

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BAZI *PYRUS* TÜRLERİNDE MİKRO ÇELİKLERİN EX VİTRO
KÖKLENMESİ VE İN VİTRO BİTKİCİKLERİN DIŞ KOŞULLARA
ALIŞTIRILMASINDA YÜZEN SU KÜLTÜRÜ TEKNİĞİNİN KULLANIMI
ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

Salwa İBRAHİM AHMED OSMAN

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2022**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI *PYRUS* TÜRLERİNDE MİKRO ÇELİKLERİN EX VİTRO KÖKLENMESİ VE İN VİTRO BİTKİCİKLERİN DIŞ KOŞULLARA ALIŞTIRILMASINDA YÜZEN SU KÜLTÜRÜ TEKNİĞİNİN KULLANIMI ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Salwa İBRAHİM AHMED OSMAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU

Bu araştırma, AH-32 ve AH-75 ahlal tipleri (*Pyrus elaeagnifolia* Pall.) ve Old Home x Farmingdale 333 (OHxF 333) armut klon anacında (*P. communis* L.) in vitro koşullarda köklendirilmiş bitkiciklerin dış koşullara alıştırılmasında ve mikro çeliklerin ex vitro köklendirilmesinde yüzen su kültürü tekniğinin kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. İn vitro ve ex vitro köklendirme denemelerinde mikro çeliklere 250, 500, 1000 ve 2000 ppm IBA (indol bütirik asit), hızlı daldırma yöntemiyle 10 saniye süreyle uygulanmış ve kültürlerin ilk 5 gününde mikro çelikler tamamen karanlık koşullarda tutulmuştur. İn vitro köklendirme denemelerinde büyümeyi düzenleyici madde içermeyen makro ve mikro elementleri ½ kuvvetindeki MS (Murashige ve Skoog) temel besin ortamı kullanılmıştır. IBA dozlarının mikro çeliklerde köklenme oranı, köklenen mikro çeliklerde köklenme ve kallus düzeyi üzerine etkileri 4 haftalık kültürlerde incelenmiştir. İn vitro bitkicikleri dış koşullara alıştırma denemeleri yüzen su kültürü tekniği ile iklim odasında ve ayrıca %80 torf ve %20 perlit karışımında serada plastik tünel altında (kontrol) gerçekleştirilmiştir. Dört haftalık periyodun sonunda bitkilerde canlılık oranı ve düzeyi, yaşayan bitkilerde boy, yaprak ve kök sayısı, en uzun kökün uzunluğu ve köklenme düzeyi saptanmıştır. Dış koşullara alıştırılan bitkiler sera koşullarında 3 ay süreyle geliştirilmiştir. Bu sürenin sonunda bitkilerde boy, yaprak sayısı ve gelişme düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca tüm bitkilerden alınan yaprak örneklerinde anatomik incelemeler ve klorofil analizleri yapılmıştır. İn vitro köklendirme denemelerinde AH-32’de en yüksek köklenme oranları (%60.6-%73.5) 250, 500 ve 1000 ppm IBA uygulamalarında belirlenmiştir. AH-75’de ise köklenme oranları bakımından IBA dozları arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır (%32.0-%56.4). OHxF 333 klon anacında en yüksek köklenme oranları 250 ve 500 ppm IBA uygulamaları ile elde edilmiştir (%59.4 ve %43.1). Yüksek IBA dozları her üç *Pyrus* genotipinde de kallus gelişimini tetiklemiş ve mikro çeliklerde kallus düzeyi 1000 ve 2000 ppm IBA dozlarında, 250 ve 500 ppm dozlarına göre önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Çalışmada *Pyrus* mikro çeliklerinde ex vitro köklenme sağlanamamıştır. Yüzen su kültürü tekniği ile in vitro bitkicikler 4 haftalık süreçte başarıyla dış koşullara alıştırılabilmektedir. İn vitro koşullarda 250 ppm IBA ile köklendirilmiş mikro çelikler daha yüksek oranlarda dış koşullara alıştırılmıştır. Bu oranlar OHxF 333’de %84.0, AH-32’de %62.7 ve AH-75’de %64.7 olarak belirlenmiştir. Üç *Pyrus* genotipinde de bahçe koşullarındaki ana bitkilerin yaprak üst yüzeyinde stoma tespit edilememiştir. OHxF 333 anacında yaprak alt yüzeyindeki stoma sayısı yüzen su kültüründen çıkartılan dış koşullara alışımlı bitkilerde (208.3±23.8 adet/mm²) ve sera koşullarında gelişmiş bitkilerde (267.9±24.3 adet/mm²) istatistiksel anlamda benzer olmuştur. Bu değerler bahçe koşullarındaki ana bitkilerin değerinden (160.8±11.7 adet/mm²) önemli düzeyde daha yüksektir. AH-32’de ise yüzen su kültüründen çıkartılan bitkiler (153.6±29.2 adet/mm²) ve ana bitkilerin (133.4±24.2 adet/mm²) stoma sayıları benzer bulunmuştur. Tüm genotiplerde yaprak mezofil kalınlığı 153.0±18.2 - 202.4±4.8 µm arasında değişmiş ve değerler arasında önemli bir farklılık kaydedilmemiştir. OHxF 333 klon anacında toplam klorofil, klorofil a ve b miktarı tüm bitkilerde benzer olmuştur. Yüzen su kültüründen çıkartılmış bitkiler, ana bitkilerden AH-32’de klorofil a (sırasıyla 0.0760 mg/g ve 0.0270 mg/g), AH-75’de toplam klorofil (sırasıyla 0.8136 mg/g ve 0.7090 mg/g) bakımından daha yüksek değerlere sahip olmuştur.

Aralık 2022, 97 sayfa

Anahtar Kelimeler: Armut, anaç, mikro çoğaltım, köklenme, IBA, aklimatizasyon

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

RESEARCHES ON USING OF FLOAT HYDROCULTURE FOR EX VITRO ROOTING OF MICROCUTTINGS AND ACCLIMATIZATION OF IN VITRO PLANTLETS IN SOME *PYRUS* SPECIES

Salwa İBRAHİM AHMED OSMAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU

This study was carried out to determine the use potential of the float hydroculture in the acclimatization of in vitro rooted plantlets and ex vitro rooting of microcuttings in AH-32 and AH-75 wild pear types (*Pyrus elaeagnifolia* Pall.) and Old Home x Farmingdale 333 (OHxF 333) pear clonal rootstock (*P. communis* L.). In in vitro rooting experiments, MS (Murashige and Skoog) basal medium with ½ strength of macro and microelements without growth regulator was used. In in vitro and ex vitro rooting experiments, 250, 500, 1000 and 2000 ppm IBA was applied to the microcuttings by quick-dip method for 10 seconds and the microcuttings were incubated in the dark for the first 5 days of the cultures. The effects of IBA doses on rooting percentage in microcuttings, rooting and callus levels in rooted microcuttings were investigated in 4 weeks cultures. In vitro acclimatization trials were carried out in the climate room with the float hydroculture, and under a plastic tunnel in the greenhouse on 80% peat and 20% perlite medium (control). At the end of the four-week period, the percentages of viability of the plantlets, plantlet height, number of leaves, number of roots, length of the longest root, rooting level were measured. The acclimatized plants were grown in greenhouse for 3 months. At the end of this period, height, number of leaves and growth levels were determined. In addition, anatomical examinations and chlorophyll analyses were performed on leaf samples taken from all plants. In the in vitro rooting experiments, the highest rooting percentages (60.6%-73.5%) were determined in the AH-32 in 250, 500 and 1000 ppm IBA. In the AH-75, there was no significant difference between IBA doses in terms of rooting percentages (32.0%-56.4%). The highest rooting percentages in OHxF 333 were obtained with 250 and 500 ppm IBA (59.4%-43.1%, respectively). High IBA doses triggered callus development in all three *Pyrus* genotypes, and the callus level was found to be significantly higher at 1000 and 2000 ppm IBA than at 250 and 500 ppm. In this study, ex vitro rooting could not be achieved in *Pyrus* microcuttings. Using the float hydroculture technique, in vitro plantlets were successfully acclimatized in a 4 weeks period. In vitro rooted microcuttings with 250 ppm IBA were acclimatized at higher percentages. The percentages were determined as 84.0% in OHxF 333, 62.7% in AH-32 and 64.7% in AH-75. In all three *Pyrus* genotypes, stomata could not be detected on the upper surface of the leaves of the mother plants in orchard. In OHxF 333, the number of stomata per mm² on the leaf lower surface was statistically similar in acclimatized plants removed from float hydroculture (208.3±23.8) and in plants grown under greenhouse (267.9±24.3). These values were significantly higher than those of the mother plants (160.8±11.7). In AH-32, the stomatal numbers of acclimatized plants removed from float hydroculture (153.6±29.2) and mother plants in orchard (133.4±24.2) were similar. Leaf mesophyll thickness varied between 153.0±18.2 - 202.4±4.8 µm in all genotypes and no significant difference was recorded between the values. In OHxF 333, total chlorophyll, chlorophyll a and b contents were similar in all plants. The acclimatized plants had higher values than the mother plants in terms of chlorophyll a in AH-32 (0.0760 mg/g and 0.0270 mg/g, respectively), and total chlorophyll in AH-75 (0.8136 mg/g and 0.7090 mg/g, respectively).

December 2022, 97 pages

Key Words: Pear, rootstock, micropropagation, rooting, IBA, acclimatization

TEŞEKKÜR

Doktorayı başladığımdan beri adım adım çalışmamı takip eden, bana her türlü destek ve yardımı sağlayan, yol gösteren, tez çalışmamın her aşamasında zorluk çektiğimde bana el uzatan Danışman Hocam Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı), Tez İzleme Komitesi Üyeleri Prof. Dr. Gölge SARIKAMIŞ (Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Ahmet AYGÜN'e (Kocaeli Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarı'ndaki çalışmalarım sırasında beni yönlendiren ve derin tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Nurhan BÜYÜKKARTAL'a ve Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü Laboratuvarı'ndaki klorofil analizlerimde desteğinden ve yardımından faydalandığım Öğretim Görevlisi Dr. Özge ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Sonunda iyi bir eğitim almak ve parlak bir geleceğe hazırlanmak için sevgileriyle beni buraya gönderen, bana güvenen yanımda olmasalar da manevi desteklerini kalbimde hissettiğim Sevgili Annem ve Babama ve büyük anlayış gösteren tüm aileme teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

BAP 21L0447004 nolu proje kapsamında Doktora Tezi çalışmama destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Salwa İBRAHİM AHMED OSMAN

Ankara, Aralık 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 <i>Pyrus</i> Genotiplerinde Mikro Çeliklerde Köklendirme ve Dış Koşullara Alıştırma Çalışmaları	5
2.2 Diğer Bitki Türlerinde Mikro Çeliklerde Köklendirme ve Dış Koşullara Alıştırma Çalışmaları	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM	56
3.1 Materyal	56
3.2 Yöntem	56
3.2.1 İn vitro kültürlerin oluşturulması ve mikro çeliklerin hazırlanması	56
3.2.2 İn vitro köklendirme denemeleri	57
3.2.3 Ex vitro köklendirme denemeleri	58
3.2.4 İn vitro bitkicikleri dış koşullara alıştırma denemeleri	60
3.2.5 Dış koşullara alıştırılmış bitkilerin sera koşullarında geliştirilmesi	61
3.2.6 Yaprak örneklerinde anatomik incelemeler ve klorofil analizleri	61
3.2.7 Deneme planı ve verilerin istatistik analizi	62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	63
4.1 <i>Pyrus</i> Genotiplerinde in Vitro Köklendirme Bulguları	63
4.1.1 OHxF 333 armut klonunda in vitro köklendirme bulguları	64
4.1.2 AH-32 ahlata klonunda in vitro köklendirme bulguları	65
4.1.3 AH-75 ahlata klonunda in vitro köklendirme bulguları	66

4.2 <i>Pyrus</i> Genotiplerinde Ex Vitro Köklendirme Bulguları	67
4.3 İn Vitro Bitkicikleri Dış Koşullara Alıştırma Bulguları.....	67
4.3.1 OHxF 333 armut klonunda in vitro bitkicikleri yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırma bulguları	67
4.3.2 AH-32 ahlat klonunda in vitro bitkicikleri yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırma bulguları	70
4.3.3 AH-75 ahlat klonunda in vitro bitkicikleri yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırma bulguları	71
4.3.4 Yüzen su kültürü tekniği ile in vitro bitkicikleri dış koşullara alıştırma bakımından <i>Pyrus</i> genotiplerinin karşılaştırılması	72
4.4 Sera Koşullarında Geliştirilen Üç Aylık Bitkileri Ait Bulgular	75
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	80
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	97

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
FeSO ₄ .7H ₂ O	Demir sülfat heptahidrat
Fe EDDHA	Demir etilendiamin di-o-hidroksi fenilasetik asit
g	Gram
HCL	Hidroklorik asit
K	Potasyum
KNO ₃	Potastum nitrat
mg	Milligram
ml	Mililitre
mM	Milimol
mm	Millimetre
µM	Mikromol
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
NH ₃ NO ₃	Amonyum nitrat
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ .6H ₂ O	Amonyum demir (II) sülfat hekzahidrat
ppm	Milyonda bir kısım

KISALTMALAR DİZİNİ

AMF	Arbuscular mycorrhiza fungus
BA	Benzil adenin
DKW	Driver ve Kuniyuki Walnut
GA ₃	Gibberellik asit
IAA	İndol asetik asit
IBA	İndol bütirik asit
LS	Linsmaier ve Skoog
LEP	Lepoivre
M9	East Malling 9
MS	Murashige ve Skoog
NAA	Naftalen asetik asit
NRM	Nas ve Read Medium
OHxF 333	Old Home x Farmingdale 333
PG	Phloroglucinol
PVA	Polivinil alkol
PP333	Paclobutrazol
QL	Quoirin ve Lepoivre
WPM	Woody Plant Medium
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1	OHxF 333 klon anacında 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin görünümü	64
Şekil 4.2	AH-32 ahlat klonunda 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin görünümü	65
Şekil 4.3	AH-75 ahlat klonunda 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin görünümü	66
Şekil 4.4	AH-75 ahlat klonunda 2000 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin görünümü	66
Şekil 4.5	OHxF 333 klon anacında 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alışı 4 haftalık bitkiciklerin strafor viyol içinde görünümü	70
Şekil 4.6	AH-32 ahlat klonunda 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alışı 4 haftalık bitkiciklerin strafor viyol içinde görünümü	71
Şekil 4.7	AH-75 ahlat klonunda 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alışı 4 haftalık bitkiciklerin strafor viyol içinde görünümü	72
Şekil 4.8	OHxF 333 klon anacının sera koşullarında gelişmiş 3 aylık bitkilerinin görünümü	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1	<i>Pyrus</i> genotiplerinde mikro çeliklerin <i>in vitro</i> köklenmesi üzerine IBA dozlarının etkisi	63
Çizelge 4.2	<i>Pyrus</i> genotiplerinde <i>in vitro</i> köklendirme aşamasında uygulanan IBA dozlarının, yüzen su kültürü tekniği ile bitkicikleri dış koşullara alıştırmada canlılık oranı, canlılık düzeyi ve gelişme özellikleri üzerine etkileri	68
Çizelge 4.3	Yüzen su kültürü tekniği ile <i>in vitro</i> bitkicikleri dış koşullara alıştırmada bitkiciklerde canlılık oranı, düzeyi ve gelişme özellikleri bakımından <i>Pyrus</i> genotiplerinin karşılaştırılması	73
Çizelge 4.4	Yüzen su kültürü ile dış koşullara alıştırılmış <i>in vitro</i> bitkiciklerin yaprak anatomik özellikleri yönünden <i>Pyrus</i> genotiplerinin karşılaştırılması	74
Çizelge 4.5	Yüzen su kültürü ile dış koşullara alıştırılmış <i>in vitro</i> bitkiciklerin klorofil özellikleri yönünden <i>Pyrus</i> genotiplerinin karşılaştırılması	75
Çizelge 4.6	OHxF 333 armut klon anacının üç aylık bitkilerinin bazı gelişme özellikleri	6
Çizelge 4.7	<i>Pyrus</i> genotiplerinde yüzen su kültüründen çıkartılan, sera koşullarında geliştirilen bitkiler ve bahçe koşullarındaki ana bitkilerin yaprak anatomik özellikleri ve klorofil özelliklerinin karşılaştırılması	78

1. GİRİŞ

Yüzyıllardır olduğu gibi günümüzde de armutlar için ideal anaç arayışı hâlâ devam etmektedir (Dondini ve Sansavini 2012). Bunun en önemli sebeplerinden birisi birim alandan elde edilecek verimin ve ürün kalitesinin yükseltilmesi amacıyla diğeri meyve türlerinde olduğu gibi armut yetiştiriciliğinde de intensif tarıma olan yöneliştir. Bu sistemin gereği olan bodurluk için ise çoğu orta kuvvette gelişen armut klon anaçlarının (*Pyrus communis* L.) uygun olmamasından dolayı bodur ayva klon anaçlarının kullanılması, bu durumda ise yaşanan aşu uyuşmazlığıdır. Bu nedenlerle, armut çeşitleri ile aşu uyuşmazlığı sorunu olmayan ve aynı zamanda bodur gelişme özelliğindeki klon anaçlara olan ihtiyaç armut yetiştiriciliğinde devam etmektedir. Bunun ötesinde küresel ısınma başta olmak üzere olumsuz iklim ve toprak özelliklerinin tetiklediğı şiddetli abiyotik stres koşullarına karşı dayanıklı bodur armut klon anaçlarının ıslahı da intensif armut tarımının sürdürülebilirliği için önemli bir gereksinimdir. Ayrıca, bu özelliklere sahip anaçlar üretim maliyetinin düşmesine yaptığı katkıların yanında dünya nüfusundaki hızlı yükseliş ile birlikte artan ürün talebinin karşılanabilmesi için yetiştiricilik yapılamayan alanların modern meyve üretiminde değerlendirebilmesi için de önemlidir (Bolat vd. 2018). Dünyanın özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerinde ve kireçli topraklar üzerinde armut tarımını etkileyen abiyotik stres unsurlarından ikisi kuraklık ve bitkilerde demir eksikliğine bağlı klorozdur. Bu stres unsurlarının şiddetli olduğu alanlarda mevcut klon anaçlarla intensif armut tarımı yapmak mümkün değildir (Lombard ve Westwood 1987, Kassa 2015, İkinci vd. 2016, Gür ve Şan 2017). Dünyada toprakların büyük bölümünün sulanamaması, sulanabilir alanlarda mevcut su kaynaklarındaki hızlı azalış ve tarım topraklarının yarısına yakınında kireç oranındaki yükseklik nedeniyle bitkilerde karşılaşılan demir noksanlığı sorunu dikkate alındığında kuraklık ve kloroza dayanıklı yeni armut klon anaçlarının geliştirilmesinin önemi daha da iyi anlaşılmaktadır.

Kurak ve kıraç alanlara uyum yeteneğı ve armut kültür çeşitleriyle yüksek aşu başarısı gösterdiği için armut anaç ıslahında değerlendirilebilecek bir tür olan ahlata (*Pyrus elaeagrifolia* Pall.) (Özbek 1978, Lombard ve Westwood 1987, Dolcet-Sanjuan vd. 2004, Bell ve Itai 2011, Dumanoglu vd. 2014) dünyada gen merkezlerinden birisi olan Anadolu bu yabani armut türünde zengin genetik çeşitliliğı sahiptir. Tohumla

çoğaltıldığında yüksek düzeyde genetik açılım gösterdiğinden dolayı kendi kökleri üzerinde bir örnek bitki üretiminin sadece klonal çoğaltım yöntemleri ile mümkün olduğu ahlatta, çelikle çoğaltımda köklenme sorunlarının yanında üretim katsayısının düşük olması nedeniyle mikro çoğaltım başvurulması gereken en önemli çoğaltım tekniğidir (Aygün ve Dumanoglu 2015).

Dünyada 20. yüzyılın sonlarından itibaren hızla gelişmekte olan mikro çoğaltım tekniği kapsamında köklenmede elde edilen başarılı sonuçlar sayesinde anaç ıslah çalışmaları çok büyük bir ivme kazanmıştır. Nitekim günümüzde meyve türlerinde klon anaçların sayısı çok yüksek düzeylere ulaşmış ve fidancılık sektöründe bu anaçların kullanımı yine mikro çoğaltım sayesinde ticari boyutta giderek artan bir eğilim içerisine girmiştir. Bu kapsamda, fidancılık sektöründe yarı bodur armut fidanı üretiminde yaygın olarak tercih edilen anaçlardan birisi durumundaki Old Home x Farmingdale 333 (OHxF 333) (*P. communis* L.) standart armut klon anacına olan yoğun talebin mikro çoğaltım tekniği ile karşılandığı bilinmektedir (Alizadeh vd. 2018).

Mikro çoğaltım, bitki doku kültürleri kapsamında sürgün ucu, tomurcuk, boğum, meristem, kök, yumru, soğan, hücre süspansiyon, embriyo ve tohum kültürleri, mikro aşılama ve somatik embriyogenesis gibi tekniklerin esas alındığı in vitro ve ex vitro çalışmaların bütünü olan bir çoğaltım yöntemidir. Bu yöntem ile sınırlı sayıda başlangıç materyali ile zamana bağlı kalınmadan yıl boyunca bir örnek bitki üretimi kitlesel olarak yapılabilir. Mikro çoğaltım, eksplantın seçimi ve ön hazırlık (aşama-0), kültüre alma (aşama-1), sürgün çoğaltma (aşama-2), köklendirme (aşama-3), dış koşullara alıştırma (aklimatizasyon) (aşama-4) ve son olarak bahçe koşullarına taşıma (aşama-5) olmak üzere genellikle toplam altı aşamadan oluşmaktadır (Soumare vd. 2021). Köklendirme ve dış koşullara alıştırma, mikro çoğaltımın en kritik aşamaları olup başarısızlık ya da düşük başarı durumlarında çok yüksek ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Bu aşamalarda başarı üzerine en etkili faktör genotip olmakla birlikte fizyolojik durum, ortamların tipi, yapısı ve içeriği, dışsal uygulamalar, ışık, sıcaklık, nem, hava bileşimi gibi çevresel unsurlar diğer önemli konulardır (Hartmann vd. 2011).

Genel anlamda bitkilerde seçilmiş klonların başarıyla üretilmesinde önemli rol oynayan adventif köklenme karmaşık bir süreçtir ve diğer türlerde olduğu gibi odunsu bitki

türlerinin vejetatif çoğaltımında da önemli bir adımdır. Köklenmesi zor olan bu türlerde oksin uygulamaları kök gelişiminin düzenlenmesinde oldukça etkilidir. Özellikle oksin yanıtı oksin/IAA (indol asetik asit) ve oksin yanıt faktörü gen ailelerinde, oksin ile indüklenen genlerin ve oksin sinyal yolunun aydınlatılmasında günümüzde büyük ilerleme kaydedilmiştir. Köklenme sinyalleşmesinin bazı önemli yönleri ortaya çıkartılmış olsa da bu karmaşık ağ henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Pop vd. 2011). Adventif kökler, endodermisin iç tarafında yer alan meristematik özellik taşıyan hücrelerden meydana gelmiş bir yapı olan kök periskl dokusundan ortaya çıkan lateral köklerden farklı olarak bitkilerde gövde, yapraklar ve yaşlı köklerde periskl olmayan dokulardan doğal olarak ya da stres altında meydana gelmektedir. Bunlar, lateral kökler gibi post-embriyonik köklerdir. Bu kökler mekanik hasar ya da doku kültüründe sürgün rejenerasyonunu takiben de indüklenebilmektedir. Adventif kökler, floem veya ksilem parankim hücreleri, genç ikincil floem hücreleri veya floem hücrelerine yakın demetlerarası kambiyum hücreleri gibi mevcut hücrelerden doğrudan ya da dolaylı olarak çelikler alınırken gerçekleşen mekanik hasarın neden olduğu kallus dokudan meydana gelebilmektedir (Li vd. 2009, Bellini vd. 2014). Birçok odunsu bitki türünde oksinlerin adventif köklerin etkili indükleyicileri olduğu gösterilmiştir (De Klerk vd. 1999). Adventif köklenmenin ilk aşaması farklılaşma ve yeni bir meristematik bölgenin oluşumudur. İkinci aşama erken hücre bölünmeleridir. Bu aşamada polarite göstermeyen ve radyal olarak simetrik hücre kümeleri meydana gelmektedir. Hücrelerin gelişme yönü henüz belirli değildir. Üçüncü aşama organize olmuş belirli bir kök meristemini oluşturmak üzere bir sonraki hücre bölünmeleridir. Kök meristemi en az 1500 hücreden oluşmaktadır ve iki taraflı simetrisi ile karakterize edilmektedir. Dördüncü aşama meristem tarafından üretilen hücrelerin uzunlamasına gelişimi ile kökün ortaya çıkmasıdır. Bu aşama yeni oluşmuş meristem ve gövde arasında vasküler birleşmenin gerçekleştiği ve kökün ilk kez dıştan görünür duruma geldiği aşamadır (Blakesley vd. 1991).

Mikro çeliklerin bitkiye dönüşümü için zorunlu olan adventif kök oluşumu ve gelişiminin ardından in vitro bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması da mikro çoğaltım yoluyla bitki üretiminin en önemli aşamalarından birisidir (Hartmann vd. 2011, Soumare vd. 2021). Bitki türlerinde in vitro bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması farklı

ortam karışımlarında sera koşullarında sisleme sistemlerinin altında ya da tünellerde, bitki yetiştirme odaları veya dolaplarında, kapalı örtü sistemlerinde başlangıçta yüksek nem koşulları sağlanarak 2-4 haftalık süreçte tedrici olarak gerçekleştirilmektedir. *Pyrus* genotiplerini de kapsayan birçok odunsu bitki türünde yaygın olarak kullanılan bu yöntemlerde bitkilerde yoğun ölümler yaşanabilmektedir (Chandra vd. 2010, Chirinea vd. 2012, Kumar ve Rao 2012, Clapa vd. 2013). Bu soruna karşı Clapa vd. (2013) tarafından yüzen su kültürü (float hydroculture) adı ile geliştirilmiş olan teknikle bitkilerin dış koşullara alıştırılmasında yüksek başarı oranlarının elde edildiği bildirilmiştir. Bu teknikte gübrelerin, büyümeyi düzenleyici maddelerin, biyo-uyarıcılarının kullanılmadığı ve ayrıca sistemde su oksijenasyonuna gerek bulunmadığı ve bu yönleriyle diğer su kültürlerinden farklılık gösterdiği öne sürülmüştür (Clapa vd. 2013).

Bu tez çalışması, OHxF 333 standart armut klon anacında (*P. communis* L.) ve armutta anaç ıslah çalışmaları kapsamında seçilmiş bazı ahlat tiplerinde (*P. elaeagrifolia* Pall.) in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin dış koşullara alıştırılmasında ve ex vitro köklendirmede yüzen su kültürü tekniğinin kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Pyrus* Genotiplerinde Mikro Çeliklerde Köklendirme ve Dış Koşullara Alıştırma Çalışmaları

Kunneman ve Albers (1992) yeni armut anacı ZP01'in (*P. communis*) in vitro ve in vivo köklenmesi ve dış koşullara alıştırılması, köklü ve köksüz mikro çeliklerin yaşama oranları ve gelişimleri üzerine akimatizasyon koşullarının etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar köklendirme çalışmalarında mikro çelikleri, 4'er hafta arayla en az 10 kez alt kültüre alınmış mikro sürgünlerden hazırlamışlardır. Alt kültürlerde MS (Murashige ve Skoog) (Murashige ve Skoog 1962) ya da LEP (Lepoivre) (Quoirin vd. 1977) besin ortamlarının makro elementlerini, MS ortamının mikro elementlerini esas almışlardır. Bu ortamlara 100 mg/L myoinositol, 0.5 mg/L nicotinic acid, 1.0 mg/L thiamine-HCl, 0.5 mg/L pyridoxine-HCl ilave etmişlerdir. İn vitro köklendirme aşamasında LEP besin ortamının ½ kuvvetinde makro elementlerini, 1/1 kuvvetinde mikro elementlerini ve çoğaltma ortamının vitaminlerini esas almışlar, ortama 0.2 mg/L IBA ve 30 g/L sakaroz katmışlardır. Köklendirme denemelerinde mikro çelikler ilk hafta tamamen karanlıkta bırakılmış ve daha sonra 16 saat aydınlık koşullarda ($70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 4 hafta tutulmuştur. İn vivo köklendirme için mikro çelikler doğrudan alt kültürlerden hazırlanmış ve dip kısımları 25, 50, 100 veya 200 mg/L IBA solüsyonuna 15 saniye süreyle daldırılmıştır. Torf oranı %35, %50, %70 veya %90 olan gübreli torf (Finnpeat ST400 B6) ve perlit karışımlarına dikilen mikro çelikler 4 hafta süreyle fog sistemine sahip %95 nispi nem ve 16 saat aydınlık koşullardaki seraya taşınmıştır. Mikro çeliklere dip ısıtma, ortalama 23°C, 25°C veya 29°C sıcaklıklarda uygulanmış, ancak sıcaklığın etkisinin önemli olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada köklenmiş çeliklerin dış koşullara alışma oranının, köksüz çeliklerden çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. Yüksek torf oranlarında canlı kalma yüzdesi azalırken bitkilerin gelişme durumu iyileşmiştir. Düşük torf oranlı (%35-50) torf ve perlit karışımlarında mikro çeliklerin yaşama oranı 1. ve 2. denemelerde köklü çeliklerde sırasıyla ~%90-95 ve ~%75, köksüz çeliklerde ~%60 ve ~%30-35 olarak belirlenmiştir. Bitki boyu ise yüksek torf oranlı (%70-90) karışımlarda 1. ve 2. denemelerde köklü çeliklerde ~70-60 mm ve köksüz çeliklerde ~50-60 mm olarak belirlenmiştir. Çalışmada mikro çeliklerin in vivo köklenme oranları ve bitki boyu üzerine IBA dozlarının etkisi gübreli ve gübresiz toprak karışımlarına göre

incelenmiştir. İçerisinde %70 torf bulunan gübrenmemiş karışımın iletkenliği 0.25 mS, gübrenmiş olanın ise 0.68 mS olarak tespit edilmiştir. Denemelerde köklenme ve bitki gelişimi üzerine IBA'nın tek başına belirgin bir etkisi ortaya çıkmamıştır. Gübresiz karışım ile birlikte IBA uygulanmamış çeliklerde %90, IBA uygulanmışlarda %81 köklenme oranları ve sırasıyla 35 mm ve 36 mm bitki boyu saptanmıştır. Gübreli karışım kullanıldığında ise gelişme daha iyi olmuş ve bitki boyu IBA uygulanmış ve uygulanmamış çeliklerde 41 mm ve 42 mm olarak kaydedilmiştir. Bu nedenle araştırmacılar kök oluşturmak için başlangıçta 1-2 hafta gübresiz karışım kullanımını, daha sonra bitki gelişimi için sıvı gübreler ile uygun konsantrasyonlarda düzenli uygulamalar ile gübrenmiş karışımı önermişlerdir.

Baraldi vd. (1993), mikro çelikleri zor (Doyenné d'Hiver) ve kolay (Conference) köklenen iki armut çeşidinde köklenme üzerine IBA'nın etkilerini, alımını ve metabolizmasını araştırdıkları çalışmalarında mikro çeliklere 1.5 µM IBA ve ³H-IBA uygulamışlardır. Kültürler ilk 7 gün karanlıkta tutulmuş ve daha sonra 16 saat aydınlık koşullara alınmıştır. Uygulamadan 4 gün sonra mikro sürgünlerin aldığı ³H-IBA oranı kolay köklenen Conference çeşidinde %40, zor köklenen Doyenné d'Hiver çeşidinde %19 olmuştur. Sadece Conference çeşidi IBA'yı kök oluşumu safhasında serbest IAA'ya dönüştürme yeteneğine sahip olmuştur. Böylece kolay köklenen Conference çeşidinde ilk 2 günde içsel IAA seviyesi hızla artarken, zor köklenen Doyenné d'Hiver çeşidinde çok düşük seviyede kalmıştır. Köklenme yeteneği bakımından 2 genotip arasındaki farklılığın oksin alımı ve metabolize etme yeteneği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Al-Maarri vd. (1994), Passe Crassane ve Williams armut çeşitlerinde in vitro koşullarda en iyi köklenmeyi 0.2 mg/L NAA (naftalen asetik asit) uygulaması ile elde etmişlerdir. Ortama PG (phloroglucinol) (160 mg/L) ilavesi köklenme oranını artırmamıştır. Ex vitro köklenme, mikro çeliklerin 2°C'de 1 ay soğuklatılmasının ardından NAA'nın 10, 50 ya da 100 mg/L solusyonlarına 1 saat daldırma uygulaması ile uyarılmıştır. Daha sonra mikro çelikler plastik kaplara dikilmiş ve sera koşullarında 24°C'de tutulmuştur. Ex vitro denemelerde NAA'nın farklı dozlarında (10, 50 ve 100 mg/L) Passe Crassane

çeşidinin mikro çeliklerinin tamamı köklenmiştir. Williams çeşidinde bu denemede 100 mg/L NAA uygulamasında en iyi köklenme değerleri elde edilmiştir.

Reed (1995), farklı *Pyrus* genotiplerinde mikro çeliklerin in vitro köklenmesi üzerine farklı uygulamaların etkisini araştırmıştır. Uygulama konuları 1) büyümeyi düzenleyici madde ilave edilmeyen temel besin ortamı üzerinde 4 hafta süreyle kültüre alma (kontrol), 2) dimetil sülfoksit içerisinde çözünmüş 10 mM IBA solusyonuna (2000 ppm) mikro çelikleri 15 saniye süreyle hızlı daldırma ve daha sonra 4 hafta süreyle büyümeyi düzenleyici madde ilave edilmeyen temel besin ortamı üzerinde kültüre alma, 3) mikro çelikleri önce 1 hafta süreyle 10 μ M IBA (2000 ppm) içeren ortamda ve daha sonra 3 hafta süreyle büyümeyi düzenleyici madde ilave edilmeyen temel besin ortamı üzerinde kültüre alma, 4) dimetil sülfoksit içerisinde çözünmüş 10 mM NAA solusyonuna (2000 ppm) mikro çelikleri 15 saniye süreyle hızlı daldırma ve daha sonra 4 hafta süreyle büyümeyi düzenleyici madde ilave edilmeyen temel besin ortamı üzerinde kültüre alma, 5) üç nolu uygulamaya tabi tutulan mikro çelikleri 3 hafta karanlıkta ve daha sonra 1 hafta aydınlıkta inkübe etme ve 6) üç nolu uygulamaya tabi tutulan mikro çelikleri 30°C'de 4 hafta inkübe etmedir. Araştırmacı çalışmasının sonunda köklenme düzeyi bilinmeyen genotipler için IBA ya da NAA solusyonlarına hızlı daldırma uygulamalarını önermiştir. *P. communis* genotipleri için 3 nolu uygulama (10 μ M IBA), 2 nolu uygulama (10 mM IBA) ve bu uygulamaların sonuç vermediği durumda 4 nolu uygulamaların (10 mM NAA) uygun olacağını, köklenmesi çok güç genotipler için 5 ve 6 nolu uygulamaların kullanılabileceğini bildirmiştir. Denemede yer alan 50 genotipin ortalama değerlerine göre IBA uygulamalarının köklenme oranı üzerine etkileri kontrolde %8.9, 10 mM IBA hızlı daldırmada %35.3, 10 μ M IBA uygulamasında %27.0'dır. Ortalama kök uzunluğuna etkileri ise uygulamalara göre 4.5 mm, 6.9 mm ve 11.1 mm'dir. Zor köklenen 28 genotipte IBA ve NAA uygulamalarının etkileri ortalama köklenme oranı bakımından kontrolde %4.3, 10 mM IBA hızlı daldırma uygulamasında %22.7, 10 mM NAA uygulamasında %31.8 ve 10 μ M IBA uygulamasında %5.5 bulunmuştur. Kök uzunluğu bu uygulamalarda sırasıyla 2.1 mm, 4.1 mm, 5.9 mm ve 5.8 mm olarak belirlenmiştir.

Yeo ve Reed (1995), üç armut anacı Oregon Pear Rootstock (OPR) 157 (*P. calleryana*), OPR 260 (*P. betulifolia*) ve OHxF 230 (*P. communis*) genotiplerinin mikro çeliklerinin in vitro koşullarda köklendirilmesi denemelerinde Cheng besin ortamını kullanmışlardır. Köklendirme denemeleri 3 hafta sürdürülmüştür. Konular, kontrol, mikro çeliklerin dip kısmını 10 mM NAA ya da IBA solüsyonuna 15 saniye süreyle hızlı daldırma, 10 µM (2 mg/L) IBA içeren besin ortamında 1 hafta karanlık ya da 16 saat aydınlıkta tutmanın ardından büyümeyi düzenleyici madde bulunmayan besin ortamında 16 saat aydınlık koşullarda inkübasyondur. Çalışmanın sonunda OHxF 230 anacı tüm köklendirme uygulamalarında yüksek oranlarda (%80<) köklenmiştir. Kök sayısı 10 mM NAA ve IBA hızlı daldırma uygulamalarında 8.4 ve 6.9 adet ile diğer uygulamalardan önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Kallus gelişimi, 10 mM IBA hızlı daldırma uygulaması ile uyarılmıştır (0.9 cm). OPR 157 anacında köklenme oranları çok düşük seviyelerde kalmıştır. Bu anaçta en yüksek köklenme oranı %23.9 ile 10 mM NAA hızlı daldırma uygulamasında kaydedilmiştir. Ortalama kök sayısı da çok düşüktür (0.1-0.3 adet/mikro çelik). OPR 260 anacında ise en yüksek köklenme oranı %42.9 ile 10 µM IBA+1 hafta karanlık uygulamasında belirlenmiştir. Bu uygulamada ortalama kök sayısı (1.0 adet/mikro çelik), diğer uygulamalardan önemli düzeyde daha yüksek olmuştur. Ayrıca araştırmada ex vitro koşullarda köklendirme çalışmaları da yapılmıştır. Bu denemede mikro çeliklerin dip kısımları 1:1 Dip'N Grow (%1 IBA, %0.5 NAA) ve su (v/v) solüsyonuna daldırılmış ve 1:1 oranında perlit ve torf karışımına dikilerek mist sistemi altına alınmıştır. Çalışmada ex vitro denemelerde üç anaçta da köklenme sağlanamamıştır.

Baraldi vd. (1995), mikro çelikleri kolay köklenen Conference ve zor köklenen Doyenne d'Hiver armut çeşitlerinde in vitro kök oluşumundaki farklılıkların, IAA ve poliaminlerin içsel seviyeleri ve IBA'nın metabolizması ile ilişkilerini araştırmışlardır. Çalışmada köklendirme ortamı olarak 0, 0.5, 1.5, 5 ve 15 µM (0.0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/L) IBA ya da IAA ilave edilmiş olan MS ortamının ½ kuvvetinde mineral maddelerini ve LS (Linsmaier ve Skoog) ortamının vitaminlerini içeren ortam kullanılmıştır. Kültürler ilk 7 gün karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Zor köklenen Doyenne d'Hiver armut çeşidinde en yüksek köklenme oranı (%83) 15 µM IBA uygulamasında belirlenmiştir. Kolay köklenen Conference armut çeşidinde bu

düzeydeki köklenme oranına 10 kat daha düşük olan 1.5 µM IBA dozunda ulaşılmıştır. Çalışmada köklenme oranları IBA uygulamalarında, IAA'ya göre daha yüksek olmuştur. Yüksek IBA dozlarında köklenme oranları ve kök sayıları artmış ancak kök uzunlukları azalmıştır. Köklenme oranı, kök sayısı ve kök uzunlukları 15 µM IBA uygulaması ile Conference çeşidinde sırasıyla %95, 6.3 adet/köklenen sürgün ve 4.6 mm, Doyenne d'Hiver armut çeşidinde %83, 5.9 adet/köklenen sürgün ve 4.9 mm'dir. IBA'nın 1.5 µM uygulamasında ise Conference çeşidinde sırasıyla %84, 3.4 adet/köklenen sürgün ve 17 mm, Doyenne d'Hiver çeşidinde %45, 2.2 adet/köklenen sürgün ve 10.7 mm'dir. Çalışmada her iki çeşitte de mikro çeliklerin IBA'ya 1-2 gün maruz kalması köklenmeyi uyarmak için yeterli olmuştur. Poliamin analizinden elde edilen sonuçlar, uygulamanın 4. gününde serbest putrescine düzeylerinde meydana gelen artışın Doyenne d'Hiver çeşidinde ortaya çıkan düşük köklenme ile ilişkisini göstermiştir.

Shibli vd. (1997) çalışmalarında yabani armudun (*P. syrica*) mikro çoğaltımında mikro sürgünlerin in vitro ve ex vitro köklendirilmesinde IBA, IAA ve NAA'nın etkilerini araştırmışlardır. İn vitro denemelerde oksinler 0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/L dozlarında ½ MS besin ortamına ilave edilmiş, ex vitro denemelerde ise mikro sürgünlerin dip kısımları 0, 5, 10, 15 ya da 20 mg/L dozlarında oksin solüsyonlarına 1 saat süreyle daldırılmıştır. Daha sonra mikro çelikler 1:1 oranındaki perlit ve torf karışımına dikilerek mist sistemi altına alınmıştır. İn vitro denemelerde en yüksek köklenme değerleri IBA uygulamalarında elde edilmiştir. Oksin dozu yükseldikçe köklenme oranları, kök sayısı ve uzunluk değerleri artmıştır. En yüksek köklenme oranı (%72), kök sayısı (3.1 adet) ve kök uzunluğu (4.6 cm) 3.0 mg/L IBA uygulamasında kaydedilmiştir. Çalışmada in vitro denemelerde diğer bir konu olan aktif karbon (1.0 g/L) ve polivinil pyrrolidonun (0.1 g/L) oksinler ile birlikte ya da tek başlarına in vitro köklenme üzerine etkili olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada mikro sürgünlerin ex vitro köklenme denemeleri başarılı olmamıştır.

Damiano ve Morticelli (1998), yabani armut türü *P. pyraeaster*'in P8, P38 ve P50 klonlarının da yer aldığı bazı zor ve kolay köklenen farklı meyve türlerine dâhil genotiplerde mikro sürgünlerin in vitro köklenmesi üzerine oksin ile birlikte ya da oksin

olmadan *Agrobacterium rhizogenes* suşu 1855'in etkilerini araştırmışlardır. Köklendirme denemelerinde temel besin ortamı olarak makro ve mikro besin elementleri ½ kuvvetinde olan MS ortamı kullanılmıştır. Bu ortama 0.5 mg/L nicotinic acid, 0.5 mg/L pyridoxine, 2 mg/L glycine, 0.5 mg/L thiamine, 0.1 mg/L biotin, 200 mg/L inositol, 0.5 mg/L riboflavin, 1 mg/L calcium pantotenate ilave edilmiştir. Mikro çeliklerin dip kısımları 24 saat boyunca karanlık koşullarda 0.5 mL bakteri süspansiyonuna batırılmış, oksin bulunan ya da bulunmayan köklenme ortamına taşınmış ve daha sonra antibiyotik (250 mg/L Cefotaxime) ilave edilmiş aynı ortamlarda kültüre alınmıştır. P 50 kültürleri inokülasyondan sonra 10 gün karanlıkta tutulmuştur. Armut klonları için oksin olarak çalışmada IAA (2 mg/L) veya NAA (1 mg/L) kullanılmıştır. Oksinsiz ortamda (kontrol) armut klonlarının mikro çeliklerinde köklenme meydana gelmemiştir. Sadece oksin kullanılan ortamda P8 klonunda köklenme olmamış ve diğer klonlarda %16.7-%32.1 köklenme belirlenmiştir. Oksin kullanılmayan sadece bakteri inokülasyonu yapılmış mikro çeliklerde köklenme oranı armut klonlarında %26.3-%50.8 arasında değişmiştir. Hem oksin ve hem de bakteri inokülasyonu yapılmış mikro çeliklerde ise bu oran %15.0-%73.4 olmuştur. Bakteri inokülasyonu sonrasında tüm klonlarda köklenme meydana gelmiş ise de özellikle P8 klonunda inokülasyon ile bu oran %50.8'e ulaşmıştır. P38 ve P50 klonlarında ise bakteri inokülasyonu yanında oksin uygulamaları ile köklenme oranları yükselmiş ve sırasıyla %73.4 ve %63.7 olarak kaydedilmiştir.

Leite vd. (2002), Bartlett (Williams) ve OHxF 97 armut genotiplerinin mikro sürgünlerinin köklenmesi üzerine agar ve vermikulitin etkilerini inceledikleri çalışmalarında temel besin ortamı olarak 100 mg/L myoinositol, 30 g/L sakaroz, 6 g/L agar ya da 8 g/tüp vermikulit katılmış MS besin ortamını kullanmışlardır. Kültürlere karanlık da uygulanmış ve gözlemler 30 gün sonra yapılmıştır. Agar ya da vermikulitin köklenme oranını etkilemediği çalışmada agar üzerindeki sürgünlerde daha fazla sayıda kök oluşmuştur. Bartlett çeşidinde agarda köklenme oranı %56.3, kök sayısı 2.7 adet/sürgün ve kök uzunluğu 2.4 cm; vermikulitte köklenme oranı %53.8, kök sayısı 1.8 adet/sürgün ve kök uzunluğu 2.7 cm'dir. OHxF 97 anacında agarda köklenme oranı %70, kök sayısı 2.9 adet/sürgün, kök uzunluğu 2.1 cm; vermikulitte köklenme oranı %84.4, kök sayısı 2.7 adet ve kök uzunluğu 1.7 cm'dir. Vermikulitte köklenmiş

sürgünler Bartlett ve OHxF 97'de sırasıyla %31 ve %53 oranlarında sekonder kök oluşturmuştur. Sekonder kök oluşumu agar üzerindeki sürgünlerde meydana gelmemiştir. Karanlık uygulaması köklenme oranını %98'den %86'ya, kök uzunluğunu da 3.5 cm'den 2.1 cm'ye azaltmıştır.

Pasqual vd. (2002), *P. betulaefolia* türüne dâhil ümitvar bir armut anacının in vitro köklenmesi üzerine IBA ve yaralama uygulamalarının etkisini 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda değerlendirmişlerdir. İlk denemede 3 adet uzunlamasına yaralama yapılmış ve yapılmamış mikro çelikler 0.0, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1.0 mg/L dozlarında IBA içeren MS ortamına dikilmiştir. Bu denemede yaralama uygulaması, 0.25 mg/L ve 0.5 mg/L IBA dozlarının etkinliğini artırmış ve köklenme oranı sırasıyla %80 ve %100 olarak belirlenmiştir. Yaralama yapılmayan uygulamada IBA'nın bu dozlarında köklenme oranı %20 seviyesinde kalmıştır. Yaralama yapılmış ve yapılmamış uygulamalarda 1.0 mg/L IBA dozunda köklenme oranı %100 olarak saptanmıştır. İkinci denemede mikro çelikler 0.0, 0.1, 1.0 ve 5.0 mg/L IBA içeren MS ortamına dikilmiştir. Bu denemede en yüksek köklenme oranları 1.0 mg/L ve 5.0 mg/L IBA dozlarında %60 ve %80 olarak kaydedilmiştir. Üçüncü denemede mikro çelikler 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/L IBA ilave edilmiş %0, %25, %50, %75 ya da tam kuvvette MS ortamına dikilmiş ve sürgün boyu belirlenmiştir. Bu denemede en iyi sonuç tam kuvvette MS ortamında belirlenmiştir.

Previati vd. (2002), Bologna Üniversitesi tarafından selekte edilmiş A74, C91, D41, E82, E105 ve E110 armut anaçlarının (*P. communis*) in vitro köklenmesi üzerine MS ve QL (Quoirin ve Lepoivre) (Quoirin ve Lepoivre 1977, Quoirin vd. 1977) temel besin ortamları ve PG'nin (162 mg/L) etkilerini araştırmışlardır. MS besin ortamına 3 mg/L IAA, QL besin ortamına 2 mg/L IAA ve 1 mg/L NAA ilave edilmiştir. MS besin ortamı üzerinde köklenme oranı genotiplere göre %86.3 ile %98.0 arasında değişmiştir. Bu ortam üzerinde köklenme QL ortamına göre daha yüksek olmuştur. MS ortamında makro elementlerin oranı köklenme üzerine etkisiz olurken QL ortamında makro elementlerin %50'lik oranı %100'den daha iyi sonuç vermiştir. Çalışmada PG'nin köklenme üzerine etkisi olmamıştır.

Damiano vd. (2002), yabani armut (*P. communis* var. *pyraster* L.) ve bazı armut (*P. communis*) çeşitlerinin (Williams, Precoce di Fiorano, Conference ve Harvest Queen) in vitro kitlesel çoğaltımında mikro çeliklerin köklendirilmesinde 60 dakika olarak geçici daldırma tekniğinin (temporary immersion technique) etkisini araştırmışlardır. Çalışmada temel besin ortamı olarak ½ kuvvetindeki MS ortamı esas alınmıştır. Besin ortamları Harvest Queen ve Conference çeşitlerinde MS + 2 mg/L IAA + %2 sakaroz, Precocedi Fiorano çeşidinde MS + 3 mg/L NAA + %2 sakaroz, Williams çeşidinde MS + 1 mg/L ca-pantothenate + 0.1mg/L biotin + 2 mg/L NAA + 162 mg/L PG + %1.5 sakaroz olarak hazırlanmıştır. Mikro çelikler hem ışık ve hem de karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Çalışmanın sonucunda yabani armutta 2 mg/L IBA ve 162 mg/L PG içeren besin ortamına günde 60 dakika süreyle daldırma tekniği 13 gün sonra köklenmeyi tetiklemiştir. Köklenme oranı bakımından katı ortam (%71) ve geçici daldırma tekniği (%74) arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Paclobutrazol, geçici daldırma yöntemi ile kullanıldığında köklenme oranı %38 olmuş ve kökler zayıf gelişmiştir. Genel olarak armut çeşitlerinde katı ortam ve geçici daldırma tekniği arasında istatistiksel anlamda önemli farklılıklar belirlenmemiştir. Köklenme oranları Harvest Queen’de %71, Precocedi Fiorano’da %58, Williams’da %80 ve Conference’de %71 olarak kaydedilmiştir.

Zhu vd. (2003), soğuğa dayanıklı, armut çeşitleriyle uyuşur, bodur armut anacı BP10030’a (*P. communis*) köklenme sorununun çözümü için *rolB* genini aktarmışlardır. Elde edilen 6 transgenik klonda oksin uygulaması olmaksızın in vitro köklenme oranı %67-100 ve sürgün başına kök sayısı 4.6-9.0 adet arasında belirlenmiştir. Transgenik olmayan mikro sürgünlerde ise aynı koşullarda köklenme meydana gelmemiştir. Transgenik 4 klonun in vitro bitkicikleri 1:1 oranında toprak ve perlit karışımı üzerinde sera koşullarında 30 cm boya ulaştığında ex vitro köklendirme denemeleri için 2-3 boğumlu yeşil çelikler hazırlanmıştır. Çelikler toprak ve perlit ortamında nemli koşullarda köklendirilmiştir. Transgenik klonların çeliklerinde ex vitro köklenme oranı %71-100 ve kök sayısı 11-17 adet/çelik arasında değişmiştir. Transgenik olmayan kontrolde bu değerler %5 ve 3 adet/sürgün olarak kaydedilmiştir.

Iglesias vd. (2004), Dr. Jules Guyot armut çeşidinin (*P. communis* L.) yeni bir tipi olan IGE 2002'nin mikro çeliklerinin köklendirilmesi için farklı denemeler kurmuşlardır. İn vitro köklendirme çalışmalarında temel besin ortamı olarak makro element düzeyi ½ olan MS besin ortamı kullanılmıştır. İlk aşamada 0.0, 1.0, 3.2, 10.0 veya 31.6 µM (0.0, 0.2, 0.6, 2.0, 6.3 mg/L) IBA ya da NAA içeren ortamlarda mikro çelikleri 5 gün süreyle tutmuşlardır. Daha sonra bu mikro çelikleri 3 hafta süreyle oksin içermeyen besin ortamında kültüre almışlardır. Bu çalışmanın sonunda en iyi sonuç 10 µM IBA (2 mg/L) uygulamasından alınmıştır. İkinci aşamada araştırmacılar 4 farklı deneme kurmuşlardır. Bu denemeler; 1) mikro çelikleri 10 µM IBA içeren köklendirme ortamında 5 gün tutma ve daha sonra agarla katılaştırılmış IBA içermeyen besin ortamı üzerinde 3 hafta tutma, 2) birinci uygulamadaki gibi IBA'da tutma, ancak daha sonra mikro çelikleri 3 hafta süreyle %150 dozunda köklendirme ortamı (1/2 makro elementli MS) ilave edilmiş vermikulit üzerinde kültüre alma, 3) ikinci uygulama ile aynı ancak IBA'lı ortamda bekletme süresi 2 gün, 4) mikro çelikleri 15 saniye süreyle 10 mM IBA (%50 metanol içerisinde) (2000 ppm) solusyonuna daldırma ve bunları köklendirme ortamı ilave edilmiş vermikulitte kültüre alma. Bu çalışmanın sonunda köklenme oranları uygulamalara göre sırasıyla %82, %81.9, %40 ve %95.9 olarak kaydedilmiş ve 1. , 2. ve 4. uygulamalar arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. Bu uygulamalar araştırmacılar tarafından en iyi sonuç veren uygulamalar olarak tanımlanmıştır.

Barros vd. (2005), yerel Portekiz armut çeşitlerinin mikro sürgünlerinde in vitro köklenmenin iyileştirilmesi amacıyla uzun ve kısa süreli ön uygulamalar şeklinde iki farklı uygulama denemişlerdir. İlk uygulama, mikro sürgünlerin 5-10 µM IBA (1-2 mg/L) içeren besin ortamında 10 gün ve ikinci uygulama 0.5-1.0 mM IBA (100-200 mg/L) içeren ortam üzerinde 16 saat süreyle tutulması yoluyla yapılmıştır. Her iki uygulamada da sürgünler daha sonra oksin bulunmayan besin ortamına transfer edilmiştir. Kùltürler ilk 5 gün karanlıkta inkübe edilmiştir. Rocha çeşidinde 2 uygulama arasında farklılık ortaya çıkmamış, ancak Perola çeşidinde uzun süreli ön uygulama, Carapinha çeşidinde ise kısa süreli ön uygulama başarılı olmuştur. Kısa süreli ön uygulama aşırı kallus gelişimine neden olmuştur. Araştırmacılar ayrıca kısa süreli ön uygulamada farklı süreleri (2, 4, 8, 16 saat) denemişler ve karanlık periyodun süresini

değiştirmişlerdir. Köklenme yüzdesi bakımından ön uygulama süreleri arasındaki farklılık önemsiz olurken, Roche çeşidinde 8 saatlik sürede en yüksek köklenme oranı elde edilmiştir. Karanlık uygulamasının süresinin kısaltılması Carapinheria çeşidinde köklenme üzerinde çok etkili olmuştur.

Bahri-Sahloul vd. (2005), OHxF armut anaçlarının mikro çeliklerinin köklendirilmesi çalışmasında en iyi sonucu besin ortamına 10 µM IBA (2 mg/L) ilave edilmesinin verdiğini bildirmişlerdir. Mikro çeliklerinin köklenmesi için OHxF 69 anacının karanlık uygulamasına ihtiyaç duyduğu, oysa OHxF 40 ve OHxF 87 anaçlarının karanlığa gereksinimlerinin bulunmadığı belirtilmiştir.

Lucyszyn vd. (2006) çalışmalarında Durondeau (*P. communis*) armut çeşidinin mikro çoğaltımında katılaştırıcı olarak agarın bir kısmı yerine galaktomannanların kullanımını araştırmışlardır. Galaktomannanlar, *Cassia fastuosa* (cassia) ve *Cyamopsis tetragonolobus* (guar) tohumlarından ekstrakte edilmiştir. Denemelerde agar %0.6 dozunda, agar/cassia veya agar/guar karışımı ise her birisi %0.3 dozunda kullanılmıştır. Yaklaşık 1.5 cm uzunlukta hazırlanan mikro çeliklerin köklendirilmesinde besin ortamı olarak 0.4 mg/L thiamine HCl, 1 mg/L riboflavin, 100 mg/L myo-inositol ve 20 g/L sakaroz ilave edilmiş makro elementleri ½ ve mikro elementleri tam kuvvette olan QL besin ortamı esas alınmıştır. Belirtilen katılaştırıcıların kullanıldığı besin ortamlarına IBA 0, 0.98 µM (0.2 mg/L) ya da 9.80 µM (2.0 mg/L) dozlarında katılmıştır. Kültürler 16 saat aydınlık koşullarda 30 gün süreyle tutulmuştur. Çalışmada en yüksek köklenme değerleri IBA'nın 9.80 µM (2.0 mg/L) dozunda elde edilmiştir. Belirtilen IBA dozunda köklenme oranları bakımından katılaştırıcılar arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemli bulunmuş ve agarda %49.27, agar/guar karışımında %66.90, agar/cassia karışımında ise %91.17 olarak kaydedilmiştir. Aynı IBA dozunda eksplant başına kök sayısı, bu katılaştırıcılara göre sırasıyla 1.98 adet, 4.29 adet ve 4.27 adet olmuştur. Kök uzunluğu ise 1.21 cm, 1.44 cm ve 1.54 cm olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, besin ortamlarında katılaştırıcı olarak agar/galaktomannan karışımlarının mikro çoğaltımda sürgün çoğaltımı ve köklendirmede başarılı sonuçlar verdiğini ve ayrıca tek başına agar kullanımına göre maliyeti 17-34 kat azalttığını bildirmişlerdir.

Thakur ve Kanwar (2006) çalışmalarında yabani armut (*P. pyrifolia*), Kainth (*P. pashia*) ve Shiara (*P. serotina*) anaçları ile Patharnakh (*P. pyrifolia*) ve Punjab Beauty (*P. pyrifolia* x *P. communis*) çeşitlerinin mikro çeliklerinin köklenmesi üzerine PG'nin etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, 100 mg/L inositol ve %3 sakaroz ilave edilmiş ½ kuvvetindeki MS temel besin ortamı %0.7 agar ile katılaştırılmış ya da sıvı halde kullanılmıştır. İlk çalışmada in vitro koşullarda NAA ve IBA kombinasyonunun köklenme oranını önemli düzeyde artırdığı tespit edilmiş ve denemelerde mikro sürgünlere PG (0, 40, 80 ve 160 mg/L) ve NAA+IBA (her birisi 0.125-1.0 mg/L) birlikte uygulanmıştır. Bu denemede sadece yabani armut genotipinde %80'in üzerinde köklenme başarısı sağlandığı için zor köklenen dört armut genotipinin mikro sürgünlerinde 5 farklı deneme kurulmuştur. Bu denemeler; 1) mikro sürgünleri 162 mg/L PG ilave edilmiş ½ MS katılaştırılmış besin ortamında 1 hafta karanlık ve 3 hafta aydınlık koşullarda tutma, 2) IBA (0.5 mg/L) + PG (162 mg/L) içeren ½ MS katılaştırılmış besin ortamında 1 hafta karanlık ve ½ MS sıvı ya da katılaştırılmış besin ortamında 3 hafta aydınlık koşullarda tutma, 3) IBA (1.0 mg/L), 4) NAA (0.5 mg/L) ve 5) NAA (1.0 mg/L) ile uygulanmış olup diğer işlemler 2 nolu deneme ile aynıdır. Çalışmada yabani armut genotipinde sıvı ve katılaştırılmış besin ortamlarında PG uygulamaları köklenme üzerine olumlu etki yapmıştır. Bununla birlikte sıvı kültürlerde çok küçük kökler ve camlaşma meydana gelmiştir. Bu armut genotipinde NAA + IBA (her birisi 0.25 mg/L) ve PG (160 mg/L) içeren katılaştırılmış ortamda %86.29 oranında köklenme elde edilmiştir. Kainth, Punjab Beauty ve Shiara genotiplerinde katılaştırılmış ortamlarda PG ilavesi köklenme üzerine engelleyici etki yapmıştır. Sıvı ortamlarda Kainth genotipinde 40 ve 80 mg/L PG köklenmeyi uyarmış ancak 160 mg/L PG etkisiz kalmıştır. Punjab Beauty ve Shiara'da 40 mg/L PG içeren sıvı ortam etkisiz olurken 80 ve 160 mg/L PG köklenmeyi engellemiştir. Patharnakh'da ise PG uygulamaları köklenme üzerine başarısız olmuştur. Kainth'de mikro sürgünleri IBA (0.5 mg/L) + PG (160 mg/L) içeren ½ MS katılaştırılmış besin ortamında 1 hafta karanlık ve daha sonra ½ MS sıvı besin ortamında 3 hafta aydınlık koşullarda tutma ile köklenme oranı %76'ya ulaşmıştır. Patharnakh'da ise IBA yerine NAA kullanılarak aynı uygulama ile %58.7 oranında köklenme sağlanmıştır.

Sotiropoulos vd. (2006), OHxF 333 armut anacının mikro sürgünlerinin in vitro köklenmesi üzerine 0.2 mg/L GA₃ (gibberellik asit) ve 1.5 mg/L IBA ilave edilmiş MS besin ortamında üç farklı Fe formunun (FeSO₄·7H₂O (demir sülfat heptahidrat), (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O (amonyum demir (II) sülfat heksahidrat), Fe EDDHA (etilendiamin di-o-hidroksi fenilasetik asit) etkilerini araştırmışlardır. Her bir form 0.1, 0.2 veya 0.4 mM demir sağlayacak konsantrasyonlarda besin ortamlarına ilave edilirken kontrol uygulamasında demir kullanılmamıştır. Çalışmada en iyi sonuçlar (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O formu ile 0.1 mM Fe dozunda elde edilmiştir. Bu uygulamada köklenme oranı %85, kök sayısı 4.2 adet/sürgün ve kök uzunluğu 12.61 mm, kontrolde ise bu değerler sırasıyla %30, 1.6 adet/sürgün ve 9.15 mm olarak kaydedilmiştir.

Thakur ve Kanwar (2008), yabani armut türü *P. pyrifolia*'nın mikro çoğaltımında köklenme üzerine katı ve sıvı besin ortamlarının, NAA, IBA, NAA+IBA (0.125, 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L), 2,4-D (0.125, 0.25 ve 0.5 mg/L) ve PG (0, 40, 80 ve 160 mg/L) dozlarının etkilerini araştırmışlardır. Oksinlerden bağımsız olarak köklenme oranları katı ortamda (%28.78), sıvı ortamdan (%6.80) daha yüksek bulunmuştur. NAA ve IBA'nın düşük dozlarında köklenme daha iyi sonuç vermiştir. Köklenme oranları katı ortamda 0.125 ve 0.25 mg/L dozlarında NAA'da %70.98 ve %70.14, IBA'da %59.10 ve %63.66 olarak kaydedilmiştir. 2,4-D uygulamalarında köklenme meydana gelmemiştir. Düşük dozlarda NAA+IBA kombinasyonlarında köklenme değerleri yükselmiş, 0.25 mg/L NAA + 0.25 mg/L IBA uygulamasında köklenme oranı %81.47, kök sayısı 5.52 adet/çelik ve kök uzunluğu 2.60 cm olarak belirlenmiştir. Phloroglucinol ilavesi köklenme değerlerini iyileştirmiştir. Özellikle 160 mg/L PG ve 0.25 mg/L NAA + 0.25 mg/L IBA ilave edilmiş katı ortamlarda köklenme oranı %86.29, kök sayısı 13.10 adet/çelik ve kök uzunluğu 1.12 cm olarak kaydedilmiştir. İn vitro bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması kum+toprak (3:1 v/v) kum+toprak (2:1 v/v) ve perlit bulunan plastik saksılarda (400 mL) %90-100 nem koşullarında yapılmış ve belirtilen ortamlarda bitkilerde canlılık oranları sırasıyla %52.03, %32.77 ve %10.5 olarak saptanmıştır.

Sun vd. (2009), farklı ploidy seviyelerine sahip armut klonlarında (*P. communis* L.) mikro çeliklerin in vitro köklenmesi üzerine temel besin ortamlarının ve PVA'nın (polivinil alkol) etkilerini araştırmışlardır. PVA diploid, triploid ve tetraploid klonlarda

köklenme oranını ve kök sayısını artırmıştır. Besin ortamlarına 0.5 mg/L IBA ve %2 sakaroz ilave edilmiştir. Diploid armut genotiplerinde en yüksek köklenme (%70), ½ QL temel besin ortamından elde edilirken ½ MS (%15.2 köklenme) ve ¼ MS (%31.2 köklenme) ortamları kullanıldığında köklenme oranları ½ QL'nin gerisinde kalmıştır. Araştırmacılar ½ QL besin ortamına 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g/L PVA eklemişlerdir. Bu besin ortamına 1 g/L PVA ilave edildiğinde köklenme oranı %85'e ulaşmıştır. Kök sayısı da PVA kullanılmadığında yaklaşık 2 adet/mikro çelik ve 1 g/L PVA kullanıldığında 4.5 adet/mikro çelik olarak saptanmıştır.

Haq ve Kaloo (2010), *P. pyrifolia*'nın mikro çoğaltımı kapsamında mikro sürgünleri IBA, IAA, NAA ve 2,4-D ilave edilmiş makro ve mikro elementleri ½ düzeyinde olan MS temel besin ortamı üzerinde kültüre almışlardır. Çalışmada in vitro koşullarda en iyi köklenme 0.25 mg/L IBA+0.125 mg/L NAA kombinasyonunda elde edilmiştir. Bu ortam üzerinde sürgün başına 8.5 adet kök meydana gelmiştir. Köklenen mikro sürgünler 5±1 haftalık periyotda ortamın nem düzeyi %95'den %75'e azaltılarak dış koşullara alıştırılmıştır. En yüksek ex vitro koşullarda canlı bitki oranı %56.50 ile kum+toprak (1:1 v/v) üzerinde belirlenmiştir.

Ruzic vd. (2011), Pyrodwarf armut anacının (BU 5-18 klonu-Rhenus 1) (*P. communis*) mikro çoğaltımında sürgünleri 5 µM (1 mg/L) IBA, 0.3 µM (0.1 mg/L) GA₃ ilave edilmiş olan mineral maddeleri ½, organik maddeleri 1/1 kuvvetinde olan MS besin ortamında köklendirmişlerdir. Çalışmada en yüksek köklenme oranı (%96), kök sayısı (4.88 adet) ve kök uzunluğu (1.83 cm), sürgün çoğaltma aşamasında sitokinin olarak BA (benzil adenin) kullanılmış ortamlardan sağlanan mikro sürgünlerde elde edilmiştir. Köklenmiş sürgünler steril soil substratum (Steckmedium-Klasmann) doldurulmuş plastik saksılarda sera koşullarında mist sistemi altında iki haftada %90.9 canlılık oranı ile dış koşullara alıştırılmıştır.

Saadat vd. (2012), *P. glabra* armut türünde farklı uygulamaların 5 hafta sonra mikro çeliklerin köklenmesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 1) MS besin ortamına 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 ve 1.0 mg/L dozlarında IBA ilave etmişler ve mikro çelikleri in vitro koşullarda köklendirmişlerdir. Bu denemede köklenme oranı (%12-%48),

ortalama kök sayısı (2.64-5.67 adet/sürgün) ve ortalama kök uzunluğu (1.21-2.79 cm) yönünden uygulamalar arasında istatistiksel bakımdan önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır. 2) Makro element düzeyi $\frac{1}{2}$ kuvvetinde olan MS besin ortamına 50 mg/L IBA ya da NAA ilave ederek mikro çelikleri 30, 40 ya da 50 saat süreyle bu ortamda karanlık koşullarda ve daha sonra oksin içermeyen besin ortamı üzerinde 16 saat aydınlık koşullarda tutmuşlardır. Bu denemede IBA ve NAA arasında köklenme oranı (sırasıyla %53.85 ve %50.0) ve ortalama kök sayısı (sırasıyla 5.61-7.21 adet/sürgün) bakımından bir farklılık bulunmamış ancak ortalama kök uzunluğu yönünden IBA (3.09 cm), NAA'dan (1.92 cm) daha iyi sonuç vermiştir. Uygulama süresi bakımından 40 saat (%47.5) ve 50 saat (%71.9) uygulamaları, 30 saat (%40) uygulamasına göre köklenme oranını artırmıştır. Bu uygulamalarda ortalama kök sayısı (5.06-7.81 adet/sürgün) ve ortalama kök uzunluğu (1.21-2.79 cm) istatistiksel anlamda benzer olmuştur. 3) Mikro çelikleri 50 mg/L IBA içeren makro element düzeyi $\frac{1}{2}$ olan MS besin ortamı üzerinde 12, 24, 48 ya da 72 saat süreyle karanlık koşullarda inkübe etmişler ve daha sonra in vitro koşullarda oksin içermeyen MS besin ortamına almışlardır. Bunun dışında 50 mg/L IBA içeren makro element düzeyi $\frac{1}{2}$ olan MS besin ortamında 24 saat süreyle karanlık koşullarda mikro çelikleri beklettikten sonra Jiffy-7 şişen tablette %90-95 nem içeren ex vitro koşullarda köklendirmeye almışlardır. Bu uygulamalarda köklenme oranı sırasıyla %25, %54.2, %53.3, %85.0 ve %100 olarak kaydedilmiştir. En yüksek köklenme oranları 72 saat karanlık + in vitro köklendirme ve 24 saat karanlık + Jiffy-7'de ex vitro köklendirme uygulamalarında belirlenmiştir. Bu uygulamalarda ortalama kök sayısı önemli bir farklılıkla sırasıyla 14.52 adet/sürgün ve 6.10 adet/sürgün, ortalama kök uzunluğu ise benzer değerlerde (3.86 cm ve 3.12 cm) kaydedilmiştir. Araştırmacılar, ex vitro köklenmenin zaman ve maliyet açısından in vitro köklenmeye göre daha avantajlı olduğuna dikkat çekmişlerdir.

Vujovic vd. (2012) diğer bazı meyve anaçları ile birlikte Pyrodwarf armut anacının mikro çoğaltımı kapsamında mikro sürgünleri 1 mg/L IBA+0.1 mg/L GA₃ ya da 1 mg/L NAA+0.1 mg/L GA₃ ilave edilmiş makro ve mikro elementleri $\frac{1}{2}$ kuvvetinde olan MS ortamında köklendirmişlerdir. Çalışmada IBA uygulaması %90 köklenme oranı, 4.4 adet/sürgün kök sayısı ve 2.08 cm kök uzunluğu ile NAA uygulamasından daha iyi sonuç vermiştir. Bu özellikler NAA uygulamasında sırasıyla %40, 1.1 adet/sürgün ve

1.26 cm olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar mist sistemi altında in vitro bitkicikleri %90.9 oranında 2 haftada dış koşullara alıştırmıştır.

Hassanen ve Gabr (2012), çalışmalarında *P. betulaefolia* türüne dâhil bir anaçta mikro çeliklerin in vitro köklenmesi üzerine 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/L IBA ya da NAA'nın etkilerini araştırmışlardır. Araştırmada, IBA'nın, NAA'ya göre daha etkili olduğu ve en yüksek köklenme oranının (%85), kök sayısının (4.0 adet/sürgün) ve kök uzunluğunun (3.0 cm) 2.0 mg/L IBA, 1 g/L aktif kömür ve 20 g/L sakaroz içeren ½ kuvvetindeki MS ortamından elde edildiği bildirilmiştir. Kültürlere ilk 7 gün karanlık uygulanmıştır. Araştırmacılar köklenmiş sürgünleri içinde kum+torf (1:1 v/v) karışımı bulunan plastik saksılara dikmiş, polietilen film ile örtmüş ve 3 hafta içerisinde bu örtüyü yavaş yavaş kaldırarak bitkicikleri dış koşullara alıştırmışlardır. Dış koşullara alıšan bitkiler 28°C sıcaklık %70-80 nispi neme sahip sera koşullarına alınmış ve ¼ MS besin ortamı ile sulanmıştır. Bitkilerin %70'i dış koşullara alışmıştır.

Rehman vd. (2014a), çalışmalarında *P. pashia* armut türünde mikro çeliklerin in vitro köklendirilmesi üzerine ½ MS, MS ve WPM besin ortamlarının ve 0.1, 1.0 ve 2.0 mg/L dozlarında IBA ve NAA'nın etkilerini araştırmışlardır. Mikro çeliklerde en yüksek köklenme oranı ½ MS ortamı üzerinde IBA için 0.1 mg/L dozunda %14.08 ve NAA için 1.0 mg/L dozunda %27.46 olarak belirlenmiştir. Çalışmada IBA uygulamalarında en fazla kök sayısı 2.6 adet/eksplant ile ½ MS ortamında 1.0 mg/L IBA dozunda belirlenmiştir. NAA'nın 1.0 mg/L dozu ise tam kuvvetteki MS ortamı üzerinde kök sayısını (3.6 adet/eksplant) artırmıştır. En uzun kök WPM (Woody Plant Medium) ortamında 0.1 mg/L IBA (31.1 mm) ve 1.0 mg/L NAA (23.22 mm) uygulamalarında kaydedilmiştir.

Rehman vd. (2014b), *P. pyrifolia* armut türünde mikro çeliklerin in vitro köklendirilmesi üzerine MS, makro ve mikro element düzeyi ½ olan MS ve WPM temel besin ortamlarının ve 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L dozlarında IBA ve NAA'nın etkilerini araştırdıkları çalışmalarında en yüksek köklenme oranını 1.0 mg/L IBA içeren ½ kuvvetteki MS ortamı üzerinde %10.16 olarak belirlemişlerdir. Aynı zamanda en yüksek ortalama kök sayısı da (2.38 adet/eksplant) bu ortam üzerinde kaydedilmiştir.

Ortalama kök uzunluğu bu ortamda 15.90 mm olarak ölçülmüştür. Bununla birlikte en uzun kökler (28.57 mm) WPM ortamında saptanmıştır. Çalışmada NAA bulunan ortamlarda köklenme meydana gelmemiştir.

Aygun ve Dumanoglu (2015), ahlatta (*P. elaeagrifolia* Pallas) mikro çeliklerin in vitro ve ex vitro köklenmesi üzerine NAA ve IBA'nın etkilerini araştırdıkları çalışmalarında in vitro denemelerde oksinleri 5 µM (1 mg/L) ve 10 µM (2 mg/L) dozlarında besin ortamına ilave ederek ya da aseptik koşullarda 10 mM (2000 ppm) ve 20 mM (4000 ppm) dozlarında hızlı daldırma yöntemiyle (10 saniye) mikro çeliklere uygulanmışlardır. Bu denemelerde temel besin ortamı olarak ½ kuvvetinde MS ortamı esas alınmıştır. Ortamda sakaroz %3 ve agar %0.7 düzeyinde kullanılmıştır. Kültürlere ilk 10 gün karanlık uygulanarak ya da uygulanmadan 16 saat aydınlık koşullarda toplam 45 gün süreyle tutulmuştur. Ex vitro köklendirme denemelerinde ise 0, 10, 20, 30 ve 40 mM (0, 1000, 2000, 3000 ve 4000 ppm) oksin solüsyonları mikro çeliklere hızlı daldırma yöntemiyle (10 saniye) uygulanmıştır. Daha sonra perlit ortama dikilen mikro çelikler tedrici olarak dış koşullara alıştırılarak 75 gün süreyle inkübe edilmiştir. In vitro köklendirme denemelerinde en yüksek köklenme oranı (%54.2), kök uzunluğu (10.5 mm) ve kök sayısı (2.5 adet/mikro çelik) 5 µM IBA içeren ortam üzerinde 10 gün karanlık uygulamasıyla elde edilmiştir. Ex vitro köklendirme denemelerinde ise en iyi sonuca 10 mM IBA uygulamasıyla ulaşılmıştır. Bu uygulamada köklenme oranı %55 ve kök sayısı 1.8 adet/mikro çelik olarak kaydedilmiştir.

Yi vd. (2015), Bae Yun No. 3, Bartlett ve Whanggeum armut genotiplerinde (*Pyrus* spp.) mikro çeliklerin köklenmesini NAA (0.1-0.2 mg/L), IBA (1.2-2.5mg/L) ya da kombinasyon halinde 0.1, 0.2 ve 0.5 mg/L NAA+IBA ilave edilmiş ½ kuvvetindeki MS besin ortamı üzerinde araştırmışlardır. Ayrıca köklenme üzerine 0, 75, 150 ve 300 mg/L PG dozlarının etkilerini de değerlendirmişlerdir. Çalışmada 30 günün sonunda en yüksek köklenme oranı her üç genotipte de 0.2 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA kombinasyonunda belirlenmiştir. Bu oran Bae Yun No.3'de %68.9, Bartlett'de %53.4 ve Whanggeum'da %51.8 olmuştur. Köklenme oranı besin ortamına 75 ve 150 mg/L PG ilave edilmesiyle Bae Yun No.3'de sırasıyla %89.3 ve %91.8, Bartlett'de %77.3 ve

%71.1, Whanggeum'da %62.1 ve %70.3 düzeyine çıkmıştır. Bu uygulamaların genotiplerde kök uzunluğunu ve sayısını da artırdığı bildirilmiştir.

Papakosta (2016), yerel yabani armut anacı *Pyraster*'in (*P. communis*) mikro çoğaltımı çalışmaları kapsamında mikro çelikleri 0.5 mg/L IBA ilave edilmiş WPM ve MS temel besin ortamları üzerinde köklendirmiştir. MS ortamı üzerinde köklenme oranı %70, ortalama kök sayısı 4.4 adet/sürgün ve ortalama kök uzunluğu 1.8 cm olarak belirlenmiştir. WPM ortamında ise ortalama kök sayısı 2.6 adet/sürgün ve ortalama kök uzunluğu 0.7 cm olarak kaydedilmiştir. MS ortamının köklenme için daha uygun olduğunun belirlendiği çalışmada ayrıca bu ortam üzerinde bitkilerin daha iyi geliştiği, yaprakların iri ve yoğun yeşil renkli olduğu bildirilmiştir.

Zakavi vd. (2016), kurağa dayanıklı *P. boissieriana* yabani armut türünde mikro çeliklerin in vitro köklenmesi üzerine farklı kuvvetlerdeki (1/6, 1/8 ve 1/10) MS temel besin ortamının ve 0, 0.005, 0.01 ve 0.05 mg/L dozlarında IBA, IAA ve NAA'nın etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada en yüksek köklenme oranı (%100) ile birlikte kök uzunluğu (9 cm) 0.005 mg/L IBA ilave edilmiş 1/6 kuvvetindeki MS ortamında belirlenmiştir. Araştırmacılar in vitro bitkicikleri 1:2:3 oranlarında perlit, kokopit ve torf içeren kaplarda 3 haftada dış koşullara alıştırmışlardır.

Alizadeh vd. (2018), OHxF 333 armut anacının (*P. communis* L.) mikro çeliklerinin in vitro köklenmesi üzerine 0, 12, 24, 48, 120 ve 240 ppm IBA ve IAA'nın etkilerini araştırdıkları denemelerinde oksinleri aseptik koşullarda mikro çeliklerin dip kısmına yavaş daldırma (1 saat) yöntemiyle uygulamışlardır. Makro element düzeyi ½ olan MS besin ortamına dikilen mikro çelikler ilk 1 hafta karanlıkta ve daha sonra 16 saat aydınlıkta olmak üzere toplam altı hafta süreyle kültüre alınmıştır. Bu denemede IAA'nın 48, 120, 240 ppm ve IBA'nın 12, 24, 120 ppm uygulamalarında %50.0 ile %83.3 arasında köklenme oranları kaydedilmiştir. Araştırmacılar mikro çeliklerin köklenmesi üzerine PVA dozlarının (1, 2 ve 3 g/L) etkilerini araştırdıkları diğer denemelerinde aseptik koşullarda hızlı daldırma yöntemiyle (10 saniye) 200 ppm IBA uygulanmış mikro çelikleri PVA ilave edilmiş ya da edilmemiş besin ortamında kültüre almışlardır. İlk deneme ile aynı koşullarda inkübe edilen kültürlerde PVA

uygulamalarının kontrole (%66.7) göre köklenme oranlarını (%75-100) önemli düzeyde artırdığı saptanmıştır. Bununla birlikte köklenen mikro çeliklerde köklenme düzeyi (2.51), kök sayısı (3.54 adet/mikro çelik) ve kök uzunluğu (17.0 mm) bakımından uygulamalar arasındaki farklılıkların istatistiksel anlamda önemli olmadığı belirlenmiştir.

Tsoulpha vd. (2018), badem yapraklı yabani armut türü *P. spinosa*'nın mikro çoğaltımında kök uyarımı için 24.6 μM (5 mg/L) IBA ilave edilmiş modifiye MS ($\frac{1}{2}$ NH_4NO_3 , $\frac{1}{2}$ KNO_3) besin ortamı üzerinde mikro sürgünleri 7 gün süreyle karanlıkta bekletme, daha sonra kök gelişimi için oksin içermeyen modifiye MS ortamına taşınarak 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda dört hafta süreyle inkübasyonu çalışmada en iyi sonucu vermiştir. Bu uygulamada köklenme oranı %83.33, kök sayısı 6.20 adet/sürgün, kök uzunluğu 0.56 cm olmuştur. Oksin içermeyen armut ortamının esas alındığı kontrol uygulamasında ise köklenme oranı %18.75, kök sayısı 2.65 adet/sürgün ve kök uzunluğu 1 cm olarak kaydedilmiştir. İn vitro bitkicikler iklim kontrollü küçük bir serada perlit ortamı üzerinde bitkiciklerin üzeri örtülerek yüksek nem koşullarının sağlandığı 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda 3 haftada dış koşullara alıştırılmış ve altı hafta sonra yapılan gözlemlerde alıştırma başarısı %87.5 olarak bildirilmiştir. Bitkiciklere bu süreçte 20 gün aralıklarla sıvı modifiye MS makro element ($\frac{1}{2}$ NH_4NO_3 , $\frac{1}{2}$ KNO_3) solüsyonu uygulanmıştır.

Dimitrova vd. (2019), OHxF 333'ün mikro çeliklerinin in vitro köklenmesi ve bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması üzerine köklendirme aşamasında besin ortamına ilave edilen yeni bir doğal bitki biyostimülatörü Charkar'ın etkilerini araştırmışlardır. İn vitro koşullarda kültüre alınmış zencefil köklerinin endofiti-simbiyotik fungusun metabolizma ürünlerinin su-alkol ekstraktı olan Charkar'ın, aminoasitler, yağ asitleri, şekerler, makro ve mikro besin elementleri ve fitohormon benzerlerini içerdiği bildirilmiştir. Temel besin ortamı olarak makro elementleri 1/2 ve mikro elementleri tam kuvvette olan DKW (Driver ve Kuniyuki Walnut) besin ortamınının (Driver ve Kuniyuki 1984) kullanıldığı çalışmada kontrol dışında bu ortama 10 μM (2 mg/L) IAA tek başına ya da 0.1, 0.3 veya 0.5 ml/L dozlarında Charkar ile birlikte ilave edilmiştir. Çalışmanın sonunda IAA ve IAA+Charkar uygulamalarının köklenmeyi kontrole göre

%20 oranında artırdığı belirtilmiştir. Köklenme aşamasında uygulanan IAA ve/veya Charkor'un, OHxF 333'ün genç bitkilerinin dış koşullarda gelişmesi üzerinde uzun vadeli olumlu bir etkiye sahip olduğu ve en iyi sonuçların tek başına IAA ve IAA'nın 0.5 ml/L Charkor ile oluşturduğu kombinasyondan elde edildiği bildirilmiştir.

Hlaing vd. (2019), *P. betulifolia* (Bet 1, Bet 2 ve Bet 3) ve *P. ussuriensis* (Uss) armut türlerinde mikro çelikleri iki aşamada köklendirmişlerