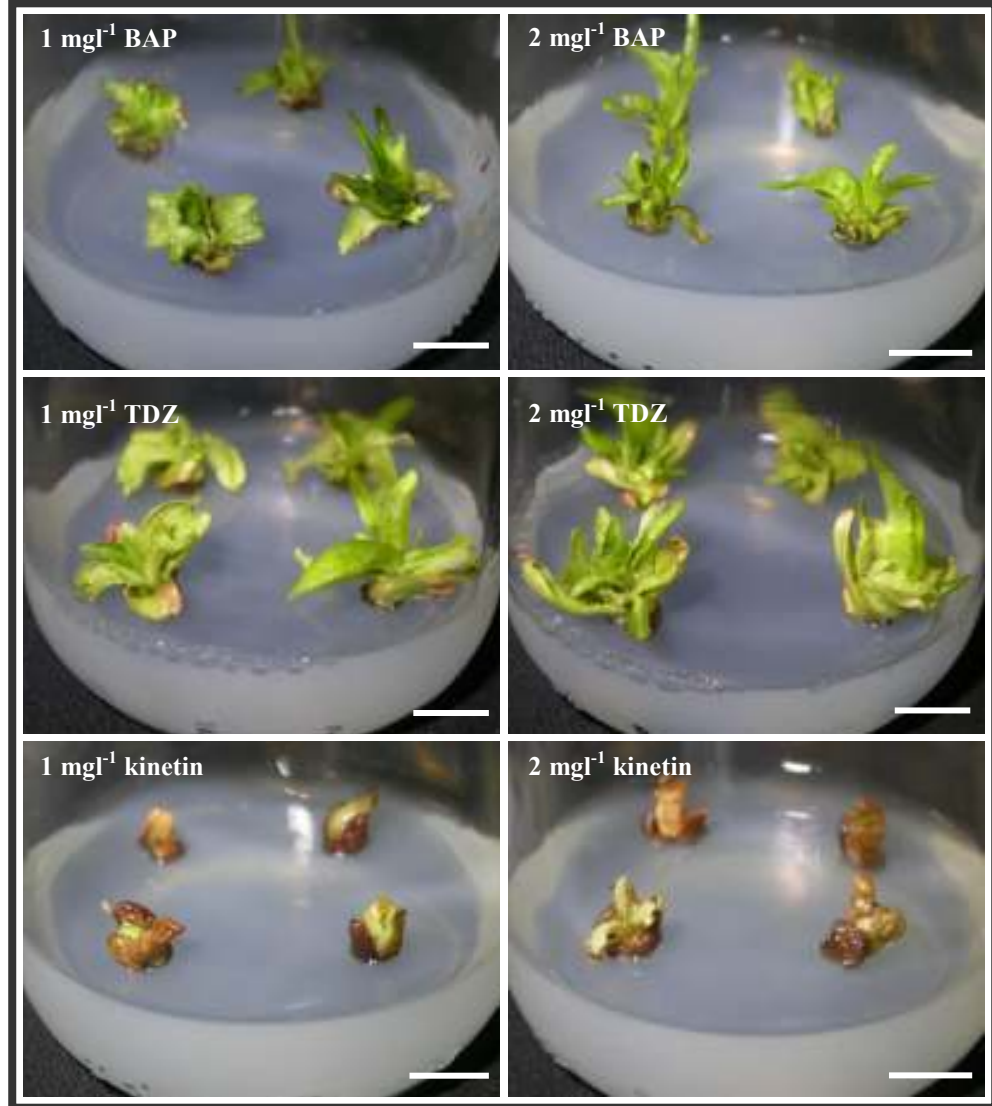
| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|---|-------------------------------------|------------------|----------------------|
| 0.0 mgI ⁻¹ kinetin (Kontrol) | 0.0 ± 0.0 b | - | - |
| 0.1 mgI ⁻¹ kinetin | 0.0 ± 0.0 b | - | - |
| 0.5 mgI ⁻¹ kinetin | 0.0 ± 0.0 b | - | - |
| 1.0 mgI ⁻¹ kinetin | 0.0 ± 0.0 b | - | - |
| 2.0 mgI ⁻¹ kinetin | 0.0 ± 0.0 b | - | - |
| 4.0 mgI ⁻¹ kinetin | 20.0 ± 9.2 a | 100.0 ± 0.0 | 1.50 ± 0.50 |
| F= 4.552 sd= 5, 110 P= 0.001 | | | |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Bu deneyde, tomurcuklarda sadece patlama seviyesinde gelişme görülmüş ve kültürün 3. haftasından itibaren bütün serilerde eksplantlar kararmaya başlayarak canlılıklarını kaybetmişlerdir. Kültür sonunda, sadece 4 mgI⁻¹ kinetin serisinde %20 ± 9 oranında alt kültüre alınabilir eksplant elde edilebilmiş.

Kültür başlatma çalışmalarının temel büyüme düzenleyicileri olan bu 3 sitokinin ile yapılan deneyler sonucunda; kinetinin 4 mgI⁻¹ konsantrasyona kadar, kiraz için bu aşamada uygun olmadığı anlaşılmıştır. TDZ, en başarılı sonuçları vermiş, ancak elde edilen rozet sürgünlerin canlılığında kültür süresinin sonuna doğru azalmalar görülmüş ve normal süreden 1 hafta fazla bırakılan deney harici kültürlerde önemli oranda

ölümlerin olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle sonraki deneylerde sadece TDZ'nin değil, daha sağlıklı rozet sürgünler veren BAP'ın da kullanılmasının uygun olacağı anlaşılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Farklı sitokininlerle desteklenen besi ortamında, kültürün 28. gününde, lateral tomurcuklardan gelişen rozet sürgünler (Bar: 1.0 cm)

4.2.1.2. Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına BAP ile Birlikte Kullanılan Oksin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi

İlk aşamadaki deneylerde belirlenen en uygun sitokin tip ve konsantrasyonlarından biri olan 2 mg l^{-1} BAP ile birlikte, oksin grubu büyüme düzenleyicilerinden IAA, IBA, NAA ve 2,4-D'nin, 0.05, 0.1, 0.3 ve 0.5 mg l^{-1} konsantrasyonlarda besi ortamına ilavesinin kültür başlatmaya etkisi incelenmiştir.

İndol Asetik Asit

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmaya, 2 mg l^{-1} BAP ile birlikte besi ortamına eklenen IAA'nın etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP ile birlikte kullanılan IAA'nın etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 2.0 mg l^{-1} BAP (Kontrol) | 80.0 ± 9.2 | 43.8 ± 12.8 | 1.71 ± 0.36 |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.05 mg l^{-1} IAA | 75.0 ± 9.9 | 40.0 ± 13.1 | 1.33 ± 0.33 |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.1 mg l^{-1} IAA | 75.0 ± 9.9 | 53.3 ± 13.3 | 1.63 ± 0.32 |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} IAA | 70.0 ± 10.5 | 71.4 ± 12.5 | 2.20 ± 0.55 |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IAA | 100.0 ± 0.0 | 80.0 ± 9.2 | 3.00 ± 0.43 |
| | F= 1.753 sd= 4, 95 P>0.05 | F= 2.229 sd= 4, 75 P>0.05 | F= 2.351 sd= 4, 42 P>0.05 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

İncelenen parametrelerde, uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. En yüksek alt kültüre alınabilir eksplant oranı, 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IAA uygulamasında %100 olarak belirlenmiştir. Rozet sürgün oranı ve ortalama yaprak sayısında, kontrol grubu dışında IAA konsantrasyonu ile paralel bir artış söz konusudur. Bütün parametrelerde 2 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IAA uygulaması en başarılı bulunmuştur.

İndol Butirik Asit

Kültür başlatmaya, 2 mg l^{-1} BAP ile birlikte kullanılan farklı IBA konsantrasyonlarının etkisini belirlemek üzere yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.14’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP ile birlikte kullanılan IBA’nın etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 2.0 mg l^{-1} BAP (Kontrol) | 80.0 ± 9.2 | 43.8 ± 12.8 | 1.71 ± 0.36 |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.05 mg l^{-1} IBA | 85.0 ± 8.2 | 58.8 ± 12.3 | 3.90 ± 1.25 |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.1 mg l^{-1} IBA | 80.0 ± 9.2 | 43.8 ± 12.8 | 4.57 ± 1.29 |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} IBA | 70.0 ± 10.5 | 57.1 ± 13.7 | 5.13 ± 1.92 |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IBA | 70.0 ± 10.5 | 35.7 ± 13.3 | 3.60 ± 1.21 |
| | F= 0.493 sd= 4, 95 P>0.05 | F= 0.565 sd= 4, 72 P>0.05 | F= 0.670 sd= 4, 32 P>0.05 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Alt kültüre alınabilir eksplant oranı $\%85.0 \pm 8.2$ ve rozet sürgün oranı $\%58 \pm 12$ olan 2 mg l^{-1} BAP + 0.05 mg l^{-1} IBA uygulaması en iyi sonuçları vermiştir. Ortalama yaprak sayısı yönünden 2 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} IBA uygulaması daha başarılı olmuş, ortalama 5.1 ± 1.9 adet yaprak tespit edilmiştir.

Naftalen Asetik Asit

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmaya, 2 mg l^{-1} BAP ile birlikte besi ortamına eklenen farklı NAA konsantrasyonlarının etkisi üzerine yapılan deneyde alınan sonuçlar Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Bütün parametrelerde uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$). Alt kültüre alınabilir eksplant oranı kontrol grubu hariç bütün uygulamalarda $\%100$ olarak bulunmuştur. Yine kontrol grubu dışında, rozet

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

sürgün oluşturma oranı 80 ± 9 ile 95 ± 5 arasında gerçekleşmiştir. En yüksek yaprak sayısı 6.5 ± 0.7 adet ile, 2 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} NAA uygulamasından elde edilmiş, bunu 5.3 ± 0.8 adet ile 2 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} NAA uygulaması izlemiştir.

Çizelge 4.15. Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP ile birlikte kullanılan NAA'nın etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 2.0 mg l^{-1} BAP (Kontrol) | 80.0 ± 9.2 b | 43.8 ± 12.8 b | 1.71 ± 0.36 d |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.05 mg l^{-1} NAA | 100.0 ± 0.0 a | 80.0 ± 9.2 a | 2.88 ± 0.58 cd |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.1 mg l^{-1} NAA | 100.0 ± 0.0 a | 95.0 ± 5.0 a | 3.84 ± 0.72 bc |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} NAA | 100.0 ± 0.0 a | 95.0 ± 5.0 a | 6.47 ± 0.66 a |
| 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} NAA | 100.0 ± 0.0 a | 95.0 ± 5.0 a | 5.32 ± 0.79 ab |
| | F= 4.750 sd= 4, 95 P= 0.002 | F= 7.621 sd= 4, 91 P= 0.0001 | F= 6.735 sd= 4, 75 P= 0.0001 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Bu deneyde, NAA konsantrasyonu ile birlikte artan bir oranda, eksplant tabanında kallus oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca, özellikle 0.3 ve 0.5 mg l^{-1} NAA içeren ortamlardaki kültürlerde, fazla sayıda fakat küçük boyutlu yaprakların oluştuğu görülmüştür. Bu durum, düşük NAA konsantrasyonlarında da gözlenmiş, ancak daha az belirgin olmuştur.

2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit

Kültür başlatmaya, 2 mg l^{-1} BAP ile birlikte kullanılan farklı 2,4-D konsantrasyonlarının etkisini belirlemek üzere yapılan deneyde, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Bu deneyde, rozet sürgün oranı ($P < 0.01$) ve ortalama yaprak sayısı ($P < 0.05$) bakımından uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Alt kültüre alınabilir eksplant oranı 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.05 mg l^{-1} 2,4-D uygulamasında %100'e ulaşmıştır. Rozet sürgün oranı 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} 2,4-D uygulamasında

(%93 ± 7), yaprak sayısı ise 2.0 mg^l⁻¹ BAP + 0.1 mg^l⁻¹ 2,4-D uygulamasında (6.1 ± 1.1 adet) en yüksek değerleri göstermiştir.

Çizelge 4.16. Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP ile birlikte kullanılan 2,4-D'nin etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP (Kontrol) | 80.0 ± 9.2 | 43.8 ± 12.8 c | 1.71 ± 0.36 c |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP + 0.05 mg ^l ⁻¹ 2,4-D | 100.0 ± 0.0 | 70.0 ± 10.5 ab | 4.21 ± 0.72 ab |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP + 0.1 mg ^l ⁻¹ 2,4-D | 75.0 ± 9.9 | 80.0 ± 10.7 a | 6.08 ± 1.11 a |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP + 0.3 mg ^l ⁻¹ 2,4-D | 77.8 ± 10.1 | 92.9 ± 7.1 a | 2.77 ± 0.48 bc |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP + 0.5 mg ^l ⁻¹ 2,4-D | 95.0 ± 5.0 | 42.1 ± 11.6 c | 3.25 ± 0.49 abc |
| | F= 2.088 sd= 4, 93 P>0.05 | F= 3.911 sd= 4, 79 P= 0.006 | F= 3.386 sd= 4, 49 P= 0.016 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

4.2.1.3. Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına TDZ ile Birlikte Kullanılan Oksin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi

Sitokinin deneylerinde belirlenen en uygun sitokinin tip ve konsantrasyonlarından diğeri olan 2 mg^l⁻¹ TDZ ile birlikte, oksin grubu büyüme düzenleyicilerinden IAA, IBA, NAA ve 2,4-D'nin, 0.05, 0.1, 0.3 ve 0.5 mg^l⁻¹ konsantrasyonlarda besi ortamına ilavesinin kültür başlatmaya etkisi incelenmiştir.

İndol Asetik Asit

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmaya, 2 mg^l⁻¹ TDZ ile birlikte besi ortamına eklenen IAA'nın etkisini belirlemek üzere yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.17'de verilmiştir.

Alt kültüre alınabilir eksplant oranı kontrol grubunda yüksek bulunmuş (%100), ancak istatistiki farklılık ortaya çıkmamıştır. Rozet sürgün oranı ve ortalama yaprak sayısı bakımından, uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P<0.01). En yüksek rozet sürgün oranı %100 ile, kontrol, 2 mg^l⁻¹ TDZ + 0.1 mg^l⁻¹ IAA ve 2 mg^l⁻¹ TDZ + 0.5 mg^l⁻¹ IAA uygulamalarından alınmıştır. Ortalama

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

yaprak sayısı ise, 6.3 ± 0.6 adet ile yine 2 mg l^{-1} TDZ + 0.5 mg l^{-1} IAA uygulamasında en yüksek değere ulaşmıştır.

Çizelge 4.17. Tomurcuklardan kültür başlatmaya TDZ ile birlikte kullanılan IAA'nın etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 2.0 mg l^{-1} TDZ (Kontrol) | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 a | 2.74 ± 0.30 c |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.05 mg l^{-1} IAA | 80.0 ± 9.2 | 75.0 ± 11.1 b | 5.17 ± 0.52 ab |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.1 mg l^{-1} IAA | 95.0 ± 5.0 | 100.0 ± 0.0 a | 4.32 ± 0.70 bc |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.3 mg l^{-1} IAA | 94.4 ± 5.6 | 82.4 ± 9.5 ab | 5.43 ± 0.68 ab |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.5 mg l^{-1} IAA | 95.0 ± 5.0 | 100.0 ± 0.0 a | 6.26 ± 0.59 a |
| | F= 1.714 sd= 4, 92 P>0.05 | F= 3.826 sd= 4, 85 P= 0.007 | F=5.600 sd= 4, 78 P= 0.001 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

İndol Butirik Asit

Kültür başlatmaya, 2 mg l^{-1} TDZ ile birlikte kullanılan farklı IBA konsantrasyonlarının etkisini belirlemek üzere yapılan deneye ait sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Tomurcuklardan kültür başlatmaya TDZ ile birlikte kullanılan IBA'nın etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--|-------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 2.0 mg l^{-1} TDZ (Kontrol) | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 2.74 ± 0.30 c |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.05 mg l^{-1} IBA | 100.0 ± 0.0 | 90.0 ± 6.9 | 6.72 ± 0.54 ab |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.1 mg l^{-1} IBA | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 5.85 ± 0.65 b |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.3 mg l^{-1} IBA | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 7.67 ± 0.52 a |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.5 mg l^{-1} IBA | 100.0 ± 0.0 | 90.0 ± 6.9 | 6.22 ± 0.60 ab |
| | sd= 4, 89 | F= 1.420 sd= 4, 89 P>0.05 | F= 14.102 sd= 4, 85 P= 0.0001 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Alt kültüre alınabilir eksplant oranı bütün uygulamalarda %100 olarak gerçekleşirken, rozet sürgün oluşturma oranı da 90 ± 7 ile %100 arasında yine yüksek değerler göstermiştir. Ortalama yaprak sayısı bakımından uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmuş ($P < 0.01$), en yüksek sonuçlar, 7.7 ± 0.5 adet ile 2 mg l^{-1} TDZ + 0.3 mg l^{-1} IBA uygulamasından elde edilmiştir.

Naftalen Asetik Asit

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmaya, 2 mg l^{-1} TDZ ile birlikte besi ortamına eklenen farklı NAA konsantrasyonlarının etkisini üzerine yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.19’da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Tomurcuklardan kültür başlatmaya TDZ ile birlikte kullanılan NAA’nın etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--|-------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 2.0 mg l^{-1} TDZ (Kontrol) | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 2.74 ± 0.30 c |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.05 mg l^{-1} NAA | 94.7 ± 5.3 | 100.0 ± 0.0 | 6.72 ± 0.67 ab |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.1 mg l^{-1} NAA | 94.7 ± 5.3 | 100.0 ± 0.0 | 5.22 ± 0.51 b |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.3 mg l^{-1} NAA | 95.0 ± 5.0 | 100.0 ± 0.0 | 7.53 ± 0.73 a |
| 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.5 mg l^{-1} NAA | 100.0 ± 0.0 | 95.0 ± 5.0 | 5.42 ± 0.40 b |
| | F= 0.505 sd= 4, 92 P>0.05 | F= 0.922 sd= 4, 89 P>0.05 | F= 11.388 sd= 4, 88 P= 0.0001 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Alt kültüre alınabilir eksplant ve rozet sürgün oranları bakımından, uygulamalar arasında önemli bir farklılık görülmemiş ve her iki parametrede 95 ± 5 ile %100 arasında oranlar belirlenmiştir. Ortalama yaprak sayısı bakımından farklılık önemli bulunmuş ($P < 0.01$) ve en yüksek yaprak sayısı, 7.5 ± 0.7 adet ile 2.0 mg l^{-1} TDZ + 0.3 mg l^{-1} NAA uygulamasından alınmıştır.

Bu deneyde elde edilen rozet sürgünlerin tabanlarında yoğun bir kallus gelişimi olduğu ve gevşek yapılı bu dokuların alt kültür yapılırken düzgün bir kesime olanak vermediği görülmüştür.

2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit

Kültür başlatmaya, 2 mg^l⁻¹ TDZ ile birlikte kullanılan farklı 2,4-D konsantrasyonlarının etkisini belirlemek üzere yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.20’de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Tomurcuklardan kültür başlatmaya TDZ ile birlikte kullanılan 2,4-D’nin etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ (Kontrol) | 100.0 ± 0.0 a | 100.0 ± 0.0 | 2.74 ± 0.30 b |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ + 0.05 mg ^l ⁻¹ 2,4-D | 95.0 ± 5.0 ab | 89.5 ± 7.2 | 4.12 ± 0.38 a |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ + 0.1 mg ^l ⁻¹ 2,4-D | 95.0 ± 5.0 ab | 89.5 ± 7.2 | 3.65 ± 0.37 ab |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ + 0.3 mg ^l ⁻¹ 2,4-D | 100.0 ± 0.0 a | 90.0 ± 6.9 | 5.17 ± 0.65 a |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ + 0.5 mg ^l ⁻¹ 2,4-D | 80.0 ± 9.2 b | 93.8 ± 6.3 | 4.27 ± 0.64 a |
| | F= 2.471 sd= 4, 94 P= 0.05 | F= 0.546 sd= 4, 88 P>0.05 | F= 3.327 sd= 4, 81 P= 0.014 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

İncelenen her üç parametre bakımından 2 mg^l⁻¹ TDZ + 0.3 mg^l⁻¹ 2,4-D uygulaması kontrol grubu ile birlikte en başarılı sonuçları vermiştir. Bu uygulamada, alt kültüre alınabilir eksplant oranı %100, rozet sürgün oranı %90 ± 7 ve rozet başına ortalama yaprak sayısı 5.2 ± 0.7 adet olarak tespit edilmiştir. Alt kültüre alınabilir eksplant oranı ve ortalama yaprak sayısı bakımından uygulamalar arasındaki farklılık önemli bulunmuştur (P≤0.05).

2,4-D’li besi ortamındaki kültürlerde de, eksplant tabanında kallus oluşumu görülmüştür, ancak bu oluşum NAA’lı ortamlardakine göre çok daha az olmuştur.

4.2.1.4. Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına BAP ile Birlikte Kullanılan GA₃'ün Etkisi

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmaya BAP ile birlikte besi ortamına ilave edilen GA₃'ün etkisinin incelendiği bu deneyde alınan sonuçlar Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Tomurcuklardan kültür başlatmaya BAP ile birlikte kullanılan GA₃'ün etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|---|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 2.0 mg ^l -1 BAP (Kontrol) | 57.4 ± 6.8 | 90.3 ± 5.4 | 2.89 ± 0.39 |
| 2.0 mg ^l -1 BAP + 0.3 mg ^l -1 GA ₃ | 55.1 ± 7.2 | 88.9 ± 6.2 | 4.33 ± 0.54 |
| | t= 0.233 sd= 101 P>0.05 | t= -0.176 sd= 56 P>0.05 | t= -1.989 sd= 50 P>0.05 |

* : Her seride 50 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Alt kültüre alınabilir eksplant ve rozet sürgün oranları bakımından, uygulamalar arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmamış, daha yüksek oranları veren kontrol grubundan sırasıyla %57 ± 7 ve %90 ± 5 değerleri elde edilmiştir. Rozet başına ortalama yaprak sayısı bakımından, GA₃ ilaveli besi ortamından daha yüksek yaprak sayısı (4.3 ± 0.5 adet) alınmış ancak istatistiki farklılık oluşmamıştır.

4.2.1.5. Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasında Başarılı Bulunan Büyüme Düzenleyicilerin Etkilerinin Tekrarlanabilirliği

Bu deneyde, kültür başlatma çalışmaları kapsamında önceki aşamalarda yapılan büyüme düzenleyici deneylerinde elde edilen en başarılı uygulamaların farklı dönemlerde yapılan kültürlerle tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Kültürler, 18 Ekim, 22 Aralık, 27 Şubat ve 23 Mart tarihlerinde yapılmıştır. TDZ içeren kombinasyonlar, ilk iki kültür döneminde başarılı sonuçlar vermediğinden sonraki iki kültürde sadece BAP'lı kombinasyonlar yer almıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.22, 4.23, 4.24'de verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Alt kültüre alınabilir eksplant oranı bakımından, 27 Şubat haricindeki diğer dönemlerde ve dönem ortalamalarında, uygulamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$). Her iki büyüme düzenleyicinin kullanıldığı ilk iki deneyde BAP içeren besi ortamlarında TDZ'li ortamlara göre daha yüksek oranlar elde edilmiştir. Dönemlerin ortalamasına göre, 2 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IAA (97 ± 2) ve 2 mg l^{-1} BAP (95 ± 2) uygulamaları en yüksek alt kültüre alınabilir eksplant oranlarını vermişlerdir (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. Tomurcuklardan kültür başlatmada başarılı bulunan büyüme düzenleyicilerin etkilerinin tekrarlanabilirliği (Alt kültüre alınabilir eksplant oranı)*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu (mg l^{-1}) | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | | | | |
|--|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | 18 Ekim | 22 Aralık | 27 Şubat | 23 Mart | Ortalama |
| 2.0 BAP | 100.0 ± 0.0 a | 100.0 ± 0.0 a | 95.5 ± 4.5 | 84.2 ± 8.6 ab | 95.3 ± 2.3 a |
| 2.0 BAP + 0.5 IAA | 100.0 ± 0.0 a | 95.7 ± 4.3 a | 89.5 ± 7.2 | 100.0 ± 0.0 a | 96.6 ± 2.0 a |
| 2.0 BAP + 0.3 NAA | 100.0 ± 0.0 a | 95.8 ± 4.2 a | 76.9 ± 8.4 | 68.4 ± 11.0 b | 85.2 ± 3.8 bc |
| 2.0 BAP + 0.3 2,4-D | 100.0 ± 0.0 a | 83.3 ± 7.8 ab | 86.4 ± 7.5 | 86.7 ± 9.1 ab | 88.6 ± 3.6 ab |
| 2.0 BAP + 0.3 GA ₃ | 76.9 ± 12.2 abc | 100.0 ± 0.0 a | 96.6 ± 3.4 | 60.6 ± 6.1 b | 77.3 ± 3.7 c |
| 2.0 TDZ | 100.0 ± 0.0 a | 66.7 ± 9.8 bc | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.5 IAA | 59.1 ± 10.7 cd | 54.2 ± 10.4 c | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.3 IBA | 53.3 ± 13.3 d | 50.0 ± 10.4 cd | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.3 NAA | 83.3 ± 9.0 ab | 43.5 ± 10.6 cd | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.3 2,4-D | 70.6 ± 11.4 bcd | 29.2 ± 9.5 d | - | - | - |
| | F= 6.341 sd= 9, 175 P= 0.0001 | F= 11.454 sd= 9, 228 P= 0.0001 | F= 1.687 sd= 4, 113 P>0.05 | F= 4.206 sd= 4, 134 P= 0.003 | F= 6.343 sd= 4, 466 P= 0.0001 |

* : Her seride en az 24 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Rozet sürgün oranı bakımından, 18 Ekim ($P<0.01$), 27 Şubat ve dönem ortalamalarında ($P<0.05$), uygulamalar arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmuştur. Dönemlerin ortalamasına göre, 2 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IAA ($\%98 \pm 2$) ve 2 mg l^{-1} BAP + 0.3 NAA ($\%97 \pm 2$) uygulamaları en yüksek rozet sürgün oranlarını vermişlerdir (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23. Tomurcuklardan kültür başlatmada başarılı bulunan büyüme düzenleyicilerin etkilerinin tekrarlanabilirliği (Rozet sürgün oranı)*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu (mg l^{-1}) | Rozet Sürgün (%) | | | | |
|--|-------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|-------------|------------------------------------|
| | 18 Ekim | 22 Aralık | 27 Şubat | 23 Mart | Ortalama |
| 2.0 BAP | 95.0 ± 5.0 ab | 79.2 ± 8.5 | 100.0 ± 0.0 a | 100.0 ± 0.0 | 92.6 ± 2.9 ab |
| 2.0 BAP + 0.5 IAA | 100.0 ± 0.0 a | 95.5 ± 4.5 | 94.1 ± 5.9 a | 100.0 ± 0.0 | 97.6 ± 1.7 a |
| 2.0 BAP + 0.3 NAA | 100.0 ± 0.0 a | 95.7 ± 4.3 | 95.0 ± 5.0 a | 100.0 ± 0.0 | 97.3 ± 1.9 a |
| 2.0 BAP + 0.3 2,4-D | 83.3 ± 9.0 ab | 85.0 ± 8.2 | 79.0 ± 9.6 b | 100.0 ± 0.0 | 85.7 ± 4.2 b |
| 2.0 BAP + 0.3 GA ₃ | 70.0 ± 15.3 bc | 79.2 ± 8.5 | 100.0 ± 0.0 a | 100.0 ± 0.0 | 92.2 ± 2.7 ab |
| 2.0 TDZ | 94.4 ± 5.6 ab | 93.8 ± 6.3 | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.5 IAA | 76.9 ± 12.2 abc | 100.0 ± 0.0 | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.3 IBA | 75.0 ± 16.4 abc | 83.3 ± 11.2 | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.3 NAA | 53.3 ± 13.3 c | 80.0 ± 13.3 | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.3 2,4-D | 25.0 ± 13.1 d | 100.0 ± 0.0 | - | - | - |
| | F= 7.464 sd= 9, 148 P= 0.0001 | F= 1.164 sd= 9, 161 P>0.05 | F= 3.011 sd= 4, 100 P= 0.022 | sd= 4, 97 | F= 2.798 sd= 4, 407 P= 0.026 |

* : Her seride en az 24 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Ortalama yaprak sayıları arasındaki farklılıklar, 18 Ekim ($P<0.01$), 22 Aralık ($P<0.05$) ve dönem ortalamalarında ($P<0.01$) istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Bir dönem hariç bütün dönemlerde 2 mg l^{-1} BAP + 0.3 NAA kombinasyonu en başarılı uygulama olarak öne çıkmış ve dönem ortalamalarına göre rozet sürgün başına 6.9 ± 0.4 adet yaprak oluşturmuştur (Çizelge 4.24).

Çizelge 4.24. Tomurcuklardan kültür başlatmada başarılı bulunan büyüme düzenleyicilerin etkilerinin tekrarlanabilirliği (Yaprak sayısı)*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu (mg l^{-1}) | Yaprak Sayısı (adet) | | | | |
|--|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| | 18 Ekim | 22 Aralık | 27 Şubat | 23 Mart | Ortalama |
| 2.0 BAP | 5.16 ± 0.49 bc | 4.37 ± 0.55 ab | 3.48 ± 0.47 | 4.56 ± 0.49 | 4.36 ± 0.26 b |
| 2.0 BAP + 0.5 IAA | 7.36 ± 0.40 ab | 5.19 ± 0.91 ab | 3.25 ± 0.43 | 5.20 ± 0.56 | 5.48 ± 0.34 b |
| 2.0 BAP + 0.3 NAA | 9.79 ± 0.47 a | 8.18 ± 0.85 a | 2.89 ± 0.34 | 6.54 ± 0.62 | 6.93 ± 0.44 a |
| 2.0 BAP + 0.3 2,4-D | 5.27 ± 0.49 bc | 4.94 ± 0.86 ab | 3.07 ± 0.56 | 5.62 ± 0.76 | 4.70 ± 0.36 b |
| 2.0 BAP + 0.3 GA_3 | 3.43 ± 0.97 de | 3.95 ± 0.68 b | 3.39 ± 0.27 | 5.90 ± 0.43 | 4.57 ± 0.28 b |
| 2.0 TDZ | 3.94 ± 0.50 cd | 3.67 ± 0.41 b | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.5 IAA | 1.60 ± 0.27 f | 3.54 ± 0.37 b | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.3 IBA | 1.83 ± 0.40 ef | 4.90 ± 0.71 ab | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.3 NAA | 6.88 ± 1.09 b | 6.50 ± 1.07 ab | - | - | - |
| 2.0 TDZ + 0.3 2,4-D | 3.67 ± 1.33 cd | 6.14 ± 1.28 ab | - | - | - |
| | F= 18.216 sd= 9, 119 P= 0.0001 | F= 2.342 sd= 9, 141 P= 0.017 | F= 0.477 sd= 4, 94 P>0.05 | F= 1.529 sd= 4, 97 P>0.05 | F= 5.776 sd= 4, 379 P= 0.0001 |

* : Her seride en az 24 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

4.2.1.6. Tomurcuklardan Kültür Başlatılmasına Şeker Tip ve Karışımlarının Etkisi

Kültür başlatmaya farklı şeker tiplerinin etkisini belirlemek üzere yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.25’de verilmiştir.

Çizelge 4.25. Tomurcuklardan kültür başlatmaya şeker tiplerinin etkisi*

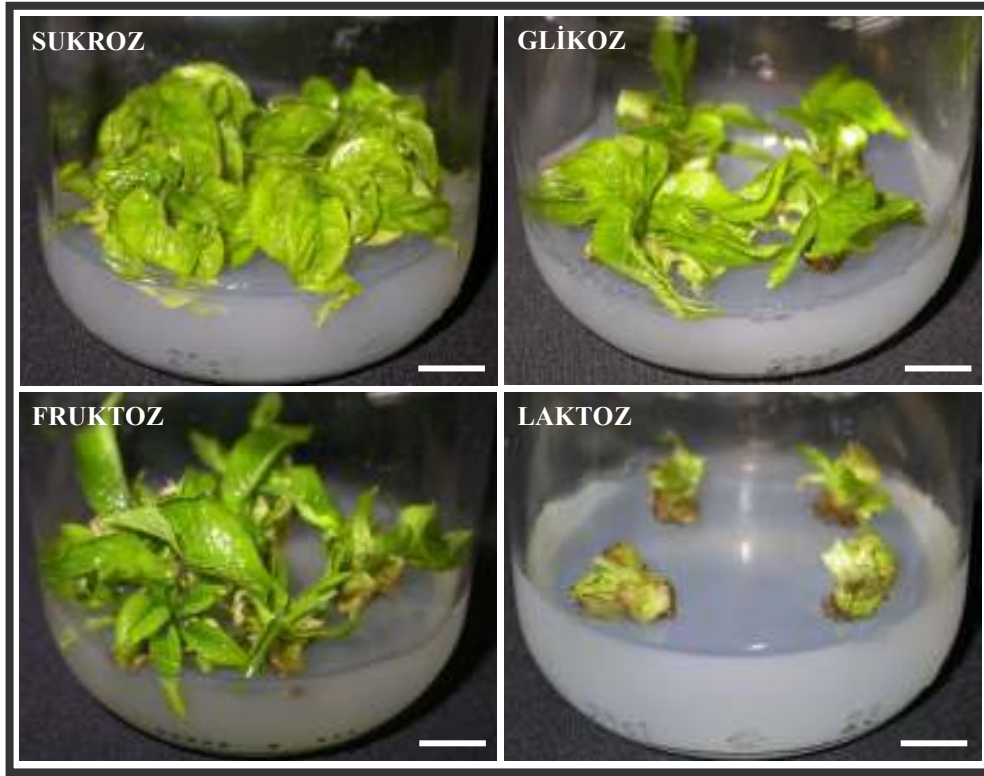
| Şeker Tipi ve Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| 30 gL ⁻¹ Sukroz | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 a | 4.95 ± 0.48 a |
| 30 gL ⁻¹ Glikoz | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 a | 5.10 ± 0.71 a |
| 30 gL ⁻¹ Fruktoz | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 a | 4.94 ± 0.50 a |
| 30 gL ⁻¹ Laktoz | 100.0 ± 0.0 | 15.8 ± 8.6 b | 1.00 ± 0.00 b |
| | sd= 3, 73 | F= 97.755 sd= 3, 73 P= 0.0001 | F= 4.852 sd= 3, 57 P= 0.004 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Alt kültüre alınabilir eksplant oranı bütün uygulamalarda %100 olarak elde edilmiştir. Rozet sürgün oranı ve ortalama yaprak sayısında, uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). Sukroz, glikoz ve fruktoz ilave edilen besi ortamlarında eksplantların tamamı rozet oluşturmuştur. Bu üç uygulamada, yaprak sayıları da birbirine benzer sonuçlar göstererek 4.9 ± 0.5 ile 5.1 ± 0.7 adet arasında değişmiştir. Laktoz içeren besi ortamında ise, eksplantların canlı kaldığı halde gelişmedikleri görülmüştür (Şekil 4.3).

Şeker tipi deneyinde, sonuçları birbirine benzer olan sukroz, glikoz ve fruktozun karışım halinde kullanılmasının etkisini incelemek üzere diğer bir deney düzenlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.26’da verilmiştir.

Oransal veriler bakımından tüm uygulamalar başarılı olup istatistiki fark belirlenmezken, ortalama yaprak sayısında sukrozun tek başına kullanılmasının istatistiki olarak farklı sonuç verdiği (P<0.05) ve 13.6 ± 0.6 adet ile en başarılı uygulama olduğu görülmüştür.



Şekil 4.3. Farklı şekerlerle desteklenen besi ortamlarında, kültürün 28. gününde, lateral tomurcuklardan gelişen rozet sürgünler (Bar: 1.0 cm)

Çizelge 4.26. Tomurcuklardan kültür başlatmaya şeker karışımlarının etkisi*

| Şeker Tipi ve Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--|-------------------------------------|------------------|--------------------------------|
| 30 gl ⁻¹ Sukroz | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 13.60 ± 0.58 a |
| 15 gl ⁻¹ Sukroz + 15 gl ⁻¹ Glikoz | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 11.05 ± 0.70 ab |
| 15 gl ⁻¹ Sukroz + 15 gl ⁻¹ Fruktoz | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 10.20 ± 0.70 b |
| 15 gl ⁻¹ Glikoz + 15 gl ⁻¹ Fruktoz | 90.0 ± 6.9 | 100.0 ± 0.0 | 10.56 ± 0.74 b |
| | F= 2.075 sd= 3, 75 P>0.05 | sd= 3, 73 | F= 3.249 sd= 3, 73 P= 0.027 |

* : Her seride 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

4.2.1.7. Kültür Başlatılmasına Tomurcukların Alındığı Dönemin Etkisi

Dinlenme halindeki tomurcukların kültüre alındığı dönemin kültür başlatmaya etkisini belirlemek üzere yapılan bu deneyde, 2 mg^l⁻¹ BAP ve 0.3 mg^l⁻¹ GA₃ ilave edilen besi ortamı kullanılmıştır. Kùltürler, 17 Kasım, 2 Aralık, 25 Aralık ve 11 Ocak tarihlerinde yapılmış olup elde edilen sonuçlar Çizelge 4.27’de verilmiştir.

Çizelge 4.27. Tomurcuklardan kültür başlatmaya kültüre alma döneminin etkisi*

| Kùltür Tarihi | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|---------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 17 Kasım | 55.1 ± 7.2 c | 88.9 ± 6.2 ab | 4.33 ± 0.54 a |
| 2 Aralık | 76.6 ± 5.3 b | 79.6 ± 5.8 bc | 4.64 ± 0.53 a |
| 25 Aralık | 82.5 ± 4.8 ab | 71.2 ± 6.3 c | 2.76 ± 0.35 b |
| 11 Ocak | 92.6 ± 3.6 a | 100.0 ± 0.0 a | 2.50 ± 0.13 b |
| | F= 7.978 sd= 3, 226 P= 0.0001 | F= 6.254 sd= 3, 174 P= 0.0001 | F= 5.386 sd= 3, 146 P= 0.002 |

* : Her seride en az 50 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Kùltüre alma tarihlerine ait sonuçlar arasındaki farklılık, istatistiki olarak önemli bulunmuştur (P<0.01). Alt kültüre alınabilir eksplant oranı, mevsimin ilerlemesine paralel olarak artarak 11 Ocak’ta yapılan kültürde %93 ± 4’e ulaşmıştır. Rozet sürgün oranı da yine aynı tarihteki kültürde en yüksek değeri göstermiş ve alt kültüre alınabilir eksplantların tamamı rozet oluşturmuştur. Ortalama yaprak sayısı bakımından en yüksek ortalama (4.6 ± 0.5 adet) 2 Aralık’taki kültürden elde edilmiştir.

4.2.1.8. Kültür Başlatılmasına Tomurcukların Ağaçtaki Pozisyonunun Etkisi

Kullanılan tomurcukların damızlık bitkinin farklı kısımlarından alınmasının kültür başlatmaya etkisini belirlemek üzere yapılan bu deneyde, (1) doruk dalın doruk sürgünü, (2) yan dalın doruk sürgünü ve (3) yan dalın yan sürgünü üzerindeki tomurcuklar ile Mart ayında kültür başlatılmıştır. Deney, 2 mg^l⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında yürütülmüş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.28’de verilmiştir.

Çizelge 4.28. Tomurcuklardan kültür başlatmaya tomurcukların ağaçtaki pozisyonunun etkisi*

| Tomurcuk Pozisyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Rozet Sürgün (%) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--------------------------|-------------------------------------|------------------|------------------------------|
| Doruk Dal - Doruk Sürgün | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 5.05 ± 0.29 |
| Yan Dal - Doruk Sürgün | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 5.67 ± 0.30 |
| Yan Dal - Yan sürgün | 100.0 ± 0.0 | 100.0 ± 0.0 | 5.43 ± 0.35 |
| | sd= 2, 75 | sd= 2, 75 | F= 0.790 sd= 2, 75 P>0.05 |

* : Her seride 32 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Her üç tomurcuk kaynağında, alt kültüre alınabilir eksplant ve rozet sürgün oranları %100 olarak tespit edilmiştir. Rozet başına ortalama yaprak sayısı bakımından farklılık önemsiz bulunmuş, uygulamalar yine birbirine benzer sonuçlar göstermiş 5.1 ± 0.3 ile 5.7 ± 0.3 adet arasında değişmiştir. Bu sonuçlarla, kültür başlatmada kullanılan tomurcukların ağaçtaki pozisyonunun önemli bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.

4.2.2. Tohumlardan Kültür Başlatma Çalışmaları

4.2.2.1. Tohumların *in vitro* Çimlendirilmesine Eksplant Hazırlama Yönteminin Etkisi

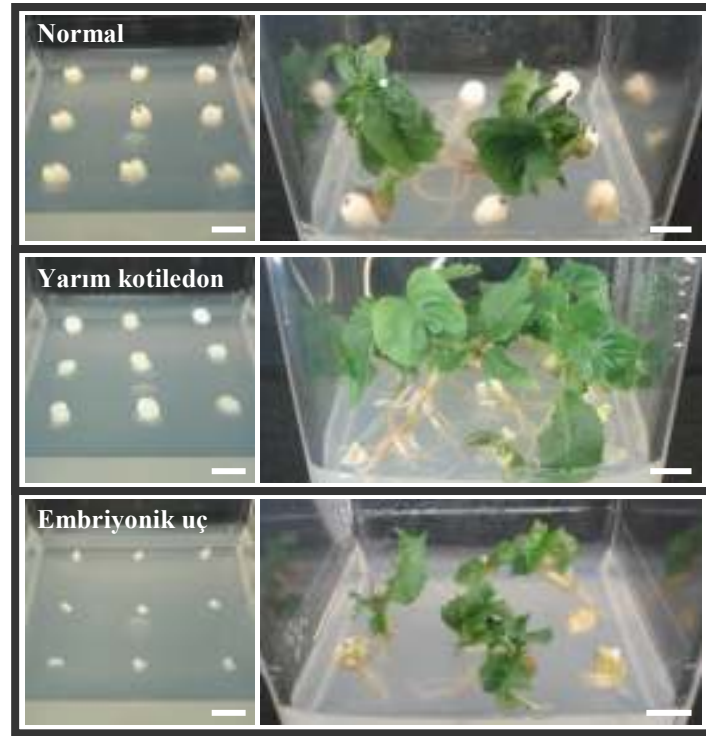
Kiraz tohumlarının farklı şekillerde hazırlanarak kültüre alınmasının, *in vitro* çimlenme üzerine etkisini görmek üzere yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.29'da verilmiştir.

Çizelge 4.29. Kiraz tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesine eksplant hazırlama yönteminin etkisi*

| Eksplant Hazırlama Yöntemi | Çimlenme (%) | Kök Uzunluğu (mm) | Sürgün Uzunluğu (mm) | Yaprak Sayısı (adet) |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Normal | 25.0 ± 7.3 b | 43.1 ± 12.2 a | 6.3 ± 1.1 b | 2.9 ± 0.5 |
| Yarım Kotiledonlu Embriyonik Uç | 75.0 ± 7.3 a | 44.0 ± 4.4 a | 9.2 ± 1.1 a | 2.9 ± 0.2 |
| Embriyonik Uç | 72.2 ± 7.6 a | 21.7 ± 2.8 b | 5.3 ± 0.3 b | 2.8 ± 0.2 |
| | F= 14.403 sd= 2, 105 P= 0.0001 | F= 7.338 sd= 2, 54 P= 0.02 | F= 6.680 sd= 2, 59 P= 0.02 | F= 0.122 sd= 2, 59 P>0.05 |

* : Her seride 36 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 21. gününde alınmıştır.

Çimlenme oranları arasındaki farklılık, istatistiki olarak önemli bulunmuş ($P<0.01$), normal ekimde düşük bir çimlenme oranı ($\% 25 \pm 7$) görülürken, yarım kotiledonlu embriyonik uç ($\%75 \pm 7$) ve embriyonik uç ($\%72 \pm 8$) birbirine benzer sonuçlar vermiştir. Kök ve sürgün uzunluklarında alınan sonuçlar arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Kök uzunluğunda yarım kotiledonlu embriyonik uç (44.0 ± 4.4 mm) ve normal (43.1 ± 12.2 mm) ekimler benzer sonuçlar verirken, sürgün uzunluğu bakımından yarım kotiledonlu embriyonik uç (9.2 ± 1.1 mm) en yüksek ortalamayı vermiştir. Yaprak sayıları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. “Normal”, “yarım kotiledonlu embriyonik uç” ve “embriyonik uç” halinde ekim yapılan kiraz tohumlarına ait kültürler (Bar: 1.0 cm).

4.2.2.2. Tohumların *in vitro* Çimlendirilmesine Büyüme Düzenleyicilerinin Etkisi

Tohumların *in vitro* çimlendirilmesine, büyüme düzenleyicilerinin etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.30’da verilmiştir.

Çizelge 4.30. Kiraz tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesine büyüme düzenleyicilerinin etkisi*

| Büyüme Düzenleyici (1 mg ^l ⁻¹) | Çimlenme (%) | Kök Uzunluğu (mm) | Sürgün Uzunluğu (mm) | Yaprak Sayısı (adet) |
|---|----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| BAP | 75.0 ± 7.3 a | 44.0 ± 4.4 | 9.2 ± 1.1 ab | 2.9 ± 0.2 |
| kinetin | 44.4 ± 9.7 b | 53.4 ± 10.7 | 6.1 ± 0.6 bc | 2.4 ± 0.1 |
| IBA | 18.5 ± 7.6 c | 16.4 ± 1.5 | 4.6 ± 0.8 c | 2.0 ± 0.0 |
| GA ₃ | 48.2 ± 9.8 b | 54.4 ± 9.3 | 10.4 ± 1.4 a | 2.3 ± 0.2 |
| | F= 7.771 sd= 3, 113 P= 0.0001 | F= 1.172 sd= 3, 53 P>0.05 | F= 3.804 sd= 3, 53 P=0.015 | F= 2.676 sd= 3, 53 P>0.05 |

* : Her seride 27 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 21. gününde alınmıştır.

Çimlenme oranı bakımından istatistiki farklılık görülmüş ($P<0.01$) ve BAP içeren besi ortamındaki kültürler 75 ± 7 ile en başarılı sonuçları vermiştir. En yüksek kök uzunluğu GA₃ (54.4 ± 9.3 mm) ve kinetin (53.4 ± 10.7 mm) ilaveli besi ortamlarından elde edilmiş ancak istatistiki fark görülmemiştir. Sürgün uzunluğunda uygulamalar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuş, en iyi sonuçları sırasıyla GA₃ (10.4 ± 1.4 mm) ve BAP (9.2 ± 1.1 mm) içeren besi ortamları vermiştir. Sürgün başına düşen yaprak sayısı uygulamalarda 2.0 ± 0.0 ile 2.9 ± 0.2 adet arasında değişmiş, önemli bir farklılık çıkmamıştır.

4.2.2.3. Tohumların *in vitro* Çimlendirilmesine BAP Konsantrasyonlarının Etkisi

Kiraz tohumlarının *in vitro* çimlenmesi üzerine farklı BAP konsantrasyonlarının etkisini belirlemek üzere yapılan deneyde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.31'de verilmiştir.

Çimlenme oranı bakımından en iyi sonuçlar, 1 mg^l⁻¹ (67 ± 8) ve kontrol (61 ± 8 mg^l⁻¹) uygulamalarından alınmıştır. Deneyde kullanılan yüksek BAP konsantrasyonları çimlenmeyi inhibe etmiş, 4 ve 6 mg^l⁻¹ konsantrasyonlarda hiç çimlenme olmamıştır. Kök uzunluğu (59.1 ± 4.4 mm), sürgün uzunluğu (3.0 ± 0.2 mm) ve yaprak sayısı (2.9 ± 0.3 adet) ölçümlerinde en yüksek değerler kontrol grubundan alınmış olup, gruplar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$).

Çizelge 4.31. Kiraz tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesine BAP konsantrasyonlarının etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Çimlenme (%) | Kök Uzunluğu (mm) | Sürgün Uzunluğu (mm) | Yaprak Sayısı (adet) |
|--|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| 0 mg ^l ⁻¹ BAP (Kont) | 61.1 ± 8.2 a | 59.1 ± 4.4 a | 3.0 ± 0.2 a | 2.9 ± 0.3 a |
| 1 mg ^l ⁻¹ BAP | 66.7 ± 8.0 a | 30.0 ± 2.6 b | 2.7 ± 0.2 a | 1.6 ± 0.2 b |
| 2 mg ^l ⁻¹ BAP | 54.1 ± 8.3 a | 23.4 ± 1.0 b | 2.1 ± 0.1 b | 1.8 ± 0.1 b |
| 4 mg ^l ⁻¹ BAP | 0.0 ± 0.0 b | - | - | - |
| 6 mg ^l ⁻¹ BAP | 0.0 ± 0.0 b | - | - | - |
| | F= 27.668 sd= 4, 176 P= 0.0001 | F= 27.607 sd= 2, 53 P= 0.0001 | F= 8.087 sd= 2, 61 P=0.001 | F= 10.062 sd= 2, 61 P= 0.0001 |

* : Her seride 36 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 21. gününde alınmıştır.

4.2.2.4. Tohumların *in vitro* Çimlendirilmesine Karanlıkta Bekletme Sürelerinin Etkisi

Kiraz tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesine karanlıkta bekletme süresinin etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneye ait sonuçlar Çizelge 4.32’de verilmiştir.

Çizelge 4.32. Kiraz tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesine karanlıkta bekletme süresinin etkisi*

| Karanlıkta Bekletme | Çimlenme (%) | Kök Uzunluğu (mm) | Sürgün Uzunluğu (mm) | Yaprak Sayısı (adet) |
|---------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 0 Gün (Kontrol) | 81.5 ± 7.6 | 69.0 ± 6.8 b | 14.1 ± 0.6 c | 3.7 ± 0.2 a |
| 3 Gün | 91.1 ± 4.3 | 87.0 ± 5.1 ab | 14.6 ± 0.7 c | 3.3 ± 0.1 ab |
| 7 Gün | 86.7 ± 5.1 | 92.7 ± 4.8 a | 18.7 ± 1.1 b | 3.0 ± 0.2 b |
| 14 Gün | 84.4 ± 5.5 | 67.8 ± 4.1 b | 38.9 ± 2.6 a | 2.4 ± 0.1 c |
| | F= 0.511 sd= 3, 158 P>0.05 | F= 4.077 sd= 3, 126 P= 0.008 | F= 40.001 sd= 3, 136 P=0.0001 | F= 12.786 sd= 3, 136 P= 0.0001 |

* : Her seride 45 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 21. gününde alınmıştır.

Bu deneyde çimlenme oranları arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmamış, diğer parametreler ise önemli farklılık göstermiştir ($P < 0.01$). En yüksek değerler, çimlenme oranında 3 gün karanlık uygulamasından (91 ± 4), kök uzunluğunda 7 gün karanlık uygulamasından (92.7 ± 4.8 mm), sürgün uzunluğunda 14 gün karanlık uygulamasından (38.9 ± 2.6 mm) ve yaprak sayısında kontrol grubundan (3.7 ± 0.2 adet) elde edilmiştir.

4.2.3. Kültür Başlatma Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi ve Tartışma

4.2.3.1. Kültür Başlatma Materyali

Kiraz ve diğer *Prunus* türlerinin *in vitro* çalışmalarında, kültür başlatma materyali olarak sürgün ucu, nodal ve apikal tomurcuk, meristem ucu, yaprak, tohum, embriyo, kotiledon, hipokotil ve gövde diski gibi çok farklı organlar kullanılmaktadır. Yapılan çalışmanın amacına göre bu başlangıç materyallerinden biri tercih edilmektedir. *Prunus* türlerinde sürgün çoğaltım kabiliyetinin kullanılan doku tipi tarafından kuvvetli derecede etkilendiği, genellikle yaprak ve gövde parçalarının tohum kaynaklı dokulara göre daha güç sonuç verdiği bildirilmektedir (Canlı ve ark. 2008).

Olgun tomurcuk ve sürgün ucu gibi meristematik organlar, genetik stabilite ve hızlı çoğaltım sağlaması bakımından, klonal çoğaltım amaçlı bir çok araştırmada tercih edilen başlangıç materyalleridir. Bazı araştırmalarda sürgün ucu tercih edilirken (Skirvin ve ark. 1979; Borkowska 1985; Gebhardt 1985; Hammatt ve Grant 1993; Hammatt ve Grant 1997; Ruzic ve ark. 1998; Grant ve Hammatt 1999; Muna ve ark. 1999; Aka-Kaçar ve ark. 2001; Sülüsoğlu ve Çelik 2001; Bhagwat ve Lane 2004; Hepaksoy 2004; Sedlák ve Paprštejn 2008; Sedlak ve ark. 2008; Bouzari ve ark. 2009), diğer bir kısmında apikal veya lateral tomurcuklar kullanılarak kültür başlatılmıştır (Sauer 1985; Pevalek-Kozlina ve Jelaska 1987; Dradi ve ark. 1996; Muna ve ark. 1999; Pruski ve ark. 2005; Đurkovič 2006; Espinosa ve ark. 2006; Demiral ve Ülger 2008; Xilogiannis ve ark. 2008; Bouzari ve ark. 2009).

Prunus türlerinde virüsten âri materyal elde etmek amacıyla yürütülen çalışmalarda, uç meristem kültüründen yararlanılmıştır (Druart 1991; Buzkan ve ark. 1997; Kramarenko 1999; Pérez-Tornero ve ark. 1999a; Pérez-Tornero ve ark. 2000b; Manganaris ve ark. 2003).

Prunus türlerinde, modern ıslah ve gen transformasyonu çalışmaları kapsamında, yapraktan rejenerasyon çalışmaları üzerinde durulmuştur (Miguel ve ark. 1996; Hammatt ve Grant 1998; Ainsley ve ark. 2000; Grant ve Hammatt 2000; Pérez-Tornero ve ark. 2000a; Gentile ve ark. 2002; Tang ve ark. 2002; Takashina ve ark. 2003; Bhagwat ve Lane 2004; Nowak ve ark. 2004; Matt ve Jehle 2005; Pascual ve Marin 2005; Song ve Sing 2005; Espinosa ve ark. 2006). Bazı araştırmacılar ise, olgun ya da olgunlaşmamış kotiledonları ve tohum kaynaklı diğer eksplantları kullanmışlardır (Balla ve Brozik 1996; Schmidt ve Ketzler 1996; Hokanson ve Pooler 2000; Ainsley ve ark. 2001; Yıldırım 2006; Yıldırım ve ark. 2007; Canlı ve Tian 2008).

Bunların yanında gövde diski (Matt ve Jehle 2005) veya kök (Marín ve Marín 1998) gibi farklı organlar ile kültür başlatma çalışmaları da yürütülmüştür.

Bu araştırmada hızlı mikroçoğaltım protokolü geliştirmek amaçlandığından, kültür başlatma materyali olarak lateral tomurcuklar kullanılmıştır. Apikal tomurcukların kültür başlatmadaki performansının yan tomurcuklara benzediği görülmüş ancak deneysel homojenliğin sağlanması için sadece lateral tomurcukların kullanılması uygun bulunmuştur. Ayrıca köklendirme ve mikro aşı çalışmalarında model olarak kullanılmak üzere tohum materyali ile de kültür başlatma yapılmıştır.

Eksplantların bitki üzerindeki pozisyonunun kültür başlatmada başarıyı etkilediği, bitkinin genç ve fizyolojik olarak daha iyi durumdaki kısımların alınması gerektiği bildirilmiştir (Hatipoğlu 2002). Buna göre, kullanılan tomurcukların ağaçtaki pozisyonunun kültür başlatmaya etkisi, yapılan bir deneyle incelenmiştir. Ancak, kiraz ağaçlarının 3 farklı kısmından alınan tomurcuklar arasında kültür başlatmada bir farklılık görülmemiştir (Çizelge 4.28).

4.2.3.2. Kültür Başlatma Dönemi

Sterilizasyon aşamasında yapılan deneylerde, tomurcukların kullanıldığı dönemlere göre kültür başlatma başarısı çok büyük farklılık göstermiştir. Vejetasyon dönemindeki tomurcuklar henüz tam olgunlaşmadığı ve dinlenme ihtiyacını karşılamadığı için, kültüre alındığında nitelik ve nicelik olarak yetersiz bir gelişme olmuştur. Tomurcukların soğuklama ihtiyacını karşıladığı kış aylarında yapılan kültürlerde ise, yüksek oranda rozet sürgün oluşumu görülmüştür. Bu nedenle bütün kültür başlatma deneyleri dinlenme döneminde alınan tomurcuklar kullanılarak

yapılmıştır. Hatipoğlu (2002), belirli bir dormansi periyoduna sahip olan bitkilerde, eksplantların dormansi periyodunun sonunda alınması halinde *in vitro* kültürlerde en iyi sonuçların alındığını belirtmiştir.

Dinlenme dönemi içerisinde farklı tarihlerde yapılan kültürlerde, Kasım ile Ocak ayları arasında mevsimin ilerlemesi ile birlikte içsel dinlenmesini tamamlayan tomurcukların daha iyi geliştiği görülmüştür. En son yapılan 11 Ocak'taki kültürlerde alt kültüre alınabilir eksplant oranı 93 ± 4 'e ulaşmış ve rozet sürgün oranı da %100 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.27). Ekim, Aralık, Şubat ve Mart aylarında, 10 büyüme düzenleyici kombinasyonu ile yapılan diğer bir deneyde de, son iki kültür tarihi rozet sürgün oluşumu bakımından daha başarılı bulunmuş ve Mart ayındaki kültürlerde bütün büyüme düzenleyiciler %100 rozet sürgün oluşumu sağlamıştır (Çizelge 4.23). Kültür başlatmaya tomurcukların ağaçtaki pozisyonunun etkisi üzerine yapılan deney, Mart ayında alınan tomurcuklarla başlatılmış ve her üç tomurcuk kaynağında hem alt kültüre alınabilir eksplant oranı hem de rozet sürgün oranı %100 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.28). Buna göre, 0900-Ziraat kiraz çeşidine ait tomurcuklarla kültür başlatmak için mutlaka dinlenme dönemindeki tomurcukların kullanılması gerektiği ve en uygun dönemin Ocak-Mart ayları arası olduğu sonucuna varılmıştır.

Prunus türleri üzerinde çalışan araştırmacıların bir kısmı, kış aylarında dinlenme halindeki veya erken ilkbaharda dinlenmeden çıkmak üzere olan tomurcuklarla kültür başlattıklarını bildirmişlerdir (Tricoli ve ark. 1985; Murai ve ark. 1997; Pérez-Tornero ve ark. 1999b; Pérez-Tornero ve ark. 2000b; Pruski ve ark. 2000; Osterc ve ark. 2004; Matt ve Jehle 2005; Pruski ve ark. 2005). Pérez-Tornero ve ark. (1999a), Canino kayısı çeşidinde dinlenme döneminde farklı tarihlerde alınan materyallerle yapılan kültürler içerisinde, 10 Şubat'ta başlatılan kültürlerin en iyi sonuçları verdiğini bildirmişlerdir. Tricoli ve ark. (1985), *Prunus serotina* üzerinde yürüttükleri araştırmada, ilkbahar başlangıcında kabarmaya başlayan tomurcukları kullanmışlardır.

Bir kısım çalışmalarda ise, vejetasyon dönemi içerisinde alınan aktif haldeki sürgün ucu veya tomurcuklarla kültür başlatılmıştır (Borkowska 1985; Almehdi ve Parfitt 1986; Katano 1987; Hammatt ve Grant 1997; Aka-Kaçar ve ark. 2001; Hepaksoy 2004; Günal 2006; Koubouris ve Vasilakakis 2006; Yıldırım 2006; Çelik 2008; Sedlak ve ark. 2008; Bouzari ve ark. 2009). Hammatt ve Grant (1997), kiraz anaçlarıyla

yaptıkları çalışmada, Mayıs-Haziran aylarında aldıkları sürgün uçları ile kültür başlatmışlardır. Özzambak ve Hepaksoy (1997a), Heimanns Rubinweichsel vişne çeşidinin *in vitro* çoğaltımında, başlangıç materyali olan sürgün uçlarının alındığı mevsimlerin etkisini karşılaştırmıştır. En iyi sonuç, ilkbahar döneminde başlatılan kültürlerden alınmıştır. Hepaksoy (2004) tarafından, Gisela-5 ve Gisela-6 kiraz anaçlarında sürgün çoğaltımı ve gelişimi üzerine yürütülen çalışmada, Haziran ayında alınan 3 - 5 cm uzunluğundaki sürgün uçları ile kültür başlatılmıştır. Fidancı ve ark. (2008), Gisela-5, Maxma-14 ve Tabel Edabriz kiraz anaçlarının *in vitro* hızlı çoğaltım teknikleri üzerine yaptıkları araştırmada, tomurcukların alınması için en uygun dönemin Nisan sonu Haziran başı arası olduğunu, daha erken dönemde alındığında bulaşma sorunlarının arttığını, daha geç dönemde başlatılan kültürlerde ise yeni sürgün oluşumunun ve gelişiminin azaldığını belirtmişlerdir. Buzkan ve ark. (1997) tarafından, kiraz anaçlarından *Prunus mahaleb* L., Gisela 1, Damil ve Tabel Edabriz ile yürütülen araştırmada, tomurcuklar ilkbahar (Mayıs), yaz (Temmuz-Ağustos) ve sonbahar (Eylül-Ekim) dönemlerinde alınarak kültür başlatılmıştır. Meristemlerden kültür başlatmak için en uygun dönemin ilkbahar dönemi olduğu, yaz döneminde kültürlerin yaşama oranlarının oldukça düşük, bakteriyel bulaşmaların ise çok fazla olduğu belirtilmiştir. En düşük yaşama oranı sonbahar döneminde alınmıştır.

Farklı dönemlerde başlatılan kültürlerin başarısı, kullanılan genotipe göre büyük oranda değişmekte, aynı tür içerisinde de farklı sonuçlar alınabilmektedir. Yıldırım (2006), Hacıhaliloğlu kayısı çeşidine ait tomurcuklar ile yıl boyunca yaptığı kültür başlatma çalışmaları sonunda en uygun dönemin Mayıs-Haziran ayları olduğunu belirtmiştir. Yine kayısıda çalışan Pérez-Tornero ve ark. (1999b) ise, meristemlerden kültür başlatmak için dormant tomurcukların kullanımının daha uygun olduğunu bildirmiş ve tomurcuk dinlenmesi ile kültür başlatma zamanı arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Kasım ayından Şubat ayına kadar beş farklı dönemde 4 kayısı çeşidinden alınan materyallerle yapılan kültürlerde, tomurcukların kabarmaya başladığı son iki dönem en başarılı dönem olarak belirlenmiştir.

4.2.3.3. Eksplant Hazırlama Yöntemi

Kiraz tomurcuklarından *in vitro* kültür başlatırken, eksplantın büyüklüğü ve hazırlama yöntemi başarıyı etkileyen faktörlerdendir. Büyük eksplantlarda büyüme ve

rejenerasyon daha kolay gerçekleşmektedir. Ancak bu tarz hazırlanan eksplantlar aynı zamanda daha yüksek kontaminasyon riski taşımaktadır (Hatipoğlu 2002; Mansuroğlu ve Gürel 2002).

Tomurcukların yüzey sterilizasyonu konusunda değinildiği üzere, boğum arası ve pullarıyla birlikte kültüre alınan tomurcuklarda (Channuntapipat ve ark. 2003; Espinosa ve ark. 2006; Yıldırım 2006) yüzey sterilizasyonu yapmak mümkün olmamıştır. Bu nedenle tomurcukların odun dokusundan ve pullarından tamamen izole edilerek, 2 - 3 mm'lik eksplantlar halinde kültüre alınması denenmiştir (Dradi ve ark. 1996; Pérez-Tornero ve ark. 1999a; Bhagwat ve Lane 2004; Matt ve Jehle 2005). Deney konusu aynı zamanda sterilizasyon çalışmaları kapsamında olduğundan ilgili bölümde (4.1.1.4) ele alınmış ve sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir. İzole edilmiş tomurcuklarla yapılan kültürlerde, hiçbir bulaşma görülmemiş ve tomurcuklar oldukça iyi gelişme göstermiştir. Yapılan bütün kültür başlatma deneylerinde bu yöntem kullanılmıştır.

Kiraz ve diğer *Prunus* türlerinde yapılan çalışmalarda, genellikle tomurcuk pulları ve odun dokusundan izole edilmiş milimetrik boyutlardaki eksplantlarla kültür başlatılmıştır: Matt ve Jehle (2005), beş kiraz çeşidinde yürüttükleri çalışmada, Aralık ayında alınan 1 yaşlı dallar üzerindeki tomurcukların pullarını temizleyerek içerisinden izole ettikleri büyüme konisini kullanmışlardır. Bhagwat ve Lane (2004), iki kiraz çeşidinde, başlangıç materyali olarak kullandıkları sürgün uçlarının yaklaşık 3 mm'lik kısmını pul ve yapraklardan temizleyerek kültüre almışlardır. Theiler-Hedtrich ve Feucht (1985), vişne anaçlarının *in vitro* kültüründe tepe tomurcukları içerisinden mikroskop altında çıkarılan 0.3 - 0.5 mm uzunluktaki eksplantlarla kültür başlatmışlardır. Dradi ve ark. (1996), mahlep ekotiplerinde yaptıkları kültürlerde 2 mm uzunluğundaki tomurcuk uçlarını kullanmışlardır. Gebhardt (1985), Schattenmorelle vişne çeşidinde yaptığı çalışmada, başlangıç eksplantı olarak 0.1 - 0.5 mm uzunluğundaki sürgün uçlarından yararlanmıştır. Sauer (1985), kirazın *in vitro* çoğaltımıyla ilgili çalışmasında, genç dallardaki tepe tomurcuklarından çıkardığı meristemlerle kültür başlatmıştır. Katano (1987), *Prunus jamasakura*'nın çoğaltımı üzerine yürüttüğü araştırmada, gelişme halindeki sürgünlerin veya tomurcukların 1 mm uzunluğundaki sürgün uçlarını kullanmıştır. Demirkök (2006), bazı *Prunus* genotiplerinde, sürgün uçlarındaki büyüme konisi ve 2 - 3 yaprak taslağı kalacak şekilde yaklaşık 0.5 - 1.0 mm büyüklüğünde hazırlanan eksplantlarla kültür başlatmıştır. Murai

ve ark. (1997), Bakuoh junkyou kayısı çeşidinde yürüttükleri mikroçoğaltım çalışmasında, 1 mm uzunluğundaki sürgün uçlarını kullanarak kültür başlatmışlardır.

Bunların yanında, daha büyük boyutlarda ve odun dokusunu içeren eksplantların da kullanımı söz konusudur: Hepaksoy (2004), Gisela-5 ve Gisela-6 kiraz anaçlarında, 3 - 5 cm uzunluğundaki sürgün uçları ile kültür başlatmıştır. Espinosa ve ark. (2006), *Prunus serotina* üzerindeki çalışmasında, lateral tomurcukları 2 cm uzunluktaki sürgün parçasıyla birlikte kültüre almıştır. Channuntapipat ve ark. (2003), badem çeşit ve anaçları ile yürüttükleri mikroçoğaltım çalışmalarında, kültür başlatmak için üzerinde 1 - 2 tomurcuk bulunan sürgünleri kullanmışlardır. Yıldırım (2006), Hacıhaliloğlu kayısı çeşidinde kültür başlatmak için kullandığı tomurcukları 0.5 - 1.0 cm uzunluktaki boğum arası ile birlikte kültüre almıştır.

4.2.3.4. Besi Ortamı

Mikroçoğaltım çalışmalarına başlarken verilecek en önemli kararlardan birisi kullanılacak besi ortamının seçilmesidir. Çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen bir çok besin ortamı formülasyonu mevcut olmasına rağmen birkaç tanesi çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Babaoğlu ve ark 2002). Kiraz ve diğer *Prunus* türleri üzerinde yapılan *in vitro* araştırmaların kültür başlatma aşamasında, en fazla MS besi ortamından yararlanılmıştır (Skirvin ve ark. 1979; Borkowska 1985; Theiler-Hedtrich ve Feucht 1985; Balla ve Brozik 1996; Schmidt ve Ketznel 1996; Hammatt ve Grant 1997; Özzambak ve Hepaksoy 1997a; Hammatt ve Grant 1998; Ruzic ve ark. 1998; Grant ve Hammatt 2000; Ružić ve ark. 2000; Aka-Kaçar ve ark. 2001; Fidancı ve ark. 2001; Petrevica ve Bite 2003; Takashina ve ark. 2003; Bhagwat ve Lane 2004; Hepaksoy 2004; Osterc ve ark. 2004; Kitin ve ark. 2005; Ruzic ve ark. 2005; Günal 2006; Demiral ve Ülger 2008; Fidancı ve ark. 2008; Sedlak ve ark. 2008).

Bundan başka, kültür başlatma çalışmalarında; QL besi ortamı (Pérez-Tornero ve ark. 1999a; Pérez-Tornero ve ark. 1999b; Ainsley ve ark. 2000; Channuntapipat ve ark. 2003; Song ve Sing 2005; Canlı ve Tian 2008;), WPM besi ortamı (Pevalek-Kozlina ve Jelaska 1987; Manganaris ve ark. 2003; Đurkovič 2006; Xilogiannis ve ark. 2008), DKW besi ortamı (Hammatt ve Grant 1998), Balla ve Vertesy besi ortamı (2001) (Koubouris ve Vasilakakis 2006) ve bazen de birkaç besi ortamının karışımı (Dradi ve ark. 1996) kullanılmıştır.

Ayrıca bazı araştırmacılar, farklı *Prunus* genotiplerinde kültür başlatmak için en uygun besi ortamını belirlemek üzere çalışmalar yürütmüşlerdir:

Sülüsoğlu ve Çelik (2001), *Prunus mahaleb* L. anaçlarında yaptıkları mikroçoğaltım çalışmalarında, çok sayıda büyüme düzenleyici ile birlikte MS ve WPM besi ortamlarını kullanmış, WPM besi ortamının düşük yaşama oranı ve vitrifikasyon nedeniyle başarısız olduğunu belirtmişlerdir. Katano (1987), *Prunus jamasakura*'nın çoğaltımı üzerine yürüttüğü araştırmada, 1 mm uzunluğundaki sürgün uçlarını ile kültür başlatmak için MS ve Gamborg's (1966) besi ortamlarını kullanmıştır. MS besi ortamındaki eksplantlardan hiçbiri gelişmemiş, 1 mg^l⁻¹ BAP içeren Gamborg's besi ortamında ise eksplantların %81'i gelişmiştir. Murai ve ark. (1997), Bakuoh junkyou kayısı çeşidinde kültür başlatmaya WPM, B5, MS ve ½ MS ortamlarının etkisini incelemiş ve WPM ortamının en iyi sonuçları verdiğini, MS besi ortamındaki sürgünlerde birkaç alt kültürden sonra kuruma ve vitrifikasyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Zilkah ve ark. (1992), *Prunus avium* ve *Prunus mahaleb* melezi olan üç klon anaç üzerinde yürüttükleri çalışmada, tomurcuklardan kültür başlatma aşamasında, anaçlardan ikisi için Boxus (1974) besi ortamının, diğer biri için Tabachnik ve Kester (1977) (TK) besi ortamının en iyi neticeyi verdiğini bildirmişlerdir.

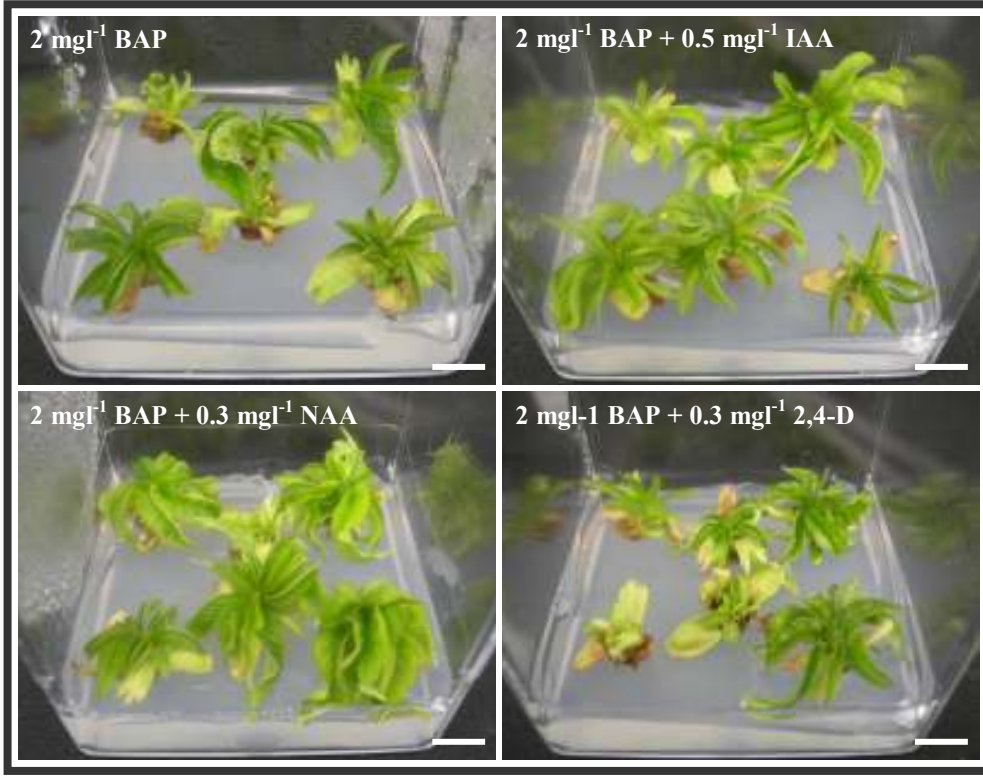
Bu araştırmadaki kültür başlatma deneylerinde MS besi ortamından yararlanılmıştır. Büyüme düzenleyici deneyleri sırasında, kullanılan besi ortamı ile ilgili bir sorunla karşılaşılmamış ve MS besi ortamında kültüre alınan eksplantların sağlıklı ve kuvvetli bir gelişme gösterdiği izlenmiştir. Bu nedenle kültür başlatmak için diğer besi ortamlarının kullanılmasına gerek duyulmamıştır. Sürgün çoğaltım aşamasında besi ortamları deneysel olarak ayrıca ele alınmıştır.

4.2.3.5. Besi Ortamına Eklenen Büyüme Düzenleyiciler

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmak için uygun büyüme düzenleyici ve konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik çok sayıda deney yapılmıştır (Çizelge 4.10 - 4.24). Öncelikle sitokin grubu büyüme düzenleyicilerden BAP, kinetin ve TDZ, besi ortamına farklı konsantrasyonlarda ilave edilerek etkileri incelenmiştir. Farklı kinetin konsantrasyonlarından hiçbirinde başarılı bir sonuç alınamamış, BAP ve TDZ ilaveli ortamlarda ise her iki büyüme düzenleyicide 2 mg^l⁻¹ dozda en iyi sonuçlar alınmıştır. TDZ içeren besi ortamlarından BAP'a göre daha yüksek değerler elde

edilmiştir. Ancak TDZ ile geliştirilen rozet bitkilerde kültür süresinin sonuna doğru canlılıkta azalmalar görülmüştür. BAP ilaveli ortamda ise daha canlı ve sağlıklı rozet sürgünler elde edilmiştir. Bu nedenle, sonraki aşamada yapılacak oksin kombinasyonları için her iki sitokinine 2 mg l^{-1} konsantrasyonda yer verilmiştir.

İkinci aşamada uygun sitokinle birlikte besi ortamına ilave edilen oksin grubu büyüme düzenleyicilerin etkisi incelenmiştir. Skoog ve Miller (1957), bitki dokularından organ farklılaşmasında sitokin ve oksinlerin önemli rol oynadığını; sitokin-oksine oranının sitokin lehine büyük olmasının sürgün oluşumunu, oksin lehine büyük olmasının kök oluşumunu ve eşit olmasının kallus oluşumunu teşvik ettiğini bildirmiştir. Bu nedenle, 2 mg l^{-1} BAP ve TDZ ile kombine edilerek denenen, IAA, IBA, NAA ve 2,4-D oksinleri, sitokinlerden düşük olan dört farklı konsantrasyonda ilave edilmiştir. Diğer bir deneyde de, besi ortamına BAP ile birlikte GA_3 ilavesinin etkisi incelenmiştir. Daha sonra bütün bu deneylerin her birinde elde edilen en iyi kombinasyonlar yeni bir deneyde bir araya getirilerek tekrar denenmiştir. Tomurcukların içerisinde bulunduğu fizyolojik dönemlere göre sonuçlar değişim gösterdiğinden, en iyi büyüme düzenleyici kombinasyonlarının karşılaştırıldığı bu deney, dinlenme dönemi içerisinde yayılmış olan 4 farklı tarihte yapılmıştır. Kullanılan 10 büyüme düzenleyici kombinasyonundan TDZ içeren 5 tanesi, ilk iki kültür döneminde başarılı sonuçlar vermediğinden sonraki iki kültürde sadece BAP'lı kombinasyonlara yer verilmiştir. Bu kombinasyonlardan başarılı bulunanların kültür sonundaki gelişme durumuna ait görüntüler Şekil 4.5'de verilmiştir. Bu kültürlerden incelenen 3 parametreye ait çok sayıda veri elde edilmiş ve ayrıca 4 dönemin ortalamaları alınmıştır. Mikroçoğaltım açısından en önemli parametreler olan, sırasıyla alt kültüre alınabilir eksplant oranı ve rozet sürgün oranı dikkate alındığında, dönem ortalamaları en yüksek olan 2 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IAA ve 2 mg l^{-1} BAP serileri en başarılı uygulamalar olarak öne çıkmıştır. Bu büyüme düzenleyicilerde, alt kültüre alınabilir eksplant oranı sırasıyla $\%97 \pm 2$ ve $\%95 \pm 2$; rozet sürgün oranı sırasıyla $\%98 \pm 2$ ve $\%93 \pm 3$; yaprak sayısı ise sırasıyla 5.5 ± 0.3 adet ve 4.4 ± 0.3 adet olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.22, 4.23, 4.24). Uygulamalardan 2 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} NAA kombinasyonu, rozet sürgün oranı ve yaprak sayısı bakımından başarılı bulunsa da, kültürlerde fazla miktarda kallus oluşumuna neden olmuştur.



Şekil 4.5. BAP - oksin kombinasyonları ile desteklenen besi ortamlarında, kültürün 28. gününde lateral tomurcuklardan gelişen rozet sürgünler (Bar: 1.0 cm)

Prunus türlerinde yapılan kültür başlatma çalışmalarında, besi ortamına ilave edilen sitokininler içerisinde en olumlu sonuçların genellikle BAP'tan alındığı bildirilmektedir. Theiler-Hedtrich ve Feucht (1985), vişne anaçlarında kültür başlatmak için BAP'ın 0, 0.01, 0.1 ve 1 mg l⁻¹ konsantrasyonlarını yalnız olarak ve 0.1 mg l⁻¹ GA₃ ile kombine ederek besi ortamına ilave etmişlerdir. BAP'ın kullanılmadığı ortamda sürgün uçları hiç gelişmemiş, en düşük konsantrasyon olan 0.01 mg l⁻¹ BAP'lı üç kombinasyonda ise, başlangıç aşamasında iyi sonuçlar alınırken 2. kültürde hemen hemen bütün alt kültürler ölmüştür. Kullanılan vişne anacının sürgün uçları için en uygun BAP konsantrasyonunun 0.1 - 1 mg l⁻¹ arası olduğu belirtilmiştir. Pérez-Tornero ve ark. (1999a), dört farklı kayısı çeşidinde meristem ucu ile başlattıkları kültürlerde, farklı BAP, GA₃ ve IBA konsantrasyonlarıyla oluşturulan kombinasyonları denemiş ve genel olarak içeriğinde BAP olmayan besi ortamlarındaki meristemler yaşamadığını bildirmişlerdir. Ayrıca besi ortamına 2 - 4 mg l⁻¹ GA₃ ilavesinin sürgün uzamasını artırdığı görülmüştür. Murai ve ark. (1997), Bakuoh junkyou kayısı çeşidinin sürgün

uçlarını kullandıkları çalışmada, 0.5 mg l^{-1} konsantrasyonda kullanılan BAP, CPPU, 2iP ve Zea sitokininlerini karşılaştırmış ve BAP'ın en uygun sitokinin olduğunu belirlemişlerdir.

Birçok araştırmada, BAP'a ilaveten GA_3 ve IBA / NAA, ikili ya da üçlü kombinasyonlar halinde besi ortamında yer almıştır. Pruski ve ark. (2005), iki *Prunus* türü üzerinde yürüttükleri çalışmada; kültür başlatma ortamına 1 ve 2 mg l^{-1} BAP ile 0.1 mg l^{-1} NAA veya IBA kombinasyonlarını ilave etmişler, BAP'ın iki dozu arasında önemli bir fark bulunmadığını ve BAP'a ilaveten kullanılan oksinlerden IBA'nın daha başarılı sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Hammatt ve Grant (1997), kiraz anaçları için kültür başlatma aşamasında 1 mg l^{-1} BAP, 0.1 mg l^{-1} IBA ve 0.1 mg l^{-1} GA_3 ile destekli besi ortamından faydalanmışlardır. Borkowska (1985), Schattenmorelle vişne çeşidinin mikroçoğaltımı üzerine yürüttüğü çalışmada, kültür başlatmak için 1 mg l^{-1} BAP, 0.1 mg l^{-1} NAA ve 0.1 mg l^{-1} GA_3 ile destekli besi ortamı kullanmıştır. Petrevica ve Bite (2003), vişne çeşitlerinin kültürlerini, 0.5 mg l^{-1} BAP ve 0.2 mg l^{-1} GA_3 ilaveli besi ortamında başlatmıştır. Özzambak ve Hepaksoy (1997a), Heimanns Rubinweichsel vişne çeşidinin *in vitro* çoğaltımında, en iyi sonucu 0.5 mg l^{-1} BAP ve 0.1 mg l^{-1} NAA içeren besi ortamında başlatılan kültürlerden almışlardır. Pevalek-Kozlina ve Jelaska (1987), yabancı kiraz ile kültür başlatılmasında, 0.5 mg l^{-1} BAP, 0.5 mg l^{-1} IBA ve 0.1 mg l^{-1} GA_3 içeren besi ortamını başarıyla kullanmışlardır. Fidancı ve ark. (2001), Gisela-5, Maxma-14 ve Tabel Edabriz kiraz anaçlarının kültürlerini, $0.5 - 1.0 \text{ mg l}^{-1}$ BAP, 0.1 mg l^{-1} IBA veya NAA, 0.1 mg l^{-1} GA_3 ile desteklenen besi ortamında başlatmışlardır.

Kiraz lateral tomurcuklarının kültüre alınmasında büyüme düzenleyicilerin etkisini incelemek üzere yapılan çok sayıda deney sonunda; besi ortamına kinetin ilavesinin hiçbir başarı göstermediği; TDZ'nin kısmen olumlu etki yaptığı; BAP'ın literatürde bildirilenlerin paralelinde en başarılı sitokinin olduğu; BAP'a ilaveten GA_3 kullanılmasının sonuçlarda olumlu bir değişiklik yapmadığı; NAA içeren ortamlarda eksplant tabanında aşırı kallus oluşumu görüldüğü; besi ortamına ilave edilen 2 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IAA veya 2 mg l^{-1} BAP ile başarılı bir kültür başlatma sağlandığı tespit edilmiştir.

Tohum ile yapılan kültür başlatma çalışmalarında, büyüme düzenleyicilerin etkisini belirlemek için 2 deney yapılmıştır (Çizelge 4.30, 4.31). Besi ortamına 1 mg l^{-1} konsantrasyonda ilave edilen BAP, kinetin, IBA ve GA_3 arasında, en yüksek çimlenmeyi yine BAP sağlamıştır. BAP'ın farklı konsantrasyonlarının incelendiği ikinci deneyde, en başarılı sonuçlar 1 mg l^{-1} BAP ve büyüme düzenleyici içermeyen kontrol grubundan alınmış ve bu ikisi birbirine benzer oranlarda çimlenme sağlamıştır. Kök uzunluğu, sürgün uzunluğu ve yaprak sayısı bakımından en yüksek değerler kontrol grubundan alınmıştır. Buna göre kiraz tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesinde besi ortamına büyüme düzenleyici ilave edilmesine gerek olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak sürgün kalınlığının önemli olduğu durumlarda, BAP'ın 1 mg l^{-1} veya daha düşük konsantrasyonları kullanılabilir.

Tohum materyali ile embriyonik yolla kültür başlatma üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır. Hokanson ve Pooler (2000), süs bitkisi olarak kullanılan 8 *Prunus* türünün olgun tohumlarından adventif sürgün gelişimi ve kallus oluşumu üzerine çalışmışlardır. Farklı embriyo parçaları ve BAP, TDZ, 2,4-D, IBA ve NAA'den oluşan 9 bitki büyüme düzenleyici kombinasyonu denenmiş, ancak aynı genotip içinde bu uygulamaların etkileri küçük farklılıklar göstermiştir. Çalışmada yer alan türler arasında ise önemli seviyede fark görülmüştür. Yıldırım (2006), Hacıhaliloğlu kayısı çeşidinin tohumlarının 1 mg l^{-1} BAP'lı ortamda çimlenme oranının %67 olduğu ve ortalama sürgün uzunluğunun 18.0 mm olarak gerçekleştiğini bildirmiştir. Yine aynı çeşidin embriyoları ile yapılan çalışmada, 1 mg l^{-1} konsantrasyonda ilave edilen BAP, kinetin, IAA, NAA ve 2,4-D arasında ve en yüksek çimlenme oranı ve sürgün uzunluğu BAP'dan elde edilmiştir (Yıldırım ve ark. 2007).

4.2.3.6. Besi Ortamına Eklenen Şekerler

Kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmaya farklı şeker tiplerinin etkisini belirlemek üzere yapılan deneylerde önce sukroz, glikoz, fruktoz ve laktoz 30 g l^{-1} konsantrasyonda tek başına denenmiştir (Çizelge 4.25). Bu deneyde başarısız bulunan laktoz çıkarılarak diğer 3 şekerin kombinasyonları karışım halinde ikinci deneyde kullanılmıştır (Çizelge 4.26). Sukroz, glikoz ve fruktozun yalnız ve karışım halinde kullanımlarında hemen hemen bütün tomurcuklardan rozet sürgün elde edilmiştir. İkinci deneyde kontrol olarak kullanılan sadece sukroz içeren besi ortamında, bütün kültür

başlatma deneyleri içerisinde en yüksek gelişme seviyesi elde edilmiş ve %100 alt kültür ve rozet sürgün oranları ile birlikte 13.6 ± 0.6 adet ortalama yaprak sayısına ulaşılmıştır. Ayrıca, Aralık - Ocak aylarında yapılan bu iki deneyin tarihleri arasındaki 32 günlük farkın, aynı içerikli ortamda bile yaprak gelişimi üzerinde önemli ölçüde etki ettiği dikkati çekmiştir. Bu deneylerin sonucuna göre kirazın lateral tomurcuklarından kültür başlatılmasında karbon kaynağı olarak 30 gl^{-1} sukrozun kullanılmasına karar verilmiştir.

Besi ortamlarında enerji kaynağı olarak kullanılan en önemli şeker olan sukroz, rejenerasyon ortamlarında genellikle 30 gl^{-1} konsantrasyonda kullanılır (Babaoğlu ve ark. 2002). *Prunus* türleri ile çalışma yapan araştırmacılar, rejenerasyon çalışmalarının farklı aşamalarında besi ortamına 20 gl^{-1} (Tricoli ve ark. 1985; Marino ve ark. 1993; Ruzic ve ark. 1998; Channuntapipat ve ark. 2003; Gonzalez Padilla ve ark. 2003; Petrevica ve Bite 2003; Rogalski ve ark. 2003b; Silva ve ark. 2003; Ružić ve ark. 2003/4; Bhagwat ve Lane 2004; Matt ve Jehle 2005; Song ve Sing 2005; Espinosa ve ark. 2006), 25 gl^{-1} (Pérez-Tornero ve ark. 1999c; Gentile ve ark. 2002; Channuntapipat ve ark. 2003; Molassiotis ve ark. 2003/4; Cheong ve Pooler 2004; Canlı ve Tian 2008), 30 gl^{-1} (Hammatt ve Grant 1997; Tang ve ark. 2000; Bhagwat ve Lane 2004; Yıldırım 2006; Büyükdemirci 2008; Canlı ve Tian 2008) veya 40 gl^{-1} (Song ve Sing 2005) konsantrasyonda sukroz ilave etmişlerdir.

Besi ortamlarına ilave edilen şekerlerin, uygun tip ve konsantrasyonlarını belirlemek üzere *Prunus* türlerinde çok sayıda araştırma yürütülmüştür:

Ružić ve ark. (2005), Tabel Edabriz kiraz anacı ve Lapins kiraz çeşidinin mikroçoğaltımında sukroz, fruktoz, glikoz, sorbitol ve mannitolün farklı konsantrasyonlarının etkisini incelemiş ve sürgün rejenerasyonunda her 2 genotipte de sorbitol, fruktoz ve glikozun sukroza göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Lapins çeşidinde 20 gl^{-1} sukroz, Tabel Edabriz anacında 20 gl^{-1} fruktoz, en iyi bitki kalitesini sağlamıştır. Bozena ve Szczerba (1991), *in vitro* vişne kültürlerinde karbon kaynağı olarak sukroz, glikoz ve fruktoz şekerleri ile sorbitol alkol şekerini, geniş bir konsantrasyon aralığında denemiş ve hepsinde de en uygun dozun %2-3 olduğunu belirlemişlerdir. Sukroz ve glikoz ilave edilen ortamlarda yüksek çoğaltım oranı tespit edilirken fruktoz içeren ortamda daha uzun sürgünler elde edilmiştir. Harada ve Murai (1996), *Prunus mume* kültürlerinde farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemişlerdir. Glikoz sürgün çoğaltımında sukroz, fruktoz ve sorbitolden daha etkili bulunmuştur,

sukroz içeren besi ortamında sararmalar görülmüş ve sürgünlerin gelişmesi zamanla azalmıştır. Yıldırım (2006), Hacıhaliloğlu kayısı çeşidinde, lateral tomurcuklardan kültür başlatmaya farklı şeker tiplerinin etkisi belirlemek üzere yaptığı çalışmada, sukroz, fruktoz, glikoz ve maltoz kullanmış, en iyi sonucu veren sukrozun 30 gl^{-1} konsantrasyonunun yeterli olduğunu tespit etmiştir. Younas ve ark. (2008), kültüre alınan materyalin gelişmesinde karbon kaynağı tipi ve konsantrasyonunun büyük önem taşıdığı vurgulamış ve GF-677 anacında farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemişlerdir. Sukroz ve glikozun 6 farklı doz ve kombinasyonundan, 15 gl^{-1} sukroz + 15 gl^{-1} glikoz kombinasyonu sürgün çoğaltımı için en başarılı uygulama olmuştur. Marino ve ark. (1991), San Castrese ve Portici kayısı çeşitlerinin *in vitro* çoğaltımı üzerine bazı karbon kaynaklarının etkilerinin incelendiği araştırmada, sürgün çoğaltımı için sukroz kullanılmasının gerektiğini ve ortamda sorbitol kullanılmasıyla lateral sürgün gelişiminin arttığını tespit etmişlerdir. Nowak ve ark. (2004), bir erik çeşidinde yaptıkları yapraktan rejenerasyon çalışmasında sukroz, glikoza göre daha iyi bir karbon kaynağı olarak görülmüştür. Murai ve ark. (1996) tarafından, üç *Prunus mume* çeşidinde *in vitro* sürgün çoğaltımı için karbon kaynağı olarak sorbitol, sukroz ve glikoz denenmiş, yaşama oranı ve sürgün çoğaltımında sorbitol, sürgün uzamasında ise glikoz daha etkili bulunmuştur.

4.2.3.7. Tohumların *in vitro* Çimlendirilmesi

Tohum kullanılarak yapılan kültür başlatma çalışmalarında, ilk olarak kiraz tohumlarının farklı şekillerde hazırlanarak kültüre alınması üzerinde çalışılmıştır (Çizelge 4.29). Tüm parametrelerde “yarım kotiledonlu embriyonik uç” ekiminin en başarılı sonucu verdiği görülmektedir. Bu uygulamada çimlenme oranı 75 ± 7 , kök uzunluğu $44.0 \pm 4.4 \text{ mm}$, sürgün uzunluğu $9.2 \pm 1.1 \text{ mm}$ ve yaprak sayısı ise 2.9 ± 0.2 adet olarak belirlenmiştir. Embriyonik uç ile başlatılan kültürler, çimlenme oranı bakımından bu uygulamasına benzer sonuç vermiş ancak kök ve sürgün uzunluğu bakımından en geride kalan uygulama olmuştur. Normal ekim yapılan kültürler ise, çimlenme bakımından çok yetersiz kalmıştır. Bu sonuçlara paralel olarak; Yıldırım (2006), kayısı tohumlarını kullandığı çalışmada, aynı yöntemlerle eksplant hazırlamış ve birbirine benzer çimlenme oranları veren embriyonik uç ve yarım kotiledon eksplantlarının, normal ekime göre oldukça başarılı olduğunu tespit etmiştir.

Çimlendirmenin doğal şartlarda yapılması durumunda, çimlenmeye engel olan sert kabuğun geçirgen hale gelmesi ve tohumdaki inhibitörlerin uzaklaştırılması için katlama uygulaması yapıldığı bilinmektedir. *In vitro* çimlendirmelerde ise, kabuk çıkarıldığı için fiziksel bir engelleme söz konusu olmazken, içsel inhibitörler etkisini yine göstermektedir. Çalışmamızda, kotiledonlardaki inhibitörler ile çimlenme oranları arasında ilişki olduğu görülmüştür. Kotiledonlarına hiç müdahale edilmeyen tohumlar çok düşük oranda çimlenirken, kotiledonların kısmen veya tamamen çıkarıldığı uygulamalar en yüksek çimlenme oranlarını vermiştir. Diğer taraftan, yarım kotiledonlu embriyonik uç kullanımında sadece embriyonik uç kullanımına göre daha iyi bir kök ve sürgün gelişiminin olmasının, kotiledonların çimlenmede besin deposu olarak işlev görmesinden kaynaklandığı söylenebilir.

Kültüre alınan tohumların farklı sürelerde karanlıkta bırakılmasıyla kontrol grubuna göre daha yüksek çimlenme elde edilmiş ancak istatistiki olarak önemli bir farklılık oluşmamıştır (Çizelge 4.32). Genel bir değerlendirme ile 3 veya 7 günlük karanlıkta bekletme uygulamasının yararlı olacağı kanaatine varılmıştır.

4.3. Sürgün Çoğaltım Çalışmaları

4.3.1. Sürgün Çoğaltımına Besi Ortamlarının Etkisi

Kirazda sürgün çoğaltım protokolü geliştirmek için ilk olarak besi ortamları ele alınmıştır. Rozet sürgünler, farklı besi ortamlarında kültüre alınmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.33'de verilmiştir.

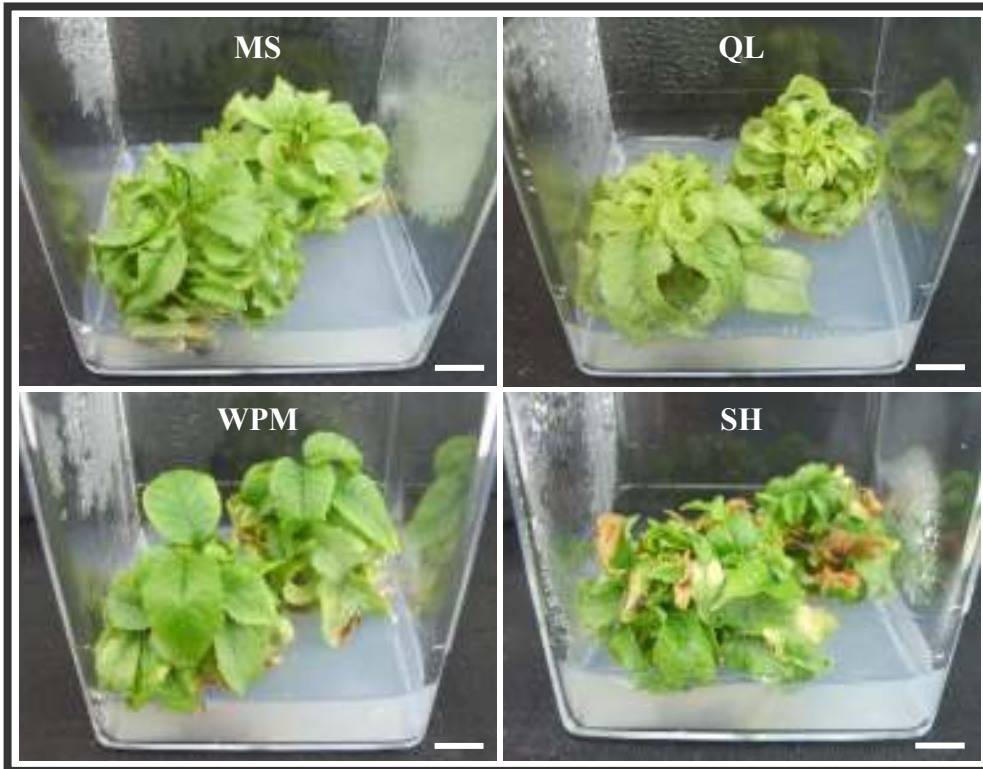
Çizelge 4.33. Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına farklı besi ortamlarının etkisi*

| Besi Ortamları | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Sürgün Sayısı (adet) | Ana Sürgün Uzunluğu (mm) | Yan Sürgün Uzunluğu (mm) |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| MS | 95.5 ± 4.5 | 3.00 ± 0.57 a | 11.12 ± 0.99 | 3.36 ± 0.11 b |
| QL | 93.3 ± 4.6 | 1.61 ± 0.31 b | 11.00 ± 0.79 | 4.66 ± 0.32 a |
| WPM | 76.7 ± 7.9 | 1.70 ± 0.32 b | 10.21 ± 1.19 | 4.36 ± 0.40 a |
| SH | 88.9 ± 7.6 | 2.13 ± 0.29 ab | 9.65 ± 0.65 | 4.07 ± 0.41 ab |
| | F= 1.908 sd= 3, 96 P>0.05 | F= 2.892 sd= 3, 84 P= 0.040 | F= 0.579 sd= 3, 84 P>0.05 | F= 5.579 sd= 3, 89 P= 0.001 |

* : Serilerde 20-30 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Deney sonuçlarına göre, sürgün sayısı ve yan sürgün uzunluğu bakımından, uygulamalar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Alt kültüre alınabilir eksplant oranı en yüksek MS besi ortamında (96 ± 5) elde edilmiş, bunu QL besi ortamı (93 ± 5) izlemiştir. En yüksek sürgün sayısı sırasıyla MS (3.0 ± 0.6) ve SH (2.1 ± 0.3) besi ortamlarında tespit edilmiştir. Ana sürgün uzunluğu bakımından besi ortamları birbirine benzer sonuçlar vermiş ve en yüksek değer yine MS besi ortamından (11.1 ± 1.0 mm) alınmıştır. Yan sürgün uzunluğu, sürgün sayısı ile ters orantılı olarak değişmiştir. En düşük çoğaltımı sağlayan QL besi ortamında en yüksek yan sürgün uzunluğu (4.7 ± 0.3 mm) elde edilmiştir.

Bu deneyde SH besi ortamındaki kültürlerde olgun yapraklar üzerinde büyük nekrozlar meydana geldiği görülmüştür. Genç yaprakların ve sürgün gövdesinin sağlıklı olmasından, bu durumun besi ortamının makro ve mikro element içeriği ile ilgili olduğu kanaatine varılmıştır. WPM besi ortamı, ölçülen parametrelere göre öne çıkan bir ortam olmamasına karşın, dikkat çekecek oranda daha canlı ve sağlıklı sürgünler vermiştir (Şekil 4.6). MS besi ortamı, incelenen parametrelerden çoğaltım açısından en önemlisi olan sürgün sayısı bakımından başarılı bulunmuştur. Bu ortamda yan sürgünlerin kısa kalmasının, sürgün sayısının fazla olması ile oluşan rekabetten kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.6. Sürgün çoğaltımı için farklı besi ortamlarının kullanıldığı deneyde, kültürün 28. günündeki gelişme durumları (Bar: 1.0 cm)

4.3.2. Sürgün Çoğaltımına Sitokin Tip ve Konsantrasyonlarının Etkisi

Besi ortamları deneyinde en başarılı sonucu veren MS besi ortamı kullanılarak, ilk olarak besi ortamına ilave edilen farklı sitokin tip ve konsantrasyonlarının etkilerini belirlemek üzere deney yapılmıştır. Başlangıçta, sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden BAP, TDZ ve kinetin kullanılmış, ancak kinetin içeren ortamlardaki eksplantların kısa sürede canlılığını kaybetmesi nedeniyle bu seri deney dışı bırakılmıştır. BAP ve TDZ serilerinin sonuçları Çizelge 4.34’de verilmiştir.

Çizelge 4.34. Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına farklı sitokin tip ve konsantrasyonlarının etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Sürgün Sayısı (adet) | Ana Sürgün Uzunluğu (mm) | Yan Sürgün Uzunluğu (mm) |
|---|---|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 0.1 mg ^l ⁻¹ BAP | 0.0 ± 0.0 | - | - | - |
| 0.5 mg ^l ⁻¹ BAP | 12.5 ± 8.5 bc | 1.00 ± 0.00 | 6.95 ± 1.65 | - |
| 1.0 mg ^l ⁻¹ BAP | 50.0 ± 12.9 a | 3.75 ± 1.81 | 15.20 ± 3.06 | 3.42 ± 0.12 |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP | 50.0 ± 12.9 a | 2.50 ± 0.63 | 15.26 ± 1.41 | 3.63 ± 0.09 |
| 4.0 mg ^l ⁻¹ BAP | 43.8 ± 12.8 a | 2.43 ± 0.53 | 11.51 ± 0.81 | 3.54 ± 0.22 |
| 0.1 mg ^l ⁻¹ TDZ | 0.0 ± 0.0 | - | - | - |
| 0.5 mg ^l ⁻¹ TDZ | 0.0 ± 0.0 | - | - | - |
| 1.0 mg ^l ⁻¹ TDZ | 25.0 ± 11.2 abc | 1.00 ± 0.00 | x | - |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ TDZ | 37.5 ± 12.5 ab | 1.00 ± 0.00 | x | - |
| 4.0 mg ^l ⁻¹ TDZ | 25.0 ± 11.2 abc | 1.00 ± 0.00 | x | - |
| | F= 4.307 sd= 9, 150 P= 0.0001 | F= 1.649 sd= 6, 36 P>0.05 | F= 2.780 sd= 3, 21 P>0.05 | F= 0.752 sd= 2, 41 P>0.05 |

* : Serilerde 16 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

x : Gözlem alınamamıştır.

TDZ içeren ortamlardaki sürgünlerde uzama olmamış ve dolayısıyla ana sürgün uzunluğu verileri alınmamıştır. Alt kültüre alınabilir eksplant oranları arasındaki farklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur. BAP serisinde 0.1 mg^l⁻¹, TDZ serisinde 0.1 ve 0.5 mg^l⁻¹ konsantrasyonlarda eksplantların tamamı kültür sonunda canlılığını

kaybetmiştir. TDZ içeren besi ortamlarında hiç yan sürgün meydana gelmemiş, en yüksek sürgün sayısı (3.8 ± 1.8) 1 mg l^{-1} BAP ilaveli besi ortamından alınmıştır. Ana sürgün uzunluğu bakımından sırasıyla 1 mg l^{-1} (15.2 ± 3.1) ve 2 mg l^{-1} BAP (15.3 ± 1.4) uygulamaları başarılı olmuştur. Yan sürgün oluşturan üç BAP konsantrasyonunda yan sürgün uzunlukları birbirine benzer sonuçlar vermiş ve en yüksek değer 2 mg l^{-1} BAP uygulamasından (3.6 ± 0.1) alınmıştır.

Bu deneyde, kinetin serisinden ise hiçbir sonuç alınamamış, TDZ'nin gerek eksplant canlılığı gerekse yeni sürgün oluşumu bakımından olumlu etki yapmadığı görülmüştür. Sürgün çoğaltımı için en etkili sitokinin BAP olmuştur. Ancak bir sonraki deneyde TDZ'nin de BAP ile birlikte tekrar denenmesi uygun bulunmuştur.

4.3.3. Sürgün Çoğaltımına BAP'ın Yüksek Konsantrasyonlarının Etkisi

Daha önce 4 mg l^{-1} konsantrasyona kadar kullanılan BAP'ın, besi ortamına daha yüksek oranlarda ilave edilmesinin sürgün çoğaltımına etkisini belirlemek üzere deney yapılmış ve alınan sonuçlar Çizelge 4.35'de verilmiştir.

Çizelge 4.35. Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına yüksek BAP konsantrasyonlarının etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Sürgün Sayısı (adet) | Ana Sürgün Uzunluğu (mm) | Yan Sürgün Uzunluğu (mm) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 4.0 mg l^{-1} BAP | 100.0 ± 0.0 | 3.00 ± 0.41 | 14.00 ± 0.35 | 5.85 ± 0.36 |
| 6.0 mg l^{-1} BAP | 100.0 ± 0.0 | 3.88 ± 0.60 | 13.79 ± 0.80 | 5.68 ± 0.21 |
| 8.0 mg l^{-1} BAP | 100.0 ± 0.0 | 4.13 ± 0.79 | 12.28 ± 0.54 | 5.74 ± 0.16 |
| | sd= 2, 45 | F= 0.315 sd= 2, 45 P>0.05 | F= 2.609 sd= 2, 45 P>0.05 | F= 0.082 sd= 2, 125 P>0.05 |

* : Serilerde 16 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

BAP'ın 4.0 , 6.0 ve 8.0 mg l^{-1} konsantrasyonlarının denendiği bu deneyde uygulamalar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Her üç BAP konsantrasyonunda da alt kültüre alınabilir eksplant oranı %100 olarak belirlenmiştir. sürgün sayısı BAP konsantrasyonuyla orantılı olarak artmış ve 8 mg l^{-1} içeren besi ortamında 4.1 ± 0.8 'a ulaşmıştır. Ana sürgün uzunluğu, konsantrasyonla ters orantılı olarak değişmiş, en yüksek değeri ($14.0 \pm 0.4 \text{ mm}$) 4 mg l^{-1} uygulaması vermiştir. Yan

sürgün uzunlukları birbirine benzer değerler göstermiş, 4 mg^l⁻¹ BAP'lı ortamda ortalama 5.9 ± 0.4 mm uzunluk elde edilmiştir.

BAP'ın yüksek konsantrasyonları, kiraz kültürlerinde herhangi bir olumsuz etki göstermemiş ve eksplant canlılığı ile sürgün çoğaltımı olumlu yönde etkilenmiştir.

4.3.4. Sürgün Çoğaltımına Sitokininler ile Birlikte Kullanılan GA₃'ün Etkisi

Giberellik asitin sitokininlerle birlikte besi ortamlarına ilave edilmesinin kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına etkisini görmek amacıyla, BAP ve TDZ'nin 1 ve 2 mg^l⁻¹ konsantrasyonları, 0.3 mg^l⁻¹ GA₃ ile kombine edilerek kullanılmış, alınan sonuçlar Çizelge 4.36'da verilmiştir.

Çizelge 4.36. Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına sitokinin - GA₃ kombinasyonlarının etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu (mg ^l ⁻¹) | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Sürgün Sayısı (adet) | Ana Sürgün Uzunluğu (mm) | Yan Sürgün Uzunluğu (mm) |
|--|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 1.0 BAP + 0.3 GA ₃ | 93.8 ± 6.3 | 4.80 ± 1.34 | 15.71 ± 1.18 a | 4.47 ± 0.25 |
| 2.0 BAP + 0.3 GA ₃ | 100.0 ± 0.0 | 4.63 ± 0.89 | 13.18 ± 1.33 a | 3.97 ± 0.18 |
| 1.0 TDZ + 0.3 GA ₃ | 75.0 ± 11.2 | 2.92 ± 0.70 | 8.94 ± 1.21 b | 4.48 ± 0.22 |
| 2.0 TDZ + 0.3 GA ₃ | 75.0 ± 11.2 | 2.25 ± 0.55 | 9.25 ± 1.11 b | 3.94 ± 0.22 |
| | F= 2.297 sd= 3, 60 P>0.05 | F= 1.678 sd= 3, 51 P>0.05 | F= 6.333 sd= 3, 51 P= 0.001 | F= 1.390 sd= 3, 149 P>0.05 |

* : Her seride 16 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 35. gününde alınmıştır.

Alınan sonuçlardan ana sürgün uzunluğu bakımından uygulamalar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. En yüksek alt kültüre alınabilir eksplant oranı 2 mg^l⁻¹ BAP + 0.3 mg^l⁻¹ GA₃ uygulamasından alınmış (%100) bunu 1 mg^l⁻¹ BAP + 0.3 mg^l⁻¹ GA₃ uygulaması (%94 ± 6) izlemiştir. Sürgün sayısı (4.8 ± 1.3) ve ana sürgün uzunluğu (15.7 ± 1.2 mm) bakımından 1 mg^l⁻¹ BAP + 0.3 mg^l⁻¹ GA₃ en başarılı kombinasyon olmuştur. Yan sürgün uzunluğu 3.9 ± 0.2 mm ile 4.5 ± 0.2 mm arasında değişmiş olup, BAP ve TDZ benzer sonuçlar vermiş ve her ikisinde yüksek konsantrasyonda uzunluk azalmıştır.

Bu deney sonucunda, bir önceki deneyde de iyi sonuç vermemiş olan TDZ'nin çalışmadan çıkarılarak, sürgün çoğaltma deneylerine sitokinin grubundan sadece BAP ile devam edilmesi uygun bulunmuştur. Besi ortamına GA₃ eklenmesinin olumlu etkisi görülmüş ve değişik konsantrasyonlarla denenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

4.3.5. Sürgün Çoğaltımına Farklı BAP ve GA₃ Kombinasyonlarının Etkisi

Bu deney, sitokinin deneyinde iyi sonuç veren BAP konsantrasyonları ile sürgün çoğaltımına olumlu etkisi görülen GA₃'ün farklı konsantrasyonları kombine edilerek düzenlenmiş elde edilen sonuçlar Çizelge 4.37'de verilmiştir.

Çizelge 4.37. Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına BAP - GA₃ kombinasyonlarının etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu (mg l ⁻¹) | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Sürgün Sayısı (adet) | Ana Sürgün Uzunluğu (mm) | Yan Sürgün Uzunluğu (mm) |
|---|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 1.0 BAP + 0.3 GA ₃ | 76.0 ± 8.7 c | 2.05 ± 0.37 a | 11.94 ± 0.73 | 5.24 ± 0.31 abc |
| 1.0 BAP + 0.5 GA ₃ | 81.8 ± 8.4 abc | 1.11 ± 0.11 b | 10.23 ± 0.72 | 7.04 ± 0.10 a |
| 1.0 BAP + 1.0 GA ₃ | 79.2 ± 8.5 bc | 1.00 ± 0.00 b | 10.95 ± 0.70 | - |
| 2.0 BAP + 0.3 GA ₃ | 96.4 ± 3.6 ab | 1.70 ± 0.35 ab | 12.03 ± 0.52 | 5.04 ± 0.27 bc |
| 2.0 BAP + 0.5 GA ₃ | 100.0 ± 0.0 a | 1.31 ± 0.18 b | 11.47 ± 0.62 | 4.40 ± 0.25 c |
| 2.0 BAP + 1.0 GA ₃ | 84.0 ± 7.5 abc | 1.38 ± 0.22 ab | 11.06 ± 0.58 | 6.38 ± 0.57 ab |
| 4.0 BAP + 1.0 GA ₃ | 100.0 ± 0.0 a | 1.33 ± 0.14 ab | 11.77 ± 0.52 | 4.85 ± 0.39 bc |
| 4.0 BAP + 2.0 GA ₃ | 93.3 ± 6.7 abc | 1.14 ± 0.14 b | 11.14 ± 0.82 | 3.86 ± 0.56 c |
| F= 2.454 sd= 7, 181 P= 0.02 | | F= 2.160 sd= 7, 160 P= 0.04 | F= 0.988 sd= 7, 160 P>0.05 | F= 2.619 sd= 6, 60 P= 0.025 |

* : Serilerde 16 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 35. gününde alınmıştır.

Alt kültüre alınabilir eksplant oranı, sürgün sayısı ve yan sürgün uzunluğu bakımından uygulamalar arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Uygulamalardan 2.0 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ GA₃ ve 4.0 mg l⁻¹ BAP + 1.0 mg l⁻¹ GA₃ kombinasyonlarında kültüre alınan eksplantların tamamı (%100) kültür sonuna kadar canlılığını korumuştur. En yüksek sürgün sayısı sırasıyla 1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.3 mg l⁻¹ GA₃ (2.1 ± 0.4) ve 2.0 mg l⁻¹ BAP + 0.3 mg l⁻¹ GA₃ (1.7 ± 0.4) kombinasyonlarından

alınmıştır (Şekil 4.7). Ana sürgün uzunlukları 10.2 ± 0.7 mm ile 12.0 ± 0.5 mm arasında değişmiş ve uygulamalar arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Yan sürgün uzunluğu bakımından en başarılı büyüme düzenleyiciler, sırasıyla 1.0 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} GA₃ (7.0 ± 0.1 mm) ve 2.0 mg l^{-1} BAP + 1.0 mg l^{-1} GA₃ (6.4 ± 0.6 mm) kombinasyonları olmuştur.



Şekil 4.7. 2 mg l^{-1} BAP ve 0.3 mg l^{-1} GA₃ ile desteklenen besi ortamında sürgün çoğaltımı. (A: Kültürde kullanılan rozet sürgünler. B, C: Kültür süresi sonunda gelişme durumu. D: Ana sürgün ve yeni oluşan yan sürgünler (Bar: 1.0 cm))

4.3.6. Sürgün Çoğaltımına Floroglukinol'ün Etkisi

Besi ortamına 126 mg l^{-1} (1 mM) ilave edilen Floroglukinol'ün kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına etkisini belirlemek üzere yapılan deneyde besi ortamları 2 mg l^{-1} BAP ile desteklenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.38'de verilmiştir.

Çizelge 4.38. Kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına Floroglukinol'un etkisi*

| Floroglukinol Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Sürgün Sayısı (adet) | Ana Sürgün Uzunluğu (mm) | Yan Sürgün Uzunluğu (mm) |
|---|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 mg ^l ⁻¹ (Kontrol) | 70.0 ± 10.5 | 2.29 ± 0.34 | 8.35 ± 0.63 | 4.30 ± 0.28 |
| 126 mg ^l ⁻¹ | 85.0 ± 8.2 | 2.59 ± 0.42 | 10.26 ± 1.05 | 4.71 ± 0.34 |
| | t= -1.125 sd= 38 P>0.05 | t= -0.424 sd= 29 P>0.05 | t= -1.271 sd= 29 P>0.05 | t= -0.758 sd= 43 P>0.05 |

* : Serilerde 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Ölçülen parametrelerin hepsinde Floroglukinol içeren besi ortamında daha yüksek değerler elde edilmiştir. Ancak iki uygulama arasındaki fark istatistik olarak önemli seviyede çıkmamıştır. Floroglukinol destekli ortamda alt kültüre alınabilir eksplant oranı %85 ± 8, sürgün sayısı 2.6 ± 0.4, ana sürgün uzunluğu 10.3 ± 1.1 mm, yan sürgün uzunluğu 4.7 ± 0.3 mm olarak belirlenmiştir.

4.3.7. Aksillar Sürgünlerin Gelişmesine BAP ve GA₃ Kombinasyonlarının Etkisi

Bu deneyde, sürgün çoğaltım çalışmalarında elde edilen aksillar sürgünlerin kültüründe, besi ortamına ilave edilen BAP ve GA₃ kombinasyonlarının etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.39'da verilmiştir.

Çizelge 4.39. Kiraz kültürlerinden elde edilen aksillar sürgünlerin gelişmesine farklı BAP ve GA₃ konsantrasyonlarının etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu (mg ^l ⁻¹) | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Sürgün Sayısı (adet) | Ana Sürgün Uzunluğu (mm) | Yan Sürgün Uzunluğu (mm) |
|--|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 2.0 BAP + 0.5 GA ₃ | 90.9 ± 6.3 | 1.95 ± 0.33 | 12.80 ± 1.02 | 6.45 ± 0.63 |
| 2.0 BAP + 1.0 GA ₃ | 87.0 ± 7.2 | 1.85 ± 0.37 | 13.15 ± 1.01 | 5.69 ± 0.49 |
| 4.0 BAP + 1.0 GA ₃ | 100.0 ± 0.0 | 1.48 ± 0.26 | 12.41 ± 0.78 | 6.22 ± 0.57 |
| 4.0 BAP + 2.0 GA ₃ | 91.3 ± 6.0 | 1.67 ± 0.34 | 11.76 ± 0.62 | 6.29 ± 0.56 |
| | F= 0.967 sd= 3, 87 P>0.05 | F= 0.560 sd= 3, 80 P>0.05 | F= 0.290 sd= 3, 80 P>0.05 | F= 0.354 sd= 3, 57 P>0.05 |

* : Her seride 23 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 28. gününde alınmıştır.

Kullanılan büyüme düzenleyici kombinasyonlarında birbirine benzer sonuçlar alınmış ve istatistiki farklılık görülmemiştir. En yüksek değerler; alt kültüre alınabilir eksplant oranında (%100) 4.0 mg^l⁻¹ BAP + 1.0 mg^l⁻¹ GA₃ uygulamasında; sürgün sayısı (2.0 ± 0.3) ve yan sürgün uzunluğunda (6.5 ± 0.6 mm) 2.0 mg^l⁻¹ BAP + 0.5 mg^l⁻¹ GA₃ uygulamasında; ana sürgün uzunluğunda (12.8 ± 1.0 mm) 2.0 mg^l⁻¹ BAP + 1.0 mg^l⁻¹ GA₃ uygulamasında elde edilmiştir.

4.3.8. Tohumdan Elde Edilen Sürgünlerin Çoğaltımına BAP Konsantrasyonlarının Etkisi

Kiraz tohumları ile başlatılmış kültürlerde sürgün çoğaltımına BAP konsantrasyonlarının etkisinin incelendiği bu deneyde 4 BAP konsantrasyonu kullanılmıştır. Tohumların çimlendirilmesi ile elde edilen eksplantlarda, kültür boyunca ana sürgünde boy gelişmesi olmadığından bu deneyde ana sürgün uzunluğu ile ilgili veriler alınmamıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.40'da verilmiştir.

Çizelge 4.40. Tohumdan başlatılmış kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına BAP konsantrasyonlarının etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Alt Kültüre Alınabilir Eksplant (%) | Sürgün Sayısı (adet) | Yan Sürgün Uzunluğu (mm) |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 0.5 mg ^l ⁻¹ BAP | 93.8 ± 6.3 | 2.20 ± 0.28 c | 5.46 ± 0.57 |
| 1.0 mg ^l ⁻¹ BAP | 100.0 ± 0.0 | 3.13 ± 0.43 bc | 6.04 ± 0.74 |
| 2.0 mg ^l ⁻¹ BAP | 100.0 ± 0.0 | 4.90 ± 0.84 ab | 6.50 ± 0.35 |
| 4.0 mg ^l ⁻¹ BAP | 100.0 ± 0.0 | 5.40 ± 0.69 a | 6.20 ± 0.31 |
| | F= 1.175 sd= 3, 68 P>0.05 | F= 5.981 sd= 3, 67 P= 0.001 | F= 1.173 sd= 3, 214 P>0.05 |

* : Serilerde 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 40. gününde alınmıştır.

İstatistiki analizde sürgün sayısında uygulamalar arasında önemli farklılık bulunmuştur. En düşük konsantrasyon dışında alt kültüre alınabilir eksplant oranları %100 olarak belirlenmiştir. En yüksek sürgün sayısı (5.4 ± 0.7) 4.0 mg^l⁻¹ BAP içeren besi ortamından alınmış, bunu 2.0 mg^l⁻¹ BAP'lı ortam (4.9 ± 0.8) izlemiştir. Yan sürgün uzunlukları 5.5 ± 0.6 mm ile 6.5 ± 0.4 mm arasında değişmiştir.

4.3.9. Sürgün Çoğaltım Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi ve Tartışma

Sürgün çoğaltım aşaması, mikroçoğaltım protokollerinin en önemli safhalarından biridir. Bu aşamada kallus dokusu üzerinden çoğaltım sağlanabildiği gibi, doğrudan adventif veya aksillar tomurcuklar yoluyla da yeni sürgünler rejenere edilebilmektedir. Kallus üzerinden adventif sürgün oluşumu ile daha hızlı bir çoğaltım yapmak mümkün olmakla birlikte, bu yöntemde genetik yapı bazen stabil olmayıp kültür süresi uzadıkça poliploid bitki oluşumu görülebilmektedir. Bu nedenle bitki türlerinin klonal çoğaltımında, başlangıç organlarından doğrudan adventif veya aksillar sürgün oluşturma yöntemi kullanılmaktadır (Mansuroğlu ve Gürel 2002).

4.3.9.1. Besi Ortamı

Bu araştırmada, ilk olarak sürgün çoğaltımına farklı besi ortamlarının etkisi incelemek üzere MS, QL, WPM ve SH besi ortamları denenmiştir (Çizelge 4.33). Bu deneyde SH besi ortamındaki kültürlerde olgun yapraklar üzerinde büyük nekrozlar meydana gelmiştir. WPM besi ortamı, ölçülen parametrelere göre öne çıkan bir ortam olmamasına karşın, dikkat çekecek oranda daha canlı ve sağlıklı sürgünler vermiştir. MS besi ortamı, alt kültüre alınabilir eksplant oranı (96 ± 5) ve sürgün sayısı (3.0 ± 0.6) dikkate alınarak en başarılı besi ortamı olarak belirlenmiş ve diğer sürgün çoğaltım deneylerinde standart olarak kullanılmıştır.

Bitki rejenerasyonu için çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilen çok sayıda besi ortamı içerisinde birkaç tanesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan MS besi ortamı, aslında tütün için geliştirilmiş olmasına rağmen çok sayıda bitki türü için kullanılan yüksek tuz içerikli bir ortamdır. SH besi ortamı hem monokotiledon hem de dikotiledonlar için kullanılmaktadır (Babaoğlu ve ark 2002). *Prunus* türleri için geliştirilen QL ve odunsu bitkiler için geliştirilen WPM ortamları yanında daha az kullanım alanı bulan birçok ortam daha doku kültürü çalışmalarında kullanılmaktadır. Canlı ve ark. (2008), tüm *Prunus* türlerinde başarı sağlayan ortak bir besi ortamının bulunmadığını ancak QL tuzlarının çoğaltımda daha iyi sonuçlar verdiğini belirten çalışmalar bulunduğunu ifade etmiştir.

Kiraz ve diğer *Prunus* türleri üzerinde yapılan *in vitro* araştırmaların sürgün çoğaltımı aşamasında, en fazla MS besi ortamından yararlanılmıştır (Borkowska 1985;

Gebhardt 1985; Sauer 1985; Cerović ve Ružić 1987; Schmidt ve Ketznel 1996; Özzambak ve Hepaksoy 1997a; Hammatt ve Grant 1998; Grant ve Hammatt 1999; Mandegarın ve ark. 1999; Aka-Kaçar ve ark. 2001; Erbenová ve ark. 2001; Tang ve ark. 2002; Petrevica ve Bite 2003; Ružić ve ark. 2003/4; Hepaksoy 2004; Osterc ve ark. 2004; Ruzic ve ark. 2005; Günal 2006; Büyükdemirci 2008; Demiral ve Ülger 2008; Fidancı ve ark. 2008; Ružić ve Vujović 2008; Sedlák ve Paprštejn 2008; Sedlak ve ark. 2008; Xilogiannis ve ark. 2008). Bunun yanında QL besi ortamı (Pérez-Tornero ve ark. 2000a; Pérez-Tornero ve ark. 2001; Matt ve Jehle 2005; Pascual ve Marin 2005; Song ve Sing 2005; Canlı ve Tian 2008) ve WPM besi ortamı (Pevalek-Kozlina ve Jelaska 1987; Grant ve Hammatt 2000; Pérez-Tornero ve ark. 2001; Manganaris ve ark. 2003; Takashina ve ark. 2003; Đurkovič 2006; Espinosa ve ark. 2006; Ning ve ark. 2007) kullanımı yaygın olan diğer ortamlardır. *Prunus* türleri üzerinde çalışan bazı araştırmacılar ise; AP (Almehdi ve Parfitt 1986; Parfitt ve Almehdi 1986; Zilkah ve ark. 1992; Ainsley ve ark. 2000) ve DKW (Pascual ve Marin 2005) gibi besi ortamlarını veya farklı ortamların karışımını (Dradi ve ark. 1996; Hammatt ve Grant 1997; Reidiboym-Talleux ve ark. 1999; Gentile ve ark. 2002) kullanmışlardır.

Farklı *Prunus* genotiplerinde sürgün çoğaltımı için en uygun besi ortamını belirlemek üzere birçok araştırma yapılmıştır. Bouzari ve ark. (2009), PHL-A kiraz anacının mikroçoğaltımında en yüksek çoğaltım oranını 0.5 mg l^{-1} BAP içeren MS besi ortamından (5.4 sürgün/eksplant) elde etmiş, bunu 0.5 mg l^{-1} BAP içeren DKW (5.3 sürgün/eksplant) ve 1 mg l^{-1} BAP içeren MS (4.5 sürgün/eksplant) besi ortamları izlemiştir. Dradi ve ark. (1996), mahlep ekotiplerinde MS, SH, QL ve Cheng (1978) besi ortamlarının farklı modifikasyon ve kombinasyonlarını kullandıkları çalışmada; SH makro elementleri, MS mikro elementleri ve Cheng vitaminleri ile hazırlanan besi ortamının diğerlerinden daha başarılı olduğunu ve bu ortamda 3.4 oranında çoğaltım sağlandığını bildirmişlerdir. Pérez-Tornero ve Burgos (2000), standart besi ortamlarını modifiye ederek kayısı çeşitlerinde toplam 6 besi ortamının etkisini incelemiş, besi ortamı etkisinin büyük oranda çeşide bağlı olduğunu ve genel olarak en iyi sonuçların QL ve modifiye WPM besi ortamlarından elde edildiğini tespit etmişlerdir. Kamali ve ark. (2001), GF-677 anacının mikroçoğaltım tekniğini geliştirmek üzere yürüttükleri çalışmada, modifiye Knop besi ortamının MS besi ortamına göre daha sağlıklı ve gelişmiş sürgünler verdiğini bildirmişlerdir. Ahmad ve ark. (2003), GF-677 anacının

mikroçoğaltımında MS ve Anderson (1984) besi ortamlarını kullanmış ve çalışma sonunda, sürgünlerin çoğalması, uzaması ve gelişmesi bakımından MS besi ortamının daha başarılı olduğunu, Anderson besi ortamındaki sürgünlerin zayıf kaldığını, sararma ve vitrifikasyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Channuntapipat ve ark. (2003), Nonpareil ve Ne Plus Ultra badem çeşitleri için uygun besi ortamlarını belirlemek üzere, MS, WPM, AP, TK ve QL besi ortamlarını denemiş ve Ne Plus Ultra çeşidi için MS, Nonpareil çeşidi için AP besi ortamını uygun bulmuşlardır. Andreu ve Marín (2005), Adesoto 101 (*Prunus insititia* L.) anacı üzerinde yürüttükleri çalışmada; MS, WPM ve QL besi ortamları ile yaptıkları 9 alt kültürden sonra, QL besi ortamında MS ve WPM besi ortamlarına göre çok daha az sürgün elde edildiğini bildirmişlerdir. Harada ve Murai (1996), *Prunus mume*'de sürgün çoğaltımı üzerine yaptıkları çalışmada, MS ve WPM besi ortamlarının etkilerini incelemişler, en uygun besi ortamının, gerekli büyüme düzenleyicileri ile desteklenen WPM olduğunu belirlemişlerdir.

Ayrıca, yapraktan sürgün rejenerasyonu için en uygun besi ortamını belirlemek üzere çalışmalar yürütülmüştür. Bhagwat ve Lane (2004), Lapins ve Sweetheart kiraz çeşitlerinin yapraklarından sürgün rejenerasyonu için MS besi ortamına göre daha başarılı olduğunu belirttikleri WPM besi ortamını kullanılmışlardır. Tang ve ark.(2002), kiraz ve vişne çeşitlerinin yapraktan rejenerasyonuna MS, DKW, QL ve WPM besi ortamlarının etkisini inceledikleri çalışmada, sürgün gelişimi bakımından WPM besi ortamını diğer ortamlardan daha başarılı bulmuşlardır. Matt ve Jehle (2005) tarafından, kiraz çeşitlerinde yaprak ve internod eksplantlarından sürgün rejenerasyonu için, QL, MS, CP, WPM ve DKW besi ortamları ve bunların kombinasyonları kullanılmış, DKW - WPM kombinasyonu ve QL besi ortamı diğerlerinden daha başarılı bulunmuştur. Miguel ve ark. (1996), bademde yürüttükleri yapraktan rejenerasyon çalışmalarında MS besi ortamını, modifiye QL besi ortamına göre adventif sürgün gelişimi bakımından daha etkili bulmuşlardır.

Bazı araştırmacılar, yeni geliştirdikleri besi ortamlarını standart ortamlarla karşılaştırmışlardır. Almehti ve Parfitt (1986), şeftali anaçlarının *in vitro* çoğaltımı için 10 farklı ortam kullanmış, en iyi sonucu bu araştırmacılar tarafından geliştirilen AP besi ortamı vermiş ve onu MS besi ortamı izlemiştir. Pérez-Tornero ve ark. (2000b), Canino kayısı çeşidine ait kültürlerde, "M3" olarak ifade edilen yeni geliştirdikleri besi ortamının, standart besi ortamlarına göre daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir.

4.3.9.2. Sitokinler

Kirazın mikroçoğaltım protokolü için uygun besi ortamı belirlendikten sonra büyüme düzenleyicilerin sürgün çoğaltımına etkisini incelemek üzere bir dizi deney yapılmıştır. İlk olarak besi ortamına ilave edilen farklı sitokin tip ve konsantrasyonlarının etkilerini belirlemek üzere BAP, TDZ ve kinetin kullanılmıştır (Çizelge 4.34). Kinetin içeren ortamlardaki eksplantların kısa sürede canlılığını kaybetmesi nedeniyle bu büyüme düzenleyici deney dışı bırakılmıştır. TDZ'nin, eksplant canlılığı bakımından başarılı olmadığı, eksplantların büyük yapraklar meydana getirdiği, ancak yeni sürgün oluşumu sağlamadığı belirlenmiştir. Bu deneyde sürgün çoğaltımı için en etkili sitokininin BAP olduğu görülmüş, 1 mg l^{-1} konsantrasyonda kullanıldığında alt kültüre alınabilir eksplant oranı $\%50 \pm 13$, sürgün sayısı 3.8 ± 1.8 adet, ana sürgün uzunluğu 15.2 ± 3.1 mm ve yan sürgün uzunluğu 3.4 ± 0.1 mm olarak belirlenmiştir.

Prunus türlerinde *in vitro* sürgün rejenerasyonu için en uygun sitokin tipini belirlemek üzere çok sayıda araştırma yapılmıştır. Birçok araştırmacı, çalışmamızın sonuçlarını destekler nitelikte, BAP'ın diğer sitokinlerden daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Ružić ve Vujović (2008), Lapins kiraz çeşidinin *in vitro* kültürlerinde, BAP, 2iP, kinetin ve TDZ'nin 5 farklı konsantrasyonunu tek başına ve IBA'nın 3 konsantrasyonu ile kombine ederek denemiş ve BAP içeren besi ortamlarından en başarılı sonuçları almışlardır. TDZ, kinetin ve 2iP içerikli tüm ortamlarda, çok düşük çoğaltım oranları ile birlikte uzun sürgünler ve - çalışmamızdaki gözlemlerimize paralel olarak - büyük yapraklar dikkati çekmiştir. Araştırmacılar, kiraz kültürlerinin çoğaltım aşamasında kullanılabilecek tek sitokininin BAP olduğu sonucuna varmışlardır. Sedlák ve Paprštein (2008), Karešova ve Rivan kiraz çeşitlerinde sürgün çoğaltımı için, besi ortamına BAP ($1, 2$ ve 4 mg l^{-1}), TDZ (0.5 ve 1 mg l^{-1}) ve 2iP (10 mg l^{-1}) ilave edilerek yapılan deneyde, Rivan çeşidinin en iyi 2 mg l^{-1} BAP içeren ortamda (3.0 sürgün/eksplant) sürgün oluşturduğunu belirlemişlerdir. Muna ve ark. (1999), Maxma-14 kiraz anacının sürgün çoğaltımı için BAP'ın kinetinden daha başarılı bir sitokin olduğunu tespit etmişlerdir. Yıldırım (2006), Hacıhaliloğlu kayısı çeşidinin *in vitro* sürgün çoğaltım çalışmalarında, en başarılı sitokin uygulamasının 1 mg l^{-1} BAP olduğunu ve TDZ ile kinetin sürgün çoğaltımında etkili olmadığını bildirmiştir.

Diğer sitokinlerle karşılaştırılmasından başka, sürgün çoğaltımında en uygun BAP konsantrasyonunu belirlemek üzere de araştırmalar yapılmıştır. Sedlak ve ark.

(2008), P-HL serisi kiraz anaçlarının *in vitro* çoğaltımına 0.2, 0.75, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg^l⁻¹ BAP konsantrasyonlarının etkisini incelemiş ve 1.5 mg^l⁻¹'lik konsantrasyonun üç anaçta da en yüksek sürgün sayısını (10.9, 7.7, 9.0 sürgün/eksplant) verdiğini belirlemişlerdir. Fidancı ve ark. (2001), Gisela-5, Maxma-14 ve Tabel Edabriz kiraz anaçlarının mikroçoğaltım çalışmalarında, BAP konsantrasyonu bakımından en iyi sonucu (9 sürgün/eksplant) 1 mg^l⁻¹ BAP ilaveli besi ortamından almışlardır.

Bazı çalışmalarda, besi ortamına ilave edilen BAP konsantrasyonunun, belirli aralıklar arasında artırılmasının sürgün çoğaltımını artırdığı, sürgün uzunluğunu ise azalttığı bildirilmiştir. Đurkovič (2006), yabancı kiraz ağaçlarına ait kültürlerde, 0 - 1 mg^l⁻¹ arasında kullandığı 5 farklı BAP konsantrasyonunda, dozun artmasıyla sürgün sayısının da arttığını bildirmiştir. Fidancı ve ark. (2008), üç kiraz anacı için, besi ortamına ilave edilen 0, 0.25, 0.50, 0.75 ve 1 mg^l⁻¹ BAP konsantrasyonlarının sürgün çoğaltımına etkisini incelemiş ve BAP konsantrasyonu yükseldikçe sürgün oluşumunun arttığını ancak vitrifikasyonun görüldüğünü bildirmişlerdir. Fotopoulos ve Sotiropoulos (2005), bir şeftali anacında BAP'ın 0, 0.09, 0.45, 0.90 ve 1.80 mg^l⁻¹ konsantrasyonlarını kullanmış, konsantrasyondaki artışla doğru orantılı olarak sürgün sayısı artmış, sürgün uzunluğu ise daha düşük olmuştur. Teixeira ve ark. (2004), yine bir şeftali anacında, 0, 0.5, 1, 2 ve 4 mg^l⁻¹ BAP konsantrasyonlarını kullanmış, bu konsantrasyonlar ile sürgün uzunluğunun ters orantılı olarak değiştiğini belirlemişlerdir. Pruski ve ark. (2005), iki *Prunus* türünde BAP'ın 0, 0.5, 1, 2 ve 5 mg^l⁻¹ konsantrasyonları kullanmış, konsantrasyon arttıkça sürgün sayısı artarken sürgün uzunluğunun azaldığını ve bu durumun yaklaşık 3.4 mg^l⁻¹ seviyesine kadar devam ettiğini, bundan sonra durumun tersine döndüğünü tespit etmişlerdir.

Bunlardan başka, *Prunus* türlerinin sürgün çoğaltımında BAP'ın etkileri üzerine birçok araştırma daha yapılmıştır. Bu araştırmalarda; Pérez-Tornero ve Burgos (2000) kayısıda 0.4 - 0.7 mg^l⁻¹; Murai ve ark. (1997), kayısıda 1.0 mg^l⁻¹; Silveira ve ark. (2001), erik anaçlarında 0.5 ve 0.7 mg^l⁻¹; Murai ve ark. (1996), *Prunus mume*'de 1.1 ve 2.3 mg^l⁻¹; Pruski ve ark. (2005), iki *Prunus* türünde 2.0 - 3.4 mg^l⁻¹ BAP konsantrasyonlarının en uygun olduğunu belirlemişlerdir.

Çalışmamızda BAP'ın 4, 6 ve 8 mg^l⁻¹'lik konsantrasyonlarının kullanıldığı deneyde, yüksek BAP içeriğinin kültürlerde herhangi bir olumsuz etki göstermediği ve

eksplant canlılığı ile sürgün çoğaltımını olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir (Çizelge 4.35). Buna karşılık, Đurkovič (2006), yabancı kirazda 3 mg l^{-1} 'nin üzerindeki dozlarda sürgünlerin uzamadığını, yapraklarda küçülme ve kıvrılma olduğunu; Sedlak ve ark. (2008), P-HL serisi kiraz anaçlarında, kullanılan en yüksek BAP konsantrasyonunun (2 mg l^{-1}) sürgün çoğalması ve gelişmesine olumsuz etki yaptığını; Pruski ve ark. (2005), farklı *Prunus* türlerinde 5 mg l^{-1} BAP uygulamasında yaprak renklerinin koyulaşarak vitrifikasyon belirtisi gösterdiğini bildirmişlerdir. Üzerinde çalıştığımız kiraz çeşidinde yüksek BAP konsantrasyonlarında bu belirtilerden herhangi birine rastlanmamıştır.

4.3.9.3. Sitokininlerle Birlikte Kullanılan GA_3

Kiraz kültürlerinde sürgün rejenerasyonunda, GA_3 'ün sitokininlerle birlikte kullanılması üzerine yapılan iki deneyden ilkinde, TDZ'li kombinasyonlar yine BAP'lı olanlara nisbeten başarısız olmuştur (Çizelge 4.36). İkinci deneyde daha geniş konsantrasyon seçenekleri ile BAP - GA_3 kombinasyonları denemeye alınmış ve bu iki deneyin sonuçlarına göre 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} GA_3 , 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} GA_3 ve 4.0 mg l^{-1} BAP + 1.0 mg l^{-1} GA_3 , kombinasyonları başarılı bulunmuştur (Çizelge 4.37).

Prunus türlerinde yapılan sürgün rejenerasyon çalışmalarının bir kısmında, büyüme düzenleyici olarak BAP - GA_3 kombinasyonlarından yararlanılmıştır. Theiler-Hedtrich ve Feucht (1985), vişne anaçlarının *in vitro* kültüründe en yüksek çoğaltma katsayısını (5.7), ilk iki kültürü 1 mg l^{-1} BAP sonraki alt kültürleri 1 mg l^{-1} BAP + 0.1 mg l^{-1} GA_3 içeren ortamdan elde etmişler, bu uygulamayı kültür başlatması ve tüm alt kültürleri 1 mg l^{-1} BAP + 0.1 mg l^{-1} GA_3 içeren ortam (4.3) izlemiştir. Demirkök (2006), bazı *Prunus* anaçlarının sürgün çoğaltımında besi ortamına 0.1 mg l^{-1} GA_3 sabit olmak üzere 0, 0.5, 1.0 ve 1.5 mg l^{-1} BAP ilave etmiş, en başarılı uygulamanın 1.5 mg l^{-1} BAP + 0.1 mg l^{-1} GA_3 kombinasyonu (üç genotip ortalaması 2.4 sürgün/eksplant) olduğunu tespit etmiştir.

Sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan diğer bir büyüme düzenleyici seçeneği ise, BAP + Oksin + GA_3 kombinasyonudur. Farklı *Prunus* genotiplerinde çalışan araştırmacıların sürgün rejenerasyonu için kullandıkları büyüme düzenleyicilerden bazıları şöyledir: Borkowska (1985), 1 mg l^{-1} BAP + 0.1 mg l^{-1} NAA + 0.1 mg l^{-1} GA_3 ; Petrevica ve Bite (2003), 1 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IAA + 0.3 mg l^{-1} GA_3 ; Hepaksoy (2004), 1 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IBA / NAA; Pevalek-Kozlina ve Jelaska (1987), 0.5 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IBA + 0.1 mg l^{-1} GA_3 ; Büyükdemirci (2008), 0.5 mg l^{-1} BAP + 0.01 / 0.1 mg l^{-1}

IBA + 0.1 mg^l⁻¹ GA₃; Hammatt ve Grant (1997), 1 mg^l⁻¹ BAP + 0.1 mg^l⁻¹ IBA + 0.1 mg^l⁻¹ GA₃; Cerović ve Ružić (1987), 0.5 mg^l⁻¹ BAP + 0.1 mg^l⁻¹ IBA + 0.1 mg^l⁻¹ GA₃.

Bu araştırmada, BAP - GA₃ kombinasyonunun, aksillar sürgünlerin gelişmesine etkisi de incelenmiştir (Çizelge 4.39). Sürgün çoğaltım çalışmalarında elde edilen aksillar sürgünler kullanılarak yapılan deneyde, kullanılan büyüme düzenleyici kombinasyonlarında birbirine benzer sonuçlar alınmış ve istatistiki farklılık görülmemiştir. En yüksek sürgün sayısı 2.0 mg^l⁻¹ BAP + 0.5 mg^l⁻¹ GA₃ uygulamasından elde edilmiştir. Sotiropoulos ve Fotopoulos (2005), benzer bir araştırmayı şeftali x badem melezi olan bir anaçta yapmışlar ve BAP'ın 0.02 ve 0.06 mg^l⁻¹ konsantrasyonları ile GA₃'ün 0, 0.01, 0.1 ve 1 mg^l⁻¹ konsantrasyonlarını kombine ederek denemişlerdir. Uygulamalar arası istatistiki fark görülmemiş ancak 0.02 mg^l⁻¹ BAP + 0.01 mg^l⁻¹ GA₃ uygulamasında sürgünlerin kalitatif ve kantitatif özellikleri daha yüksek bulunmuştur.

4.3.9.4. Floroglukinol

Besi ortamına 1 mM'e eşdeğer olan 126 mg^l⁻¹ konsantrasyonda ilave edilen Floroglukinol'un kiraz kültürlerinde sürgün çoğaltımına etkisini belirlemek üzere yapılan deneyde; kontrol grubuna göre daha yüksek değerler elde edilmiş, ancak iki uygulama arasındaki fark istatistiki olarak önemli seviyede çıkmamıştır (Çizelge 4.38). Besi ortamının 2 mg^l⁻¹ BAP ile desteklendiği çalışmada Floroglukinol içeren ortamda alt kültüre alınabilir eksplant oranı %85 ± 8, sürgün sayısı 2.6 ± 0.4, ana sürgün uzunluğu 10.3 ± 1.1 mm, yan sürgün uzunluğu 4.7 ± 0.3 mm olarak belirlenmiştir.

Hammatt ve Grant (1993), F 12/1 ve Colt kiraz anaçlarında yürüttükleri mikroçoğaltım çalışmasında, besi ortamına 126 mg^l⁻¹ Floroglukinol ilave edilmesinin, sürgün çoğaltımını artıran uygulamalardan olduğunu bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar, mikroçoğaltımın farklı aşamalarında Floroglukinol içeren besi ortamlarını kullanmışlardır (Takashina ve ark. 2003; Grant ve Hammatt 1999; Grant ve Hammatt 2000; Erbenová ve ark. 2001; Hammatt ve Grant 1997; Borkowska 1985; Pérez-Tornero ve ark. 2000b; Hammatt ve Grant 1998; Kamali ve ark. 2001).

4.3.9.5. Tohum Kaynaklı Kültürler

Son olarak kiraz tohumları ile başlatılmış kültürlerde sürgün çoğaltımına BAP konsantrasyonlarının etkisi incelenmiş ve konsantrasyon arttıkça sürgün sayısının da

arttığı görülmüştür (Çizelge 4.40). En yüksek sürgün sayısı 4.0 mg l^{-1} (5.4 ± 0.7) ve 2.0 mg l^{-1} (4.9 ± 0.8) BAP ilaveli besi ortamlarında elde edilmiştir. Sürgün uzunlukları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Yıldırım (2006), Hacıhaliloğlu kayısı çeşidine ait tohumlardan başlattığı kültürlerde, BAP'ın 5 farklı konsantrasyonunu kullanarak sürgün çoğaltımına etkisini incelemiştir. BAP konsantrasyonları arasında sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmuştur. Sürgün sayısı yönünden en yüksek sonuç 4 mg l^{-1} BAP uygulamasından elde edilmiş olup 19.5 ± 2.2 adet sürgün meydana gelmiş, bunu 15.1 ± 1.6 adet ile 2 mg l^{-1} BAP uygulaması takip etmiştir. BAP konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısı artarken, sürgün uzunluğunun azaldığı görülmüştür. Çalışmamızla paralel olarak, artan BAP konsantrasyonunun olumlu etkisi görülmüş, ancak iki çalışmada elde edilen sürgün sayıları büyük farklılık göstermiştir. Bu durum, iki türün genetik yapılarındaki dallanma kabiliyeti ile ilgili olarak ortaya çıkmıştır. Ayrıca, tohum kaynaklı kültürler ile tomurcuktan başlatılanlar arasında sürgün çoğaltımı bakımından görülen önemli farklılık, bu iki kaynaktan gelen sürgünlerin rejenerasyon kabiliyetlerinin farklı olduğunu göstermiştir.

4.4. Köklendirme Çalışmaları

Sürgün çoğaltımı ile elde edilen ve belirli bir büyüklüğe ulaşan sürgünlerin köklendirilmesi amacıyla, tomurculardan geliştirilmiş kültürlerde köklenmeye alınacak yeterince sürgün sağlanamadığı için, köklendirme deneylerinde tohum kaynaklı sürgünler kullanılmıştır.

4.4.1. Sürgün Köklenmesine IBA ve NAA Konsantrasyonlarının Etkisi

Kiraz sürgünlerinin köklenmesine besi ortamına ilave edilen oksinlerin etkisinin incelendiği bu deneyde, 0.5 ve 1.0 mg l^{-1} konsantrasyonlarda IBA ve NAA kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.41'de verilmiştir.

Sonuçların istatistiksel analizinde kök sayısı ve uzunluğu bakımından uygulamalar arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur. Köklenme oranı ve kök sayısı bakımından büyüme düzenleyicilerin yüksek konsantrasyonları daha iyi sonuç vermiştir. En yüksek köklenme oranı (95 ± 5) 1.0 mg l^{-1} NAA içeren besi ortamından elde edilmiş, ancak istatistiksel fark görülmemiştir. Kök sayısı bakımından en iyi uygulamalar sırasıyla 1.0 mg l^{-1} NAA (10.1 ± 1.4 adet) ve 1.0 mg l^{-1} IBA (8.2 ± 1.3 adet) olarak belirlenmiştir. Kök uzunluğu

her iki büyüme düzenleyicinin düşük konsantrasyonlarında daha yüksek bulunmuş, 0.5 mg l^{-1} NAA içeren besi ortamında en uzun ($39.7 \pm 1.1 \text{ mm}$) kökler oluşmuştur (Şekil 4.8).

Çizelge 4.41. Tohumdan başlatılmış kiraz kültürlerinde sürgün köklenmesine IBA ve NAA konsantrasyonlarının etkisi*

| Büyüme Düzenleyici Konsantrasyonu | Köklenme (%) | Kök Sayısı (adet) | Kök Uzunluğu (mm) |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 0.5 mg l^{-1} IBA | 75.0 ± 9.9 | 4.73 ± 0.69 b | 37.8 ± 2.4 b |
| 1.0 mg l^{-1} IBA | 85.0 ± 8.2 | 8.18 ± 1.32 ab | 30.6 ± 1.3 c |
| 0.5 mg l^{-1} NAA | 85.0 ± 8.2 | 7.82 ± 1.05 ab | 39.7 ± 1.1 a |
| 1.0 mg l^{-1} NAA | 95.0 ± 5.0 | 10.05 ± 1.44 a | 34.5 ± 0.8 b |
| | F= 1.304 sd= 3, 76 P>0.05 | F= 2.823 sd= 3, 64 P= 0.046 | F= 10.862 sd= 3, 530 P= 0.0001 |

* : Serilerde 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 21. gününde alınmıştır.

4.4.2. Sürgün Köklenmesine Karanlık Uygulamasının Etkisi

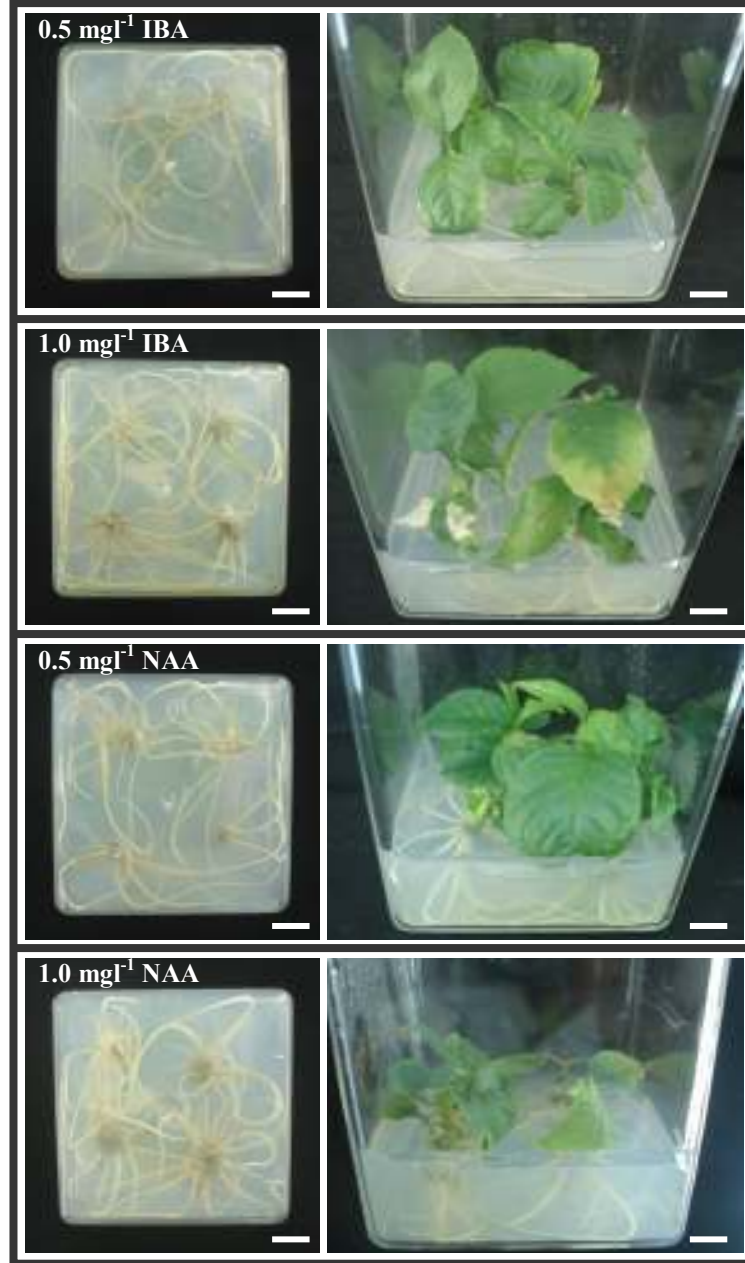
Karanlıkta bekletme uygulamasının kiraz mikro sürgünlerinin köklenmesi üzerine etkisini belirlemek üzere yapılan bu deneyde, 0.5 mg l^{-1} IBA ile desteklenmiş besi ortamı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.42’de verilmiştir.

Karanlıkta bırakma uygulaması ile kontrol grubu arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık görülmemiştir. Bütün parametrelerde kontrol grubu daha iyi sonuçlar vermiş, köklenme oranı $\%75 \pm 10$, kök sayısı 4.7 ± 0.7 adet ve kök uzunluğu $37.8 \pm 2.4 \text{ mm}$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.42. Tohumdan başlatılmış kiraz kültürlerinde sürgün köklenmesine karanlık uygulamasının etkisi*

| Uygulama | Köklenme (%) | Kök Sayısı (adet) | Kök Uzunluğu (mm) |
|----------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Kontrol | 75.0 ± 9.9 | 4.73 ± 0.69 | 37.8 ± 2.4 |
| 7 Gün Karanlık | 70.0 ± 10.5 | 4.71 ± 0.87 | 32.0 ± 2.3 |
| | t= 0.346 sd= 38 P>0.05 | t= 0.232sd= 27 P>0.06 | t= 1.655 sd= 135 P>0.05 |

* : Serilerde 20 eksplant kullanılmış ve sonuçlar kültürün 21. gününde alınmıştır.



Şekil 4.8. Oksin içeriği farklı olan besi ortamlarında, kiraz sürgünlerinin köklenme durumu (Bar: 1.0 cm)

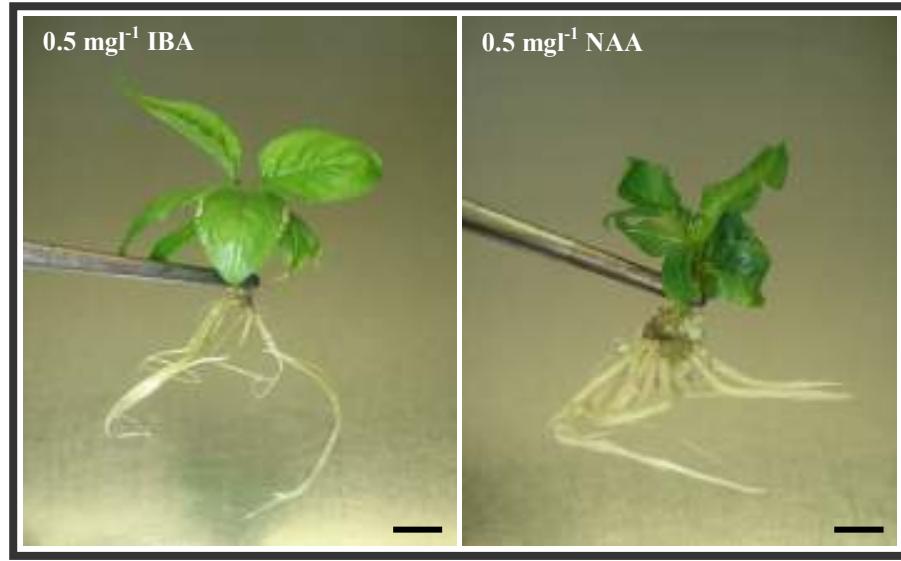
4.4.3. Köklendirme Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi ve Tartışma

Kiraz sürgünlerinin köklendirilmesi üzerine yapılan çalışmalarda tomurcuklardan geliştirilmiş kültürlerde köklenmeye alınacak yeterince sürgün sağlanamadığı için, tohum kaynaklı sürgünler kullanılmıştır.

4.4.3.1. Oksinler

İlk olarak oksin grubu büyüme düzenleyicilerden IBA ve NAA'nın 0.5 ve 1.0 mg^l⁻¹ konsantrasyonlarda besi ortamına ilavesinin etkileri incelenmiştir (Çizelge 4.41). Her iki büyüme düzenleyicinin yüksek konsantrasyonları daha başarılı bulunmuştur. Aynı konsantrasyonlar dikkate alındığında NAA'nın daha yüksek köklenme sağladığı görülmüştür. Deneyde, en yüksek köklenme oranı (%95 ± 5) ve kök sayısı (10.1 ± 1.4 adet) 1.0 mg^l⁻¹ NAA uygulamasından; en yüksek kök uzunluğu (39.7 ± 1.1 mm) 0.5 mg^l⁻¹ NAA uygulamasından alınmıştır. Ancak sayısal olarak NAA daha başarılı bulunmasına karşın, bu büyüme düzenleyici ile elde edilen kökler; kallus dokusu üzerinde oluşmuş, oldukça kırılgan ve hassas bir yapı göstermiştir. IBA içeren ortamlarda ise; kallus oluşumunun çok az ve elde edilen köklerin daha sağlıklı olduğu görülmüştür (Şekil 4.9). Hepaksoy (1997), bir vişne çeşidinde yaptığı çalışmada, köklendirme ortamında yer alan NAA ve IBA'nın, sürgün tabanında kallus oluşumuna neden olduğunu ve bu durumun her iki oksinin dezavantajını oluşturduğunu belirtmiştir. Muna ve ark. (1999), Maxma-14 kiraz anacında köklendirmede kullanılan oksinlerden NAA'nın yüksek oranda, IBA'nın düşük oranda kallus oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Bitki türlerinin çoğunda, *in vitro* köklenmenin desteklenmesi için 0.1 mg^l⁻¹ ile 1.0 mg^l⁻¹ arası konsantrasyonlarda NAA ya da IBA'ya gereksinim duyulduğu bilinmektedir (Mansuroğlu ve Gürel 2002). Kiraz ve vişne mikro sürgünlerinin köklendirilmesinde en sık kullanılan oksin IBA'dır. Đurkovič (2006), yabancı kiraz ağaçlarının mikroçoğaltımında farklı IBA dozları ile IBA ve 2,4-D kombinasyonlarını kullanmış, en iyi köklenme oranını 0.3 mg^l⁻¹ IBA ilaveli ortamda %73 olarak tespit etmiştir. Borkowska (1985), Schattenmorelle vişne çeşidinin sürgünlerinin IBA ilaveli ortamda tamamının köklendiğini, kök sayısının 4.2 - 4.8 adet, kök uzunluğunun ise 29.0 - 37.8 mm arasında gerçekleştiğini bildirmiştir. Dradi ve ark. (1996), *Prunus mahaleb* ekotiplerinde, 0.8 - 3.0 mg^l⁻¹ IBA ile köklenmenin sağlandığını, en yüksek köklenme oranının %66 olduğunu bildirmişlerdir. Buzkan ve ark. (1997) *Prunus mahaleb*



Şekil 4.9. IBA ve NAA'nın 0.5 mg l^{-1} konsantrasyonunu içeren besi ortamında köklenmiş kiraz bitkileri (Bar: 1.0 cm)

sürgünlerini $0.5 - 1.0 \text{ mg l}^{-1}$ IBA içeren ortamda başarıyla köklendirmiş, 0.5 mg l^{-1} IBA ile %50; 1.0 mg l^{-1} IBA ile %75-85 köklenme sağlamışlardır. Fidancı ve ark. (2001), Gisela-5, Maxma-14 ve Tabel Edabriz kiraz anaçlarında 1 mg l^{-1} IBA ilaveli $\frac{1}{2}$ MS besi ortamında %100 köklenme elde etmiş ve ortalama kök sayısı 12 adet, kök uzunluğu 3.8 cm olarak belirlemiştir. Pedrotti ve ark. (1994), yabancı kirazın sürgünlerini 1.1 mg l^{-1} IBA ilaveli besi ortamında 5 gün bıraktıktan sonra, farklı aminoasitleri içeren ortamlarda kültüre aldıklarında, kök sayıları bakımından bütün uygulamalarda benzer sonuçları (9-10 kök/sürgün) elde etmişlerdir. Sülüsoğlu ve Çelik (2007), *Prunus mahaleb* anaçlarının köklendirilmesi için IBA'nın 0, 0.1, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg l^{-1} konsantrasyonlarını denemiş, kara idris anacında en yüksek köklenme oranını ilk yıl 2 mg l^{-1} IBA, ikinci yıl 0.5 mg l^{-1} IBA içeren ortamda (her ikisinde de %79) almıştır. Sarı idris anacında ise, köklenme oranı her iki yıl 2.0 mg l^{-1} dozunda (%81, %92), kök sayısı birinci yıl 0.5 mg l^{-1} (4.6 adet), ikinci yıl 2.0 mg l^{-1} (3.9 adet) dozunda en yüksek bulunmuştur. Bu çalışmalardan başka; Grant ve Hammatt (1999), F12/1 anacında 3 mg l^{-1} ; Sedlak ve ark. (2008), P-HL serisi kiraz anaçlarında 2.5 mg l^{-1} ; Pevalek-Kozlina ve Jelaska (1987), yabancı kirazında, 1 mg l^{-1} ; Xilogiannis ve ark. (2008), kiraz anaçlarından CAB 6P için 1 mg l^{-1} , SL 64 için 2 mg l^{-1} ; Büyükdemirci (2008), Gisela-5'de $0.5-1 \text{ mg l}^{-1}$ konsantrasyonlarda IBA kullanarak başarıyla köklendirme yapmışlardır.

Bazı araştırmacılar ise, çalıştıkları genotipte köklendirme yapmak için NAA kullanmışlardır. Demiral ve Ülger (2008), Gisela-5 kiraz anacında yürüttükleri çalışmada, farklı NAA konsantrasyonlarını deneyerek, en iyi köklenmeyi %93 ile 6 mg l^{-1} NAA uygulamasında elde etmişlerdir. Petrevica ve Bite (2003), vişne çeşitlerinde mikro sürgünlerin köklenmesini 0.1 mg l^{-1} NAA içeren ortamda gerçekleştirmiştir. Zilkah ve ark. (1992), kirazın üç melez anacında köklendirme için, 0.5 mg l^{-1} NAA içeren yarı yoğunluktaki MS besi ortamından yararlanmışlardır. Bhagwat ve Lane (2004), Lapins ve Sweetheart kiraz çeşitlerinin yapraklarından elde ettikleri sürgünleri köklendirirken, 0.5 mg l^{-1} NAA kullanmış, Sweetheart çeşidinde %20, Lapins çeşidinde ise %85 köklenme sağlamışlardır.

IBA ve NAA'nın karşılaştırmalı olarak incelendiği çalışmalarda farklı genotiplerdeki sonuçlar çeşitlilik göstermiştir. Fidancı ve ark. (2008), Gisela-5, Maxma-14 ve Tabel Edabriz kiraz anaçlarında, MS besi ortamının tam ve $\frac{1}{2}$ yoğunlukları ile IBA ve NAA konsantrasyonlarını kullanmış, MS + 1 mg l^{-1} IBA kombinasyonunda 3 hafta içinde %95-100 köklenme sağlamışlardır. Özzambak ve Hepaksoy (1997b), Heimanns Rubinweichsel vişne çeşidine ait mikro sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesinde, IAA, IBA ve NAA'nın, 1, 2, 3 ve 4 mg l^{-1} 'lik konsantrasyonlarını denemiş; IAA (%79), IBA (%74) ve NAA (%79) benzer köklenme oranı sağlamıştır. Tang ve ark.(2002), kiraz ve vişne çeşitlerinde yapraktan rejenerasyonla elde ettikleri sürgünleri, 2 mg l^{-1} konsantrasyonda IBA veya NAA içeren ortamlarda köklendirmeye almışlar ve her iki oksinin $\frac{1}{2}$ MS besi ortamına ilave edilmesiyle yeterli köklenmenin sağlandığını bildirmişlerdir. Canlı ve Tian (2008), 5 kiraz çeşidine ait kotiledonlardan sürgün rejenerasyonu sağlamış ve bu sürgünleri köklendirmek için kullandığı 1 mg l^{-1} NAA içerikli ortamın, 3 mg l^{-1} IBA'lı diğer ortamdan daha iyi köklenme sağladığını bildirmişlerdir.

Araştırmamızla ilgili olarak köklendirme çalışmalarına değindiğimiz kiraz, vişne ve mahlep genotiplerinden başka, diğer *Prunus* türlerindeki anaç ve çeşitlerde de, çok sayıda *in vitro* köklendirme çalışması yürütülmüştür (Alderson ve ark. 1987; Hammerschlag ve ark. 1987; Morini ve ark. 1991; Harada ve Murai 1996; Murai ve ark. 1996; Murai ve ark. 1997; Kramarenko 1999; Pérez-Tornero ve Burgos 2000; Pérez Tornero ve ark. 2000b; Kamali ve ark. 2001; Ahmad ve ark. 2003; Channuntapipat ve ark. 2003; Manganaris ve ark. 2003; Rogalski ve ark. 2003a;

Fotopoulos ve Sotiropoulos 2005; Demirkök 2006; Koubouris ve Vasilakakis 2006; Yıldırım 2006).

4.4.3.2. Karanlık Uygulaması

Kiraz sürgünlerinin köklendirilmesi üzerine karanlık uygulamasının etkisini incelediğimiz deneyde, kültürleri bir hafta karanlıkta bırakma uygulamasının kiraz sürgünlerinin köklenmesini pek etkilemediği görülmüştür (Çizelge 4.42). Benzer sonuçlar kiraz ve vişne çeşitleri için (Tang ve ark. 2002) ve Hacıhaliloğlu kayısı çeşidi için (Yıldırım 2006) bildirilmiştir.

Diğer taraftan bazı araştırmacılar ise kullandıkları *Prunus* genotiplerinde, sürgünlerin karanlıkta bekletilmesiyle daha iyi bir köklenme sağladıklarını bildirmişlerdir. Hammerschlag ve ark. (1987), şeftalide yürüttükleri çalışmada, en iyi köklenmenin, yarım yoğunlukta MS besi ortamına bırakılan sürgünlerin karanlık ortamda 4 °C'de 35-40 gün bekletildikten sonra köklenme ortamına alınarak yine karanlıkta 26 °C'de 14 gün bırakılması ile elde edildiğini bildirmişlerdir. Murai ve ark. (1996), *Prunus mume* çeşitlerinde 1 mg^l-1 IBA içeren ortamda yapılan 10 gün karanlıkta bekletme uygulamasında, kontrol grubuna göre daha yüksek köklenme oranı ve kök sayısı elde etmişlerdir. Tricoli ve ark. (1985), *Prunus serotina*'da köklendirme aşamasında sürgünleri sürekli karanlıkta bırakmanın köklenmeyi teşvik ettiğini belirtmişlerdir.

Diğer bazı araştırmalarda da köklendirme aşamasında karanlıkta bekletme işlemi rutin olarak uygulanmıştır (Kramarenko 1999; Kamali ve ark. 2001; Tang ve ark. 2002; Matt ve Jehle 2005; Song ve Sing 2005; Espinosa ve ark. 2006; Canlı ve Tian 2008).

Besi ortamının oksin ile desteklenmesi ve karanlık uygulaması dışında, sürgün köklenmesini olumlu etkileyen başka uygulamalar da bildirilmektedir. Petrevica ve Bite (2003), vişne çeşitlerinde mikro sürgünlerin uzunluğunun köklenmeyi etkilediğini belirterek, 11.0 - 16.4 mm arasında sürgün uzunlukları ile; %56-95 arasında köklenme oranı, 1.9 - 3.0 arasında kök sayısı ve 51.2 - 67.4 mm arasında kök uzunluğu elde edildiğini bildirmişlerdir. Gebhardt (1985), Schattenmorelle vişne çeşidinde köklendirme için 5 uygulama denemiş, en iyi sonucu, sürgünleri 200 mg^l-1 IBA çözeltisinde 3 sn bekletip bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda kültüre alma uygulamasından almış, eksplant başına 2 mm'den büyük kök sayısı 4.1 adet olarak

belirlemiştir. Benzer bir sonuçla; Hepaksoy ve Tanrısever (2004), Gisela-5 ve Gisela-6 kiraz anaçlarında farklı büyüme düzenleyici kombinasyonları ile yeterli bir köklenme elde edememiş, sürgünlerin dikimden önce 666 mg l^{-1} NAA çözeltisine 1 sn batırılması uygulaması ile köklenme oranının %59 olduğunu belirtmişlerdir. Büyükdemirci (2008), Gisela-5 kiraz anacında, besi ortamının nitrat içeriğinin azaltılmasının köklenmeyi olumlu etkilediğini bildirmiştir.

4.5. Dış Ortama Alıştırma (Aklimatizasyon) Çalışmaları

4.5.1. Dikim Ortamlarının Aklimatizasyona Etkisi

Kiraz bitkilerinin dikimi için en uygun dikim ortamını belirlemek üzere yapılan bu deneyde torf, torf-perlit karışımı ve torf-vermikulit karışımı kullanılmıştır. Deneyin sonuçları Çizelge 4.43’de verilmiştir.

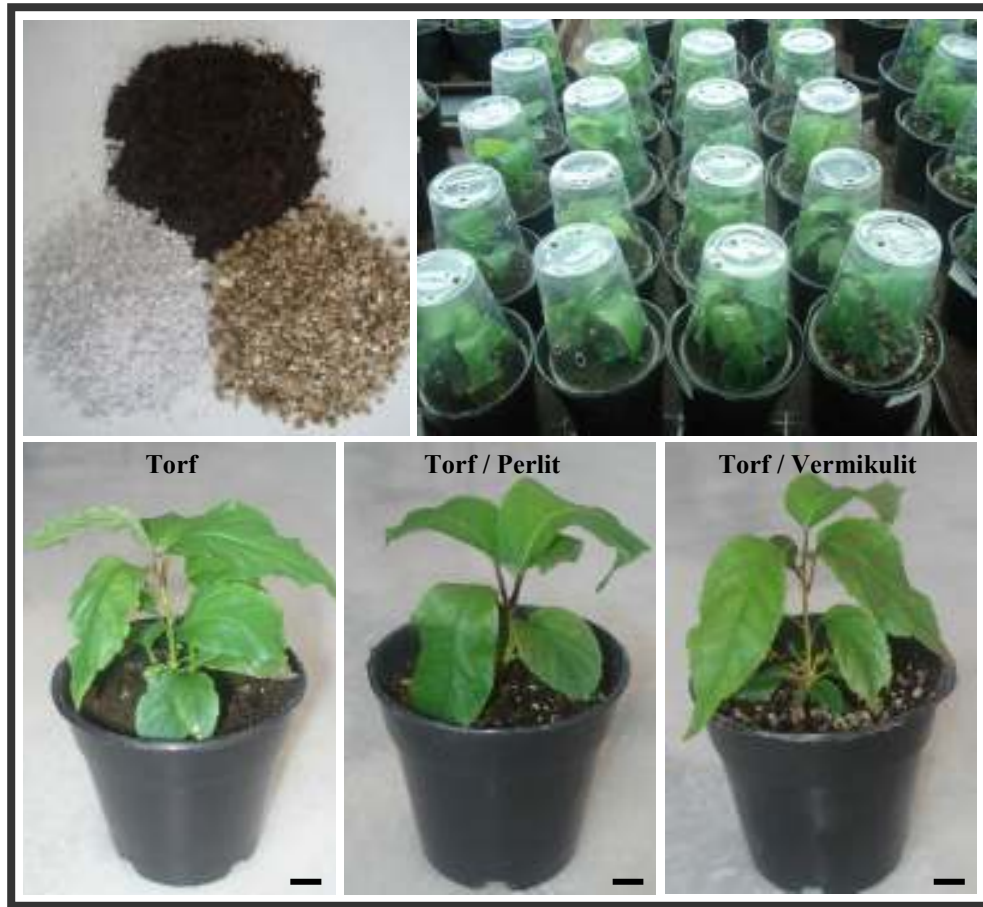
Çizelge 4.43. Köklendirilmiş kiraz bitkilerinin aklimatizasyonuna dikim ortamlarının etkisi*

| Dikim Ortamı | Aktarılan Bitki Sayısı (adet) | Yaşayan Bitki Oranı (%) |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Torf | 26 | 50.0 ± 10.0 |
| Torf : Perlit (2:1 h/h) | 27 | 59.3 ± 9.6 |
| Torf : Vermikulit (2:1 h/h) | 25 | 48.0 ± 10.2 |

F= 0.370 sd= 2, 75
P>0.05

* : Sonuçlar aktarma işleminden 45 gün sonra alınmıştır.

Yaşayan bitki oranları arasında istatistiki farklılık görülmemiştir. En yüksek oran (59 ± 10) torf-perlit karışımından elde edilmiştir. Bitki ölümlerinin tamamı dikimi izleyen ilk 1-2 hafta içerisinde gerçekleşmiştir. Yaşayan bitkiler çok iyi gelişme göstermişlerdir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Farklı dikim ortamlarına aktarılan köklü kiraz bitkilerinin, aklimatizasyon aşamasındaki görünüşleri (Bar: 1.0 cm)

4.5.2. Köklendirmede Kullanılan Oksinlerin Aklimatizasyona Etkisi

Farklı tip ve konsantrasyondaki oksinlerle köklendirilmiş olan kiraz bitkilerinin aklimatizasyonunun incelendiği bu deneyde, 0.5 ve 1.0 mg⁻¹ konsantrasyonda IBA ve NAA içeren besi ortamında köklendirilen bitkilerin dikim ortamındaki yaşama oranları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.44’de verilmiştir.

İstatistiki olarak, iki büyüme düzenleyici arasındaki fark önemli bulunurken her iki büyüme düzenleyicinin konsantrasyonlarının etkisi önemsiz seviyede kalmıştır. IBA içeren besi ortamında köklendirilen bitkiler, NAA içeren ortamda köklendirilenlere göre daha yüksek yaşama oranı sağlamışlardır. En yüksek yaşayan bitki oranı (%85 ± 7) 0.5 mg⁻¹ IBA ile köklendirilen bitkilerden alınmıştır.

Çizelge 4.44. Köklendirilmiş kiraz bitkilerinin aklimatizasyonuna köklendirmede kullanılan oksinlerin etkisi*

| Köklendirmede Kullanılan Oksinler | Aktarılan Bitki Sayısı (adet) | Yaşayan Bitki Oranı (%) |
|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 0.5 mg ^l ⁻¹ IBA | 27 | 85.2 ± 7.0 a |
| 1.0 mg ^l ⁻¹ IBA | 15 | 60.0 ± 13.1 a |
| 0.5 mg ^l ⁻¹ NAA | 15 | 26.7 ± 11.8 b |
| 1.0 mg ^l ⁻¹ NAA | 21 | 23.8 ± 9.5 b |

F= 10.222 sd= 3, 74
P= 0.0001

* : Sonuçlar aktarma işleminden 45 gün sonra alınmıştır.

Köklendirme deneylerine ait sonuçlar değerlendirilirken, NAA ile yapılan köklendirmelerde nazik ve kırılğan bir kök yapısının oluştuğu belirtilmiştir. Bu kırılğan yapı nedeniyle, bitkinin dikim ortamına aktarılması sırasında köklerin zarar görmesi söz konusu olmuştur. NAA uygulamasındaki düşük yaşama oranlarının sebebi olarak bu durum gösterilebilir. IBA ile köklendirilen bitkiler ise daha sağlıklı kök yapıları sayesinde yüksek başarı göstermişlerdir.

4.5.3. Soğuk Uygulamasının Aklimatizasyona Etkisi

Kiraz bitkilerinin soğukta bekletilmesinin, yaşayan bitki oranına etkisini belirlemek üzere yapılan bu deneyde, köklü kiraz bitkileri buzdolabında 4 ± 1 °C'de 3 hafta bırakıldıktan sonra dikilmiştir. Deneyin sonuçları Çizelge 4.45'de verilmiştir.

Çizelge 4.45. Köklendirilmiş kiraz bitkilerinin aklimatizasyonuna soğuk uygulamasının etkisi*

| Uygulama | Aktarılan Bitki Sayısı (adet) | Yaşayan Bitki Oranı (%) |
|------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Kontrol | 13 | 76.9 ± 12.2 |
| Soğuk Uygulaması | 14 | 100.0 ± 0.0 |

t= -1.972 sd= 25
P>0.05

* : Sonuçlar aktarma işleminden 45 gün sonra alınmıştır.

Deney sonunda soğukta bırakılan bitkilerin tamamı (%100) canlılığını korurken, kontrol grubunda yaşayan bitki oranı 77 ± 12 olmuştur. Kullanılan bitki sayısı az olduğu için uygulamalar arasında fark istatistiki olarak belirlenememiştir.

4.5.4. Aklimatizasyonda Kullanılan Havalandırma Yöntemleri

Aklimatizasyon deneylerinde dikim ortamlarına aktarılan kiraz bitkilerinin üzeri şeffaf plastik kap ile kapatılmıştır. Bu uygulama ile yaprak alanı etrafındaki *ex vitro* şartlardaki nem oranının, kültür kabı içerisindeki *in vitro* nem oranına benzer olması sağlanmıştır. Yaklaşık 1 hafta süreyle hiç bozulmayan bu izolasyon, daha sonraki dönemde 2 farklı yöntemle yavaş yavaş azaltılmıştır. Çizelge 4.46'da açıklanan bu 2 yöntemin uygulanabilirliği gözleme dayalı olarak incelenmiştir.

Çizelge 4.46. Köklendirilmiş kiraz bitkilerinin aklimatizasyonunda kullanılan havalandırma yöntemleri

I. Yöntem:

- İlk 1 hafta havalandırma yok.
- 8. günden itibaren günde 2 defa izolasyon kabını kaldırarak havalandırma. İlk gün 2 dk, sonraki her gün 1 dk artırarak.
- 20. günden itibaren günde 2 defa her gün 5 dk artırarak havalandırma.
- 30. günde izolasyon kabını tamamen kaldırılması.

II. Yöntem:

- İlk 1 hafta havalandırma yok.
- 8. günden itibaren izolasyon kabında her gün 2 mm çaplı bir havalandırma deliği açılması.
- 20. günden itibaren her gün 4 mm çaplı daha büyük havalandırma deliği açılması.
- 30. günde izolasyon kabını tamamen kaldırılmasa.

Bu iki yöntemde de kiraz bitkilerinin sağlıklı bir şekilde gelişmesi büyük oranda sağlanmıştır. Aklimatizasyon için her iki havalandırma rejimi kullanılabilir olmakla birlikte 2. yöntemde daha dengeli bir alıştırma aşamasının söz konusu olduğu ve bitkilerin strese girmeden daha düzenli bir gelişme gösterdiği söylenebilir.

4.5.5. Aklimatizasyon Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi ve Tartışma

Adventif ve aksillar sürgün oluşumu ile çoğaltılan mikro sürgünler köklendirilmiş, dikim ortamlarına aktarılmış ve köklü bitkiler haline getirilmiştir. Ancak, *in vitro* veya *ex vitro* köklendirilen mikroçoğaltılmış bitkilerin dış ortama aktarılmadan önce pişkinleştirilmeleri (aklimatize edilmeleri) gerekmektedir. Aksi halde, büyük oranda bitki ölümleri söz konusu olabilmektedir. *Ex vitro* koşullara aktarım sırasında fazla miktarda bitki kaybından dolayı mikroçoğaltım başarısının sınırlı kaldığı bildirilmektedir (Özkaynak ve Samancı 2005). Meyve türlerinin dış koşullara alıştirılması, otsu bitkilerle karşılaştırıldığında oldukça zordur. Bu aşamada ortamın nem, sıcaklık ve ışık durumu, gübreleme ve hastalıkların kontrolü gibi konular önem kazanmaktadır (Ertürk 2000). Özkaynak ve Samancı (2005), mikroçoğaltım çalışmalarının alıştırma safhasında başarıyı artırmak için, bitkiler henüz *in vitro* aşamada iken; ortama CO₂ ilavesi, havalandırılmalı kültür kabı kullanımı, şekeriz besi ortamı kullanımı, ışık şiddetinin artırılması, soğutma gibi uygulamalar yanında, *ex vitro* aşamada; ortam şartlarının bilgisayarlı sistemlerle kontrolü, koruyucu maddelerin kullanılması, farklı ışık ve CO₂ yoğunlukları gibi uygulamaların kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Aklimatizasyon aşamasındaki başarı, *ex vitro* şartlara aktarılan bitkilerin yaşama oranları ile ifade edilmiştir. Bu konuda yapılan araştırmalarda; vişnede %85-100 (Borkowska 1985; Cerović ve Ružić 1987; Petrevica ve Bite 2003), kirazda %20-40 (Bhagwat ve Lane 2004) ve şeftali anacında %84 (Fotopoulos ve Sotiropoulos 2005) oranında başarı elde edilmiştir.

4.5.5.1. Dikim Ortamı

Kiraz bitkilerinin dikimi için uygun dikim ortamını belirlemek üzere yaptığımız çalışmada; torf, torf-perlit karışımı (2:1 h/h) ve torf-vermikulit karışımı (2:1 h/h) kullanılmış, torf-perlit karışımı en yüksek (%59 ± 10) yaşama oranını sağlamıştır (Çizelge 4.43).

Özzambak ve Hepaksoy (1997b) tarafından yürütülen, Heimanns Rubinweichsel vişne çeşidine ait köklendirilmiş sürgünlerin aklimatizasyonu ile ilgili çalışmada; perlit %82, ponza %79, cüruf %77, torf %70 ve toprak-kum-gübre karışımı %40 yaşama oranı sağlamıştır, inorganik ortamlardaki başarı, su tutma ve havalanma kapasitelerinin yüksek olmasına bağlanmıştır. Fidancı ve ark. (2008), üç kiraz anacının köklü

bitkilerinin adaptasyonlarını 1:1 torf-perlit karışımına dikerek başarı ile sağlamışlardır. Hepaksoy ve Tanrısever (2004), Gisela-5 ve Gisela-6 kiraz anaçlarının dış ortama aktarılması sırasında torf, perlit, curuf ve harç kullanmış ve en iyi ortamın torf olduğunu belirtmişlerdir. Pérez-Tornero ve Burgos (2000) tarafından, Helena, Lorna, Búlida, Canino ve Currot kayısı çeşitlerinin *in vitro* çoğaltım protokolünü geliştirmek üzere yürütülen çalışmada, aklimatizasyon aşamasında, 1:1 (h/h) oranında turba ve perlit kullanarak Helena çeşidinde %71, Lorna çeşidinde %82 oranında yaşama oranı elde edilmiştir. Kamali ve ark. (2001), GF-677 anacını *ex vitro* şartlara çıkarırken kullandıkları ortamlardan “Jiffy-7” torf tabletlerini, torf-kum karışımına oranla daha başarılı bulmuşlardır. Yıldırım (2006), Hacıhaliloğlu kayısı çeşidinin aklimatizasyonu için torfun uygun olduğunu ancak pastörize edilerek kullanılması gerektiğini belirtmiştir.

4.5.5.2. Köklendirme Şartları

Köklendirme ortamında kullanılan oksinlerin, kiraz bitkilerinin aklimatizasyonuna etkisi incelenmiştir (Çizelge 4.44). Deneyde, en yüksek yaşama oranları (%85 ± 7; %60 ± 13) sırasıyla 0.5 ve 1.0 mg^l⁻¹ IBA içeren MS besi ortamında köklendirilen bitkilerden elde edilmiştir. NAA ile yapılan köklendirmelerde nazik ve kırılğan bir kök yapısı oluştuğu için bitkinin dikim ortamına aktarılması sırasında köklerin zarar görmesi söz konusu olmuş ve yaşama oranları (%27 ± 12; %24 ± 10) oldukça düşük seviyede kalmıştır.

Bouzari ve ark. (2009), PHL-A kiraz anacının aklimatizasyonunda, bitkilerin iyi köklenmiş olmasının yaşama oranını yükselttiğini bildirmiştir. Rogalski ve ark. (2003b), dört farklı *Prunus* anacının *in vitro* kültürlerinin aklimatizasyonu üzerine bir çalışma yürütmüş, “Plantmax” isimli hazır ticari ortama dikilen bitkilerde kullanılan IBA konsantrasyonları, genotipler ve her ikisi arasındaki interaksyonu istatistiki olarak önemli bulmuşlardır. Dört genotipin genel ortalaması dikkate alındığında en yüksek yaşama oranları, IBA’nın 0.5 mg^l⁻¹ (%66) ve 0.1 mg^l⁻¹ (%65) dozlarında köklendirilen bitkilerden elde edilmiştir. Bununla beraber, genotipler tek tek ele alındığında en iyi yaşama oranı (%92) 1 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamdaki bitkilerden alınmıştır. IBA’nın konsantrasyonunun 2 mg^l⁻¹’ye çıkarılması, bütün genotiplerde yaşama oranını azaltmış ve sürgünlerin taban kısımlarındaki kallus oluşumu yaşama oranını olumsuz etkilemiştir. Sülüoğlu ve Çelik

(2007), sarı ve kara idris (*Prunus mahaleb L.*) anaçlarında köklendirme ve aklimatizasyon çalışmaları yapmışlardır. Kara idris anacında, 0.1 mg^l⁻¹ (%86) ve 0.5 mg^l⁻¹ (%83) IBA ile köklendirilen bitkiler; sarı idris anacında ise, 1.0 mg^l⁻¹ IBA'lı ortamda köklendirilenler (%83) en yüksek yaşama oranını vermiştir. Muna ve ark. (1999), Maxma-14 kiraz anacında, sıvı ortamda köklendirilen bitkilerin aklimatizasyonunun, katı ortamdakilerden daha başarılı olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada yaptığımız diğer bir deneyde, besi ortamı içerisinde 4 ± 1 °C'de 3 hafta bırakılan kiraz bitkilerinin dikim ortamına aktarılmasında %100 başarı sağlanmıştır (Çizelge 4.45). Soğukta muhafazanın aklimatizasyon aşamasındaki etkisi üzerine *Prunus* türleri ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak sürgün çoğaltımı ve köklendirme aşamalarıyla ilgili olarak; Petrevica ve Bite (2003), beş vişne çeşidinde sürgün çoğaltım oranına, uzunluk ve köklenmeye, kısa süreli soğukta bırakmanın (6 hafta, +4°C) etkisini değerlendirmiş ve soğukta muhafaza edilen kültürlerin yaşama oranı ve sürgün uzunluğu diğerlerine göre daha yüksek bulunmuştur.

4.5.5.3. Nem Kontrolü

Köklendirilmiş kiraz bitkilerinin aklimatizasyonunda iki farklı havalandırma protokolü kullanılmış, her iki yöntem başarılı olmuş, ancak izolasyon kabında delik açarak yapılan yöntemde bitkilerin daha iyi geliştiği görülmüştür. *In vitro* koşullarda elde edilen bitkilerin *ex vitro* şartlara alıştırılması safhasında bitki kayıplarının en önemli sebeplerinden biri yapraklardan su kaybı sonucu görülen kurumalardır (Özkaynak ve Samancı 2005).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Yüzey Sterilizasyon Çalışmaları

Çalışmada öncelikle, kültür başlatmak için kullanılan lateral tomurcuk ve tohum materyallerinin yüzey sterilizasyon yöntemleri optimize edilmiştir. Kiraz tomurcuklarının içerisinde bulunduğu vejetasyon dönemine ve eksplant hazırlama yöntemine bağlı olarak, yüzey sterilizasyonunun başarısının büyük ölçüde etkilendiği görülmüştür. Tomurcuk pulları ve odun dokusu ile birlikte kültüre alınan tomurcukların, ilkbaharda sürgünlerin oluşmasından kışın dinlenmeye girdiği döneme kadar giderek artan bir bulaşma riski taşıdığı belirlenmiştir. Tomurcuk pullarından ve odun dokusundan arındırılarak hazırlanan eksplantlarda ise, bulaşma sorunları görülmemiş ve tomurcuklar oldukça iyi gelişme göstermiştir. Sterilizasyon solüsyonunun konsantrasyonları ve uygulama süreleri üzerinde yapılan deneylerde, kiraz tomurcukları için, %15 NaOCl ile 25 dk çalkalayarak yapılan yüzey sterilizasyonunun en başarılı uygulama olduğu tespit edilmiştir.

Yüzey sterilizasyonu çalışmaları sonunda, lateral tomurcuklar için; sırasıyla, akan çeşme suyunda 30 dk bırakma, saf suda 30 dk bekletme, %70'lik alkol ile 30 sn muamele, 100 ml'ye 2 damla Tween 20 eklenmiş %15'lik NaOCl'de 25 dk çalkalama, steril saf suda 5 defa 5'er dakika durulama, steril saf suda en az 1 s süreyle 150 rpm devirde çalkalayıcıya bırakma uygulamalarından oluşan sterilizasyon protokolünün uygun olduğu belirlenmiştir.

Kiraz tohumlarında ise; %70'lik alkolde 60 sn bırakma, 100 ml'ye 2 damla Tween 20 eklenmiş %15'lik NaOCl'de 20 dk çalkalama, steril saf suda 5 defa 5'er dakika durulama, steril saf suda en az 1 s süreyle 150 rpm devirde çalkalayıcıya bırakma uygulamaları ile, yüzey sterilizasyonu başarıyla tamamlanmıştır.

5.2. Kültür Başlatma Çalışmaları

Kirazda yapılan *in vitro* çalışmalarda, kültür başlatma materyali olarak çok farklı organlar kullanılmakta ve takip edilen amaca göre bu başlangıç materyallerinden biri tercih edilmektedir. Yürütmüş olduğumuz bu çalışmada, kültür başlatma materyali olarak lateral tomurcuklar kullanılmış ve kısa sürede çok sayıda temiz eksplant elde

edilebilmiştir. Apikal tomurcuklar deneylere dahil edilmemiş, ancak kültür başlatmadaki performansının lateral tomurcuklara benzer olduğu gözlenmiştir.

Eksplant hazırlanırken, tomurcuk pullarının mümkün olduğu kadar temizlenerek, büyüme konisi ve bazal kısmından oluşan 3-4 mm uzunluğundaki eksplantların kullanılması ile başarılı bir şekilde kültür başlatılmıştır.

Tomurcukların alındığı döneme göre kültür başlatma performansının büyük farklılık gösterdiği ve vejetasyon dönemindeki tomurcuklarda yeterli başarı sağlanamazken dormant haldeki tomurcukların yüksek oranda rozet sürgün oluşturduğu tespit edilmiştir. Ocak ayında yapılan kültürde, alt kültüre alınabilir eksplant oranı 93 ± 4 'e ulaşmış ve rozet sürgün oranı %100 olarak belirlenmiştir. Buna göre; kültür başlatmak için dinlenme dönemindeki tomurcukların tercih edilmesi gerektiği ve en uygun dönemin Ocak-Mart ayları arası olduğu belirlenmiştir.

Kullanılan tomurcukların ağaçtaki pozisyonunun etkisi de incelenmiş, kiraz ağaçlarının 3 farklı kısmından alınan tomurcuklar arasında kültür başlatmada bir farklılık görülmemiştir.

Kültür başlatma deneylerinde MS besi ortamından yararlanılmış, jel yapıcı olarak 6.4 g l^{-1} oranında agar kullanılmış ve pH 5.8'e ayarlanmıştır. Deneylerde besi ortamı ile ilgili bir sorunla karşılaşılmamış ve kültüre alınan eksplantların sağlıklı ve kuvvetli bir gelişme gösterdiği izlenmiştir.

Besi ortamına ilave edilen büyüme düzenleyicilerin kültür başlatmaya etkisini belirlemek üzere yapılan çok sayıda deney sonunda; besi ortamına kinetin ilavesinin hiçbir başarı göstermediği; TDZ'nin kısmen olumlu etki yaptığı ancak kültür süresinin sonuna doğru eksplantların canlılığını kaybetmesine neden olduğu; BAP'ın en başarılı sitokinin olduğu; BAP'a ilaveten GA_3 kullanılmasının sonuçlarda olumlu bir değişiklik yapmadığı; NAA içeren ortamlarda eksplant tabanında aşırı kallus oluşumu görüldüğü; besi ortamına ilave edilen 2 mg l^{-1} BAP + 0.5 mg l^{-1} IAA veya 2 mg l^{-1} BAP ile başarılı bir kültür başlatma sağlandığı tespit edilmiştir. Bu büyüme düzenleyicilerde, alt kültüre alınabilir eksplant oranı sırasıyla 97 ± 2 ve 95 ± 2 ; rozet sürgün oranı sırasıyla 98 ± 2 ve 93 ± 3 ; yaprak sayısı ise sırasıyla 5.5 ± 0.3 adet ve 4.4 ± 0.3 adet olarak gerçekleşmiştir.

Karbon kaynağı olarak besi ortamlarına ilave edilen şekerler üzerine yapılan deneylerde; laktoz olumlu etki yapmamış; glikoz, fruktoz, sukroz ve bunların kombinasyonlarından oluşan karışımlar birbirine benzer sonuçlar vermiş ve başarılı bulunmuştur. Kullanımı en yaygın olan sukrozun 30 mg l^{-1} konsantrasyonunun, kiraz lateral tomurcuklarından kültür başlatmak için uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Ayrıca köklendirme ve mikro aşı araştırmalarında model olarak kullanılmak üzere, tohumdan kültür başlatma çalışmaları yapılmıştır. Normal, yarım kotiledonlu embriyonik uç ve embriyonik uç halinde ekilen tohumlardan, “yarım kotiledonlu embriyonik uç” uygulaması en başarılı sonucu vermiş, çimlenme oranı $\%75 \pm 7$, kök uzunluğu $44.0 \pm 4.4 \text{ mm}$, sürgün uzunluğu $9.2 \pm 1.1 \text{ mm}$ ve yaprak sayısı ise 2.9 ± 0.2 adet olarak belirlenmiştir. Buna göre kiraz tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesinde besi ortamına büyüme düzenleyici ilave edilmesine gerek olmadığı sonucuna varılmıştır. Kültüre alınan tohumların karanlıkta bırakılmasının önemli bir farklılık oluşturmadığı görülmüş, ancak 3 veya 7 günlük karanlıkta bekletme uygulamasının yararlı olacağı kanaatine varılmıştır.

5.3. Sürgün Çoğaltma Çalışmaları

Tomurcuklardan elde edilen rozet sürgünlerin kültüre alınmasıyla, adventif veya aksillar sürgünlerin oluşmasını sağlamak üzere yapılan deneylerde, farklı besi ortamları ve büyüme düzenleyiciler üzerinde durulmuştur.

Kirazın *in vitro* kültürlerinde sürgün çoğaltımı için uygun besi ortamını belirlemek üzere MS, QL, WPM ve SH besi ortamları denenmiş; MS besi ortamının en başarılı besi ortamı olduğu; SH besi ortamındaki kültürlerde olgun yapraklar üzerinde büyük nekrozlar meydana geldiği; WPM besi ortamının sayısal olarak az ama daha canlı ve sağlıklı sürgünler verdiği belirlenmiştir.

Besi ortamına ilave edilen sitokininler, kültür başlatma aşamasında alınan sonuçlara benzer sonuçlar vermiş; kinetin içeren ortamlardaki eksplantların kısa sürede canlılığını kaybettiği; TDZ'nin, eksplant canlılığını olumsuz etkilediği, büyük yapraklar meydana getirdiği ancak yeni sürgün oluşumu sağlamadığı; sürgün çoğaltımı için etkili sitokininin BAP olduğu tespit edilmiştir. GA_3 'ün BAP ile birlikte kullanılması olumlu etki yapmış ve 2.0 mg l^{-1} BAP + $0.3/0.5 \text{ mg l}^{-1}$ GA_3 ve 4.0 mg l^{-1} BAP + 1.0 mg l^{-1} GA_3 kombinasyonları kiraz sürgünlerinin çoğaltımında en başarılı büyüme

düzenleyicileri olarak belirlenmiştir. Bunlardan 2.0 mg l^{-1} BAP + 0.3 mg l^{-1} GA₃ kombinasyonunda, alt kültüre alınabilir eksplant oranı $\%96 \pm 4$, sürgün sayısı 1.7 ± 0.4 adet, ana sürgün uzunluğu 12.0 ± 0.5 mm, yan sürgün uzunluğu 5.0 ± 0.3 mm olarak belirlenmiştir. Ayrıca, besi ortamının Floroglukinol ile desteklenmesinin, sürgün çoğaltımına herhangi bir etkisi görülmemiştir.

Kiraz tohumları ile başlatılmış kültürlerde, besi ortamındaki BAP konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısının da arttığı görülmüş, en yüksek sürgün sayısı 4.0 mg l^{-1} (5.4 ± 0.7 adet) BAP ilaveli besi ortamlarında elde edilmiştir. Tohum kaynaklı kültürler ile tomurcuktan başlatılanlar arasında sürgün çoğaltımı bakımından görülen önemli farklılık, bu iki kaynaktan gelen sürgünlerin rejenerasyon kabiliyetlerinin farklı olduğunu göstermiştir.

5.4. Köklendirme Çalışmaları

Kiraz sürgünlerinin köklendirilmesi üzerine yapılan çalışmalar, tomurcuklardan geliştirilmiş kültürlerde köklenmeye alınacak yeterli sayı ve büyüklükte sürgün sağlanamadığı için, tohum kaynaklı sürgünlerle yürütülmüştür.

Köklenme oranı, kök sayısı ve kök uzunluğu bakımından, NAA içeren besi ortamında iyi sonuçlar alınmış ancak elde edilen kökler kallus dokusu üzerinde oluşmuş, oldukça kırılgan ve hassas bir yapı göstermiştir. Bu yapı nedeniyle dikim ortamına aktarılırken kökler büyük oranda zarar görmüştür. IBA içeren ortamlarda ise; kallus oluşumunun çok az ve elde edilen köklerin daha sağlıklı olduğu gözlemlenmiştir. Köklenme oranı $\%85 \pm 8$, kök sayısı 8.2 ± 1.3 adet ve kök uzunluğu 30.6 ± 1.3 mm olarak belirlenen IBA'nın 1 mg l^{-1} konsantrasyonu, kiraz sürgünlerinin *in vitro* köklendirilmesi için en uygun oksin uygulaması olarak belirlenmiştir.

Köklendirme çalışmalarında 3 haftalık kültür sonunda, kökler oldukça fazla uzadığından, dikim ortamına aktarılırken sorun teşkil etmiştir. Bu nedenle köklendirme süresinin 2 hafta ile sınırlandırılması ile daha kısa yapılı kökler elde edilerek, dikimin daha sağlıklı yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca, kiraz sürgünlerinin köklendirilmesi üzerine 1 hafta karanlıkta bırakma uygulamasının olumlu bir etki yapmadığı görülmüştür.

5.4. Dış Ortama Alıştırma (Aklimatizasyon) Çalışmaları

Köklü kiraz bitkilerinin dikimi için torf, torf-perlit karışımı (2:1 h/h) ve torf-vermikulit karışımı (2:1 h/h) kullanılmış, torf-perlit karışımı 59.3 ± 9.6 yaşama oranını sağlayarak en başarılı dikim ortamı olarak belirlenmiştir.

Köklendirme ortamında kullanılan oksinlerin, kiraz bitkilerinin aklimatizasyonuna etkisi olduğu tespit edilmiş, en yüksek yaşama oranları (85 ± 7 ; 60 ± 13) sırasıyla 0.5 ve 1.0 mg l^{-1} IBA içeren besi ortamında köklendirilen bitkilerden elde edilmiştir. NAA'nın 0.5 ve 1.0 mg l^{-1} konsantrasyonları ile yapılan köklendirmelerde, yaşama oranları oldukça düşük seviyede (sırasıyla; 27 ± 12 ; 24 ± 10) kalmıştır.

Aklimatizasyon öncesinde yapılan soğuk uygulamasının bitkilerin yaşama oranı üzerinde olumlu etkisi görülmüştür. Köklenmiş kiraz bitkilerinin besi ortamı içerisinde 4 ± 1 °C'de 3 hafta bırakıldıktan sonra dikim ortamına aktarılmasıyla %100 yaşama oranı elde edilmiştir.

Köklendirilmiş kiraz bitkilerinin aklimatizasyonunda iki farklı havalandırma protokolü kullanılmış, her iki yöntem başarılı olmuş, ancak izolasyon kabında delik açarak yapılan yöntemde bitkilerin daha iyi geliştiği gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda, aklimatizasyon aşamasında başarıyı etkilediği gözlemlenen diğer bazı faktörler arasında; bitkilerin sağlıklı ve fazla uzamamış köklere sahip olması, kültürden çıkarıldıktan sonra bitki üzerindeki besi ortamı kalıntılarının iyi bir yıkama ile tamamen temizlenmesi, dikim ortamının steril olması, dikim ortamı üzerinde fungus gelişimine izin verilmemesi, iyi bir nem kontrolü yaparak bitkilerin düşük nem şartlarına yavaş yavaş alıştırılması, *in vitro* aşamalara göre daha yüksek ışık yoğunluğu sağlanarak fotosentez kapasitesinin artırılması gibi hususlar sayılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmad, T., Hafeez-Ur R., Ahmed C. M. S., 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., Sedgley M. 2000. Adventitious Shoot Regeneration from Leaf Explants of Almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology. – Plant*, 36: 470-474.
- Ainsley, P. J., Hammerschlag F. A., Bertozzi T., Collins G. G., Sedgley M. 2001. Regeneration of Almond from Immature Seed Cotyledons. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 221-226.
- Aka-Kaçar, Y., Yılmaz N., Yalçın-Mendi Y., Küden A., Çetiner S. 2001. *In vitro* Besi Ortamında Kullanılan Değişik Katılaştırıcıları Maddelerinin ve Farklı pH Düzeylerinin Bazı Kiraz (*Prunus avium* L.) Anaçlarının Çoğaltılması Üzerine Etkileri. I. Sert Çekirdekli Meyveler Sempozyumu, 25-28 Eylül 2001, 161-166, Yalova.
- Alderson, P. G., Harbour M. A., Patience P. A. 1987. Micropropagation of *Prunus tenella* cv. Firehill. *Acta Horticulturae*, 212: 463-468.
- Almehdi, A. A., Parfitt D. E. 1986. *In vitro* Propagation of Peach: I. Propagation of “Lovell” and “Nemaguard” Peach Rootstocks. *Fruit Varieties Journal*, 40(1): 12-17.
- Ambrozic Turk, B., Smole J., Šiftar, A. 1992. Micropropagation of a Plum Ecotype (*Prunus domestica* L.) as Rootstock for Apricot. *Acta Horticulturae*, 300: 111-114.
- Andreu, P., Marin J. A. 2005. *In vitro* Culture Establishment and multiplication of the *Prunus* Rootstock “Adesoto 101” (*P. insititia* L.) as Affected by Type of Propagation of the Donor Plant and by the Culture Medium Composition. *Scientia Horticulturae*, 106: 258-267.
- Anonim, 2005. Kiraz-Vişne Yetiştiriciliği. Hasad Yayıncılık, Bakanlar Matbaası, İstanbul, 125 s.
- Antonopoulou, V., Dimassi K., Therios I., Chatzissavvidis C., Tsirakoglou V. 2005. Inhibitory Effect of Riboflavin (Vitamin-B₂) on the *in vitro* Rooting and Nutrient Concentration of Explant of Peach Rootstocks GF 677 (*Prunus amygdalus* x *P. persica*). *Scientia Horticulturae*, 106: 268-272.

- Arıcı, Ş. E. 2008. Bazı Sert Çekirdekli Meyve Anaçlarının Doku Kültürü ile Çoğaltılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(1): 19-23.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar M., Akbudak M. A. 2002. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. (Edt.) M. Babaoğlu, E.Gürel, S. Özcan. Bitki Biyoteknolojisi I – Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 374 s.
- Balla, I., Brozik S. 1996. Embryo Culture of Sweet Cherry Hybrids. *Acta Horticulturae*, 410: 385-386.
- Bhagwat, B., Lane, W. D. 2004. *In vitro* Shoot Regeneration from Leaves of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) “Lapins” and “Sweetheart”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78 (2): 173-181.
- Borkowska, B. 1985. Micropropagation of Sour Cherry Cultivar “Schattenmorelle”. *Acta Horticulturae*, 169: 329-333.
- Bouzari, N., Mahdavian M., Abdollahi H. 2009. Micropropagation of a Dwarfing Cherry Rootstock. <http://www.belsad.by/conference2/files/1/1.pdf> (06.09.2009)
- Bozena, B., Szczerba J. 1991. Influence of Different Carbon Sources on Invertase Activity and Growth of Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) Shoot Cultures. *Journal of Experimental Botany*, 42 (7): 911-915.
- Buzkan N., Çetiner S., Yalçın-Mendi Y., Di Terlizzi B. 1997. Clonal Propagation of Disease-Free Rootstocks for Sour and Sweet Cherry by Meristem Culture. *Acta Horticulturae*, 441: 329-331.
- Büyükdemirci, H. 2008. The Effects of Medium Ingredients on Shoot Propagation and Rooting of Cherry Rootstocks *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 795: 419-422.
- Canlı F. A., Karakurt Y., Yılmaz Ö. 2008. Sert Çekirdekli Meyve Türlerinde Gen Transferi Alanındaki Gelişmeler ve Eğilimler. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 1: 30-38.
- Canlı, F. A., Tian L. 2008. *In vitro* Shoot Regeneration from Stored Mature Cotyledons of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars. *Scientia Horticulturae*, 116: 34-40.
- Cerovic, R., Ruzic D. 1987. Micropropagation of Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) cv. “Sumadinka”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 9: 151-157.

- Channuntapipat, C., Sedgley M., Collins G. 2003. Micropropagation of Almond Cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the Hybrid Rootstock Titan x Nemaguard. *Scientia Horticulturae*, 98: 473-484.
- Chee, R., Pool R. M. 1987. Improved Inorganic Media Constituents for *in vitro* Shoot Multiplication of Vitis. *Scientia Horticulturae*, 32: 85-95
- Cheong, E. J., Pooler M. R. 2004. Factors Affecting Somatic Embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. *Plant Cell Reports*, 22: 810-815.
- Çelik, T. 2008. Klonal Anaç Genotiplerinin *in vitro* Koşullarda Bazı *Prunus* Türleriyle Aşı Tutma Oranlarının Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana, 36s.
- Demiral, S., Ülger S. 2008. Gisela-5 Kiraz Anacımın Doku Kültürü ile Çoğaltılması Üzerine Bir Araştırma. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(1): 117-121.
- Demirkök, Ş. G. 2006. GF-677, Ak-1 ve Ak-2 Badem x Şeftali Melez Anaçlarının Sürgün Ucu Yöntemiyle *in vitro* Klonal Mikroçoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana, 41s.
- Deogratias, J. M., Castellani V., Juarez J., Arregui J. M., Ortega C., Ortega V., Llacer G., Navarro L., Dosba F. 1991. Study of Growth Parameters on Apricot Shoot Tip Grafting *in vitro* (STG). *Acta Horticulturae*, 293: 363-371.
- Dradi, G., Vito G., Standardi A. 1996. *In vitro* Mass Propagation of Eleven *Prunus mahaleb* Ecotypes. *Acta Horticulturae*, 410: 477-483.
- Driver, J. A., Kuniyuki A. H. 1984. *In vitro* Propagation of Paradox Walnut Rootstock. *HortScience*, 19(4): 507-509.
- Druart, P. H. 1991. Potentialities of the *in vitro* Culture to Improve Plum-Tree Breeding. *Acta Horticulturae*, 283: 199-206.
- Đurkovič, J. 2006. Rapid Mikropropagation of Mature Wild Cherry. *Biologia Plantarum*, 50 (4): 733-736.
- Erbenová, M., Paprstein, F., Sedlák, J. 2001. *In vitro* Propagation of Dwarfed Rootstocks for Sweet Cherry. *Acta Horticulturae*, 560: 477-480.
- Eriş, A., Barut E. 2000. Ilıman İklim Meyveleri-I. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı No: 6, Bursa, 226 s.

- Errea, P., Garay L., Marin J.A. 2001. Early Detection of Graft Incompatibility in Apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiologia Plantarum*, 112: 135-141.
- Ertürk, Ü. 2000. Sert Kabuklu Meyve Türlerinin Doku Kültürü ile Üretim Olanakları. 2. Ulusal Fidancılık Sempozyumu, 25-29 Eylül 2000, Ödemiş-Bademli.
- Espinosa, C., Pijut P. M., Michler C. H. 2006. Adventitious Shoot Regeneration and Rooting of *Prunus serotina* *in vitro* Cultures. *HortScience* 41(1): 193-201.
- FAO, 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations Production Statistics, <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>, (17.06.2009).
- Fidancı, A., Burak M., Erenoğlu B. 2001. Bazı Klonal Kiraz ve Vişne Anaçlarının *in vitro*'da Hızlı Çoğaltım Tekniklerinin Belirlenmesi (I. Aşama). I. Sert Çekirdekli Meyveler Sempozyumu, 25-28 Eylül, 181-186, Yalova.
- Fidancı, A., Burak M., Erenoğlu B., Akçay M. E. 2008. Determination of *in vitro* Propagation Techniques of Some Clonal Sweet and Sour Cherry Rootstocks. *Acta Horticulturae*, 795: 409-412.
- Fotopoulos, S., Sotiropoulos T. E. 2004. *In vitro* Propagation of the Peach Rootstock: The Effect of Different Carbon Sources and Types of Sealing Material on Rooting. *Biologia Plantarum*, 48(4): 629-631.
- Fotopoulos, S., Sotiropoulos T. E. 2005. *In vitro* Propagation of the PR 204/84 (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) Rootstock: Axillary Shoot Production and Rhizogenesis. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 33: 75-79.
- Franck, T., Kevers C., Gaspar T., Dommes J., Deby C., Greimers R., Serteyn D., Deby-Dupont G. 2004. Hyperhydricity of *Prunus avium* Shoots Cultured on Gelrite: a Controlled Stress Response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 519-527
- Gamborg, O. L., Miller R. A., Ojima K. 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Experimental Cell Research*, 50(1): 151-158.
- Gebhart, K. 1985. Self-Rooted Sour Cherries *in vitro*: Auxin Effects on Rooting and Isoperoxidaes. *Acta Horticulturae*, 169: 341-346.
- Gentile, A., Monticelli S., Damiano C. 2002. Adventitious Shoot Regeneration in Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Plant Cell Reports*, 20: 1011-1016.

- Gonzalez-Padilla, I. M., Webb K., Scorza R. 2003. Early Antibiotic Selection and Efficient Rooting and Acclimatization Improve the Production of Transgenic Plum Plants (*Prunus domestica* L.). *Plant Cell Reports*, 22: 38-45
- Grant, N. J., Hammatt N. 1999. Increased Root and Shoot Production During Micropropagation of Cherry and Apple Rootstocks: Effect of Subculture Frequency. *Tree Physiology*, 19: 899-903.
- Grant, N. J., Hammatt N. 2000. Adventitious Shoot Development from Wild Cherry (*Prunus avium* L.) Leaves. *New Forest*, 20: 287-295.
- Gülcan, R., Güteryüz M., Polat İ., Ünal A., Pırlak L., Erişken A., Aslantaş R., Karaduva L., Demirsoy H. 1995. Yumuşak ve Sert Çekirdekli Meyveler Tüketim Projeksiyonları ve Üretim Hedefleri. Türkiye Ziraat Mühendisliği 4. Teknik Kongresi, 9-13 Ocak 1995, (2) 629-653, Ankara.
- Günel, F. 2006. Gisela-5 (*P. cerasus* x *P. canescens*) ve Maxma-14 (*P. mahaleb*) Anaçlarından *in vitro*'da Sürgün Elde Edilmesi Üzerine Değişik BAP ve 2,4- D Düzeylerinin Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Isparta, 67s.
- Gürel, S., Gülşen Y. 1998. The Effects of IBA and BAP on *in vitro* Shoot Production of Almond (*Amygdalus communis* L.). *Turkish Journal of Botany*, 22: 375-379.
- Hammatt, N., Grant N. J. 1993. Apparent Rejuvenation of Mature Wild Cherry (*Prunus avium* L.) During Micropropagation. *Journal of Plant Physiology*, 141: 341-346.
- Hammatt, N., Grant N. J. 1997. Micropropagation of Mature British Wild Cherry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 103-110.
- Hammat, N., Grant N. J. 1998. Shoot Regeneration from Leaves of *Prunus seotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry). *Plant Cell Reports*, 17: 526-530.
- Hammerschlag, F. A., Bauchan G. R., Scorza R. 1987. Factors Influencing *in vitro* Multiplication and Rooting of Peach Cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8: 235-242.
- Harada, H., Murai Y. 1996. Micropropagation of *Prunus mume*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(3): 265-267.
- Hatipoğlu, R. 2002. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190, Adana, 176 s.

- Hepaksoy, S. 2004. Bazı Kiraz Anaçlarının Mikroçoğaltımı Üzerinde Araştırmalar I. Gelişme ve Çoğalma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41(3): 11-22
- Hepaksoy, S., Tanrıseven A. 2004. Bazı Kiraz Anaçlarının Mikroçoğaltımı Üzerinde Araştırmalar II. Köklenme ve Dış Koşullara Alıştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41(3): 23-34.
- Hokanson, K. E., Pooler M. R. 2000. Regeneration of Ornamental Cherry (*Prunus*) Taxa from Mature Stored Seed. *HortScience*, 35: 745-748.
- Huetteman, A., Preece E. J. 1993. Thidiazuron: a Potent Cytokinin for Woody Plant Tissue Culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 105-119.
- Kamali, K., Majidi E., Zarghami R. 2001. Micropropagation of GF-677 Rootstocks (*Prunus amygdalus* x *P. persica*). 11 GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds, CIHEAM-IAMZ, 56: 175-177.
- Katano, M. 1987. Propagation of Japanese Cherry (*Prunus jamasakura* SIEB. ex KOIDZ.) by Shoot-tip Culture. *Proc. Fac. Agric. Kyushu Tokai Univ.*, 6: 1-4.
- Kitin, P., Iliev I., Scaltsoyiannes A., Nellas C., Rubos A., Funada R. A. 2005. Comparative Histological Study Between Normal and Fasciated Shoots of *Prunus avium* generated *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82: 141-150.
- Koubouris, G., Vasilakakis M. 2006. Improvement of *in vitro* Propagation of Apricot Cultivars "Bebecou". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85: 173-180.
- Kramarenko, L. A. 1999. Micropropagation of Apricot and Field Performance of *in vitro* Propagated Plants. *Acta Horticulturae*, 488: 417-420.
- Lauri, P., Caboni E., Damiano C. 2001. *In vitro* Adventitious Shoot Regeneration from Vegetative Apices of Almond and Other *Prunus* Species. *Acta Horticulturae*, 560: 403-406.
- Lloyd, G., McCown L. B. 1981. Commercially Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by the Use of Shoot-tip Culture. *Combined Proceedings of the International Plant Properties Society*, 30:421-427
- Mandegaran, Z., Roberts A. V., Hammat N. 1999. The Ability of *Prunus avium* x *P. pseudocerasus* 'Colt' to form Somatic Embryos *in vitro* Contrasts with the Recalcitrance of *P. avium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59: 57-63.

- Manganaris, G. A., Economou A. S., Boubourakas I. N., Katis N. I. 2003. Elimination of PPV and PNRSV Through Thermotherapy and Meristem-Tip Culture in Nectarine. *Plant Cell Reports*, 22: 195-200.
- Mansuroğlu, S., Gürel E. 2002. Mikroçoğaltım. (Edt.) M. Babaoğlu, E.Gürel, S. Özcan. Bitki Biyoteknolojisi I – Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 374 s.
- Marín, M. L., Marín J. A. 1998. Excised rootstock roots cultured *in vitro*. *Plant Cell Reports* 18: 350-355.
- Marino, G., Magnanini E., Battistini S., Righetti B. 1991. Effect of Hormones and Main Carbone Energy Sources on *in vitro* Propagation of Apricot (*Prunus armeniaca* L.) cvs. “San Castrese” and “Portici”. *Acta Horticulturae*, 293: 355-361.
- Marino, G., Bertazza G., Magnanini E., Altan A. D. 1993. Comparative Effects of Sorbitol and Sucrose as Main Carbon Energy Sources in Mircopropagation of Apricot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 235-244.
- Matt, A., Jehle J. A. 2005. *In vitro* Plant Regeneration from Leaves and Internode Section of Sweet Cherry Cultivars (*Prunus avium* L.). *Plant Cell, Reports*, 24: 468-476
- Miguel, C. M., Druart P., Oliveira M. M. 1996. Shoot Regeneration from Adventitious Buds Induced on Juvenile and Adult Almond (*Prunus dulcis* Mill.) Explants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 32: 148-153.
- Molassiotis, A. N., Dimassi K., Therios I., Diamantidis G. 2003. Fe-EDDHA Promotes Rooting of Rootstock GF 677 (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) Explants *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 47(1): 141-144.
- Morini, S., Loreti F., Sciutti R. 1991. Response of Some Mr. S. Plum Clones to *in vitro* Propagation. *Acta Horticulturae*, 283: 207-209.
- Muna, A. S., Ahmad A. K., Mahmoud K., Abdul-Rahman K. 1999. *In vitro* Propagation of a Semi-Dwarfing Cherry Rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59: 203-208.
- Murai, Y., Harada H., Takagi T. 1996. *In vitro* Shoot and Root Proliferation in Flowering mume Cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 65(1): 155-159.

- Murai, Y., Harada H., Yamashita H. 1997. *In vitro* Propagation of Apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 66(3-4): 475-480.
- Murashige, T., Skoog F. A. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Ning, G. G., Fan X. L., Huang W. J., Bao M. Z., Zhang J. B. 2007. Micropropagation of Six *Prunus Mume* Cultivars Through Axillary Shoot Proliferation, and ISSR Analysis of Cloned Plants. *Acta Biologica Cracoviensia (Series Botanica)* 49(1): 25-31.
- Nowak, B., Mieczynski K., Hudy L. 2004. Sugar Uptake and Utilisation During Adventitious Bud Differentiation on *in vitro* Leaf Explants of 'Wegierka Zwyczajna' Plum (*Prunus domestica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 255-260.
- Osterc, G., Luthar Z., Štampar F. 2004. The Importance of the Sterilization Procedure for Producing Vigorous Cherry Plants (*Prunus* sp.) *in vitro*. *Acta Agriculturae Slovenica*, 83(1): 45 - 51
- Özbek, S. 1978. Özel Meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 128, Ders Kitabı: 11, Adana, 486 s.
- Özçağırın, R., Ünal A., Özeke E., İsfendiyaroğlu M. 2003. Ilıman İklim Meyve Türleri (Sert Çekirdekli Meyveler) Cilt-1. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 553, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 229 s.
- Özkaynak, E., Samancı B. 2005. Mikroçoğaltımda Alıştırma. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(36): 28-36.
- Özzambak, E., Hepaksoy S. 1997. Investigations on *in vitro* Proliferation of Sour Cherry cv. "Heimanns Rubinweichsel". *Acta Horticulturae*, 447: 155-157.
- Özzambak, E., Hepaksoy S. 1997. Investigation on *in vitro* Rooting and Acclimatization of Sour Cherry cv. "Heimanns Rubinweichsel". *Acta Horticulturae*, 447: 153-154.
- Parfitt, D. E., Almehdi A. A. 1986. *In vitro* Propagation of Peach: II. A Medium for *in vitro* Multiplication of 56 Peach Cultivars. *Fruit Varieties Journal*, 40(2): 45-47.
- Pascual, L., Marin, J. A. 2005. A Liquid 2,4-D Pulse Increased Shoot and Root Regeneration from Leaf Explants of Adult *Prunus* Rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 106: 582-592.
- Pedrotti, E. L., Allemand C. J., Doumas P., Cornu D. 1994. Effect of Autoclaving Aminoacids on *in vitro* Rooting Response of Wild Cherry Shoot. *Scientia Horticulturae*, 57(1-2): 89-98.

- Pérez-Tornero, O., Burgos L., Egea J. 1999a. Introduction and Establishment of Apricot *in vitro* Through Regeneration of Shoot from Meristem Tips. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 35: 249-253.
- Pérez-Tornero, O., Burgos L., Egea J., López J.M. 1999b. Apricot Meristem Tip Culture. *Acta Horticulturae*, 488: 411-416.
- Pérez-Tornero, O., Ortin-Parraga F., Egea J., Burgos L. 1999c. Medium-Term Storage of Apricot Shoot Tips *in vitro* by Minimal Growth Method. *HortScience*, 34(7): 1277-1278.
- Pérez-Tornero, O., Burgos L. 2000. Different Media Requirements for Micropropagation of Apricot Cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 133-141.
- Pérez-Tornero, O., Egea, J., Vanoostende; A., Burgos L. 2000a. Assesment of Factors Affecting Adventitious Shoot Regeneration from *in vitro* Cultured Leaves of Apricot. *Plant Science*, 158: 61-70.
- Pérez-Tornero, O., Lopez J. M., Egea J., Burgos, L. 2000b. Effect of Basal Media and Growth Regulators on the *in vitro* Propagation of Apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. Canino. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 75(3): 283-286.
- Pérez-Tornero, O., Egea J., Olmos E., Burgos L. 2001. Control of Hyperhydricity in Micropropagated Apricot Cultivars. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 37: 250-254.
- Petrevica, L., Bite A. 2003. The Influence of Short-Term Cold Storage on the Cherry Microshoot Proliferation. *Acta Horticulturae*, 616: 327-330.
- Pevalek-Kozlina B., Jelaska S. 1987. Microclonal Propagation of *Prunus avium* L. *Acta Horticulturae*, 212: 599-602.
- Pruski, K. W., Lewis T., Astatkie T., Nowak J. 2000. Micropropagation of Chokecherry and Pincherry Cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 93-100.
- Pruski, K., Astatkie T., Nowak, J. 2005. Tissue Culture Propagation of Mongolian Cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking Cherry (*Prunus tomentosa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82: 207-211.
- Quoirin, M., Lepoivre P. 1977. Improved Medium for *in vitro* Culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae*, 78: 437-442

- Reidiboym-Talleux, L., Diemer F., Sourdioux M., Chapelain K., Grenier-De March G. 1999. Improvement of Somatic Embryogenesis in Wild Cherry (*Prunus avium*). Effect of Maltose and ABA Supplements. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55:199-209.
- Rogalski, M., Moraes L. K. A., Feslibino C., Crestani L., Guerra M. P., Silva A. L. 2003a. Enraizamento *in vitro* de Porta-Enxertos de *Prunus*. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 25(2): 293-296.
- Rogalski, M., Moraes L. K. A., Feslibino C., Crestani L., Guerra M. P., Silva A. L. 2003b. Aclimatização de Porta-Enxertos de *Prunus* sp. Micropropagados. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 25(2): 279-281.
- Rogalski, M., Guerra M. P., Silva A. L. 2003c. Multiplicação *in vitro* da Ameixeira ‘Santa Rosa’: Efeito da Citocinina BAP. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 25(2): 365-367.
- Ružić, Đ., Cerović R. 1998. Influence of Agar Brands and Concentration on *in vitro* Shoot Multiplication of the Cherry Rootstock Gisela-5. *Acta Horticulturae*, 468: 209-216.
- Ružić, Đ., Sarić M., Cerović R., Čulafić L. 2000. Relationship Between the Concentration of Macroelements, Their Uptake and Multiplication of Cherry Rootstock Gisela-5 *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 9-14.
- Ružić, Đ., Sarić M., Cerović R., Čulafić L. 2003/4. Contents of Macroelements and Growth of Cherry Rootstock *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 47(3): 463-465.
- Ružić, D. J., Lazić T. I., Cerović R. M. 2005. Micropagation of Some *Prunus* and *Pyrus* Genotypes *in vitro* as Affected by Different Carbon Sources. *Acta Horticulturae*, 795: 409-412.
- Ružić D., Vujović T. I. 2008. The Effects of Cytokinin Types and Their Concentration on *in vitro* Multiplication of Sweet Cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). *Horticultural Science (Prague)*, 35(1): 12–21
- Sauer, A. 1985. *In vitro* Propagation of *Prunus avium* L. and Storage of *in vitro* Derived Plantlets. *Acta Horticulturae*, 169: 351.
- Schenk, R. U., Hildebrandt A. C. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Culture. *Canadian Journal of Botany*, 50: 199-204.
- Schmidt, H., Ketzler A. 1996. *In vitro* Culture Techniques in Sweet Cherry Breeding. *Acta Horticulturae*, 410: 111-114.

- Scorza, R. 2001. Progress in Tree Fruit Improvement Through Molecular Genetics. *HortScience*, 36: 855-858.
- Scorza, R., Callahan A., Levy L., Damsteegt V., Webb K., Ravelonandro M. (2001). Post-transcriptional Gene Silencing in Plum Pox Virus Resistant Transgenic European Plum Containing the Plum Pox Potyvirus Coat Protein Gene. *Transgenic Res.*, 10: 201-209.
- Sedlák, J., Paprštein F. 2008. *In vitro* Shoot Proliferation of Sweet Cherry Cultivars Karešova and Rivan. *Hort. Sci. (Prague)*, 35(3): 95–98
- Sedlák, J., Paprštein F., Erbenova M. 2008. *In Vitro* Propagation of the P-HL Dwarfing Sweet Cherry Rootstocks. *Acta Horticulturae*, 795: 395-399.
- Silva, A. L., Rogalski M., Moraes L. K. A., Feslibino C., Crestani L., Guerra M. P. 2003. Estabelecimento e Multiplicação *in vitro* de Porta-Enxertos de *Prunus*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(2): 297-300.
- Silveira, C. A. P., Fachinello J. C., Fortes G. R. L., Citadin I., Rodrigues A. C., Quezada A. C., Silva J. B. 2001. Multiplicação *in vitro* de Porta-Enxertos do Gênero *Prunus* Sob Diferentes Concentrações de BAP em Dois Meios de Cultura. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 23(3): 488-492.
- Skirvin, R. M., Chu M. C., Rukan H. 1979. Tissue Culture of Peach, Sweet and Sour Cherry and Apricot Shoot Tips. Proceedings of the 124th Annual Meeting of the Illinois State Horticultural Society, 113: 30-38.
- Skoog, F., Miller C. O. 1957. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., 11:118-131.
- Sokal R. R., Rohlf F. J. 1995. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. Freeman&Company, New York, 887 p.
- Song, G. Q., Sink K. C. 2005. Optimizing Shoot Regeneration and Transient Expression Factors for *Agrobacterium tumefaciens* Transformation of Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) Cultivar Montmorency. *Scientia Horticulturae*, 106: 60-69.
- Sotiropoulos, T. E., Fotopoulos S. 2005. *In vitro* Propagation of the PR 204/84 Peach Rootstock (*Prunus persica* x *P.amygdalus*): The Effect of BAP, GA₃ and Activated Charcoal on Shoot Elongation. *European Journal of Horticultural Science*, 70(5): 253-255.
- Srinivasan, C., Isabel M.G., Scorza R. 2005. *Prunus* spp. Almond, Apricot, Cherry, Nectarine, Peach and Plum. In: Biotechnology of Fruit and Nut Crops (Biotechnology in Agriculture Series), (eds: Richard E. Litz) 512-542.

- Sülüőöglu, M., Çelik M. 2001. Kara ve Sarı İdris Anaçlarının Mikro Üretiminde Temel Besin Ortamının ve Hormonların Sürgün Proliferasyonu ve Kalitesi Üzerine Etkileri. I. Sert Çekirdekli Meyveler Sempozyumu, 25-28 Eylül 2001, 167-174, Yalova.
- Sülüőöglu, M., Çelik M. 2007. Kara ve Sarı İdris Anaçlarının Mikro Sürgünlerinin Köklendirilmesi ve Adaptasyonu Üzerinde Araştırmalar. Türkiye 5. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 04-07 Eylül 2007, Erzurum.
- Tabachnik, L., Kester D. E. 1977. Shoot Culture for Almond and Almond-Peach Hybrid Clones *in vitro*. *HortScience*, 12: 545-547.
- Takashina T., Nakano H., Kato R. 2003. Efficient Plant Regeneration Culture from Leaf Explants of *in vitro* Grown Sweet Cherry. *Acta Horticulturae*, 622:168-173.
- Tang, H., Ren Z., Krczal G. 2000. Somatic Embryogenesis and Organogenesis from Immature Embryo Cotyledons of Three Sour Cherry Cultivars (*Prunus cerasus* L.). *Scientia Horticulturae*, 83: 109-126.
- Tang, H., Ren Z., Reustle G., Krczal G. 2002. Plant Regeneration from Leaves of Sweet and Sour Cherry Cultivars. *Scientia Horticulturae*, 93: 235-244.
- Teixeira, P. T., Silva A. L., Ducroquet J. P. H. J., Guerra M. P. 2004. Multiplicação *in vitro* do Porta-Enxerto de *Prunus* spp. 'Carelli'. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 26(2): 377-379.
- Theiler-Hedtrich, C. M., Feucht W. 1985. Micropropagation of *Prunus cerasus* Rootstocks: Influence of Culture Medium Constituents on Growth in Stage I and II. *Acta Horticulturae*, 169: 335-340.
- Tricoli, D. M., Maynard C. A., Drew A. P. 1985. Tissue Culture of Propagation of Mature Trees of *Prunus serotina* Ehrh. I. Establishment, Multiplication, and Rooting *in vitro*. *Forest Science*, 31(1): 201-208.
- TÜİK, 2009. Türkiye İstatistik Kurumu. Bitkisel Üretim İstatistikleri, <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (17.06.2009).
- Vasar, V. 2003. Effect of Ascorbic Acid and Citric Acid on Ex Vitro Rooting and Acclimatization of *Prunus avium* L. Microshoot. *Acta Horticulturae*, 616: 251-254.
- Westwood, M. N., 1995. Temperate-Zone Pomology, Physiology and Culture. Third Edition, Timber Pres, Oregon, 523 pp.

- Xilogiannis, C., Xilogiannis A., Mpalas, E. 2008. Micropropagation of Two Cherry Rootstocks and Their Behaviour in the Nursery and in the Orchard. *Acta Horticulturae*, 795(1): 429-434
- Yıldırım, H. 2006. Hacıhaliloğlu Kayısı (*Prunus armeniaca L.*) Çeşidinin *in vitro* Çoğaltımı. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, 127s.
- Yıldırım, H., Tilkat E., Onay A., Ozen H. Ç. 2007. *In vitro* Embryo Culture of Apricot, *Prunus armeniaca L. cv. Hacıhaliloğlu*. *International Journal of Science & Technology*, 2(2): 99-104.
- Younas, M., Rahman H., Siddiquit S. U. 2008. Effect of Different Carbon Sources on *in vitro* Shoot Proliferation and Rooting of Peach Rootstock GF 677. *Pakistan Journal of Botany*, 40(3): 1129-1134
- Zilkah, S., Faingersh E., Rotbaum A. 1992. *In vitro* Propagation of Three MxM (*Prunus avium* x *P. mahaleb*) Cherry Rootstocks. *Acta Horticulturae*, 314: 201-208.

ÖZGEÇMİŞ

Sivas'ın Suşehri ilçesinde 1975 yılında doğdum. İlkokul ve ortaokulu aynı ilçede; liseyi Erzincan Laborant Meslek Lisesi'nde bitirdim. 1992 yılında Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü'nde laborant olarak göreve başladım. Kısa bir süre burada çalıştıktan sonra, yüksek öğrenimime devam etmek üzere Tarım Bakanlığı'na olan mecburi hizmetimi erteleterek bu görevden ayrıldım. Yine 1992 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne kayıt yaptırıldı. Lisans öğrenimimi 1997 yılında tamamladım ve Aralık 1997'de, mecburi hizmetimi yapmak üzere, Ergani İlçe Tarım Müdürlüğü'nde Ziraat Mühendisi olarak göreve başladım. Bir yıla yakın bir süre burada görev yaptıktan sonra, Eylül 1998'de Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde, Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Yüksek Lisansımı D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda "Diyarbakır Ekolojisinde Bazı Sert Çekirdekli Meyve Türlerinde Sürgün Aşı Uygulamaları Üzerine Araştırmalar" isimli tez çalışması ile 2000-2002 yılları arasında tamamladım. Evli ve bir çocuk babasıyım.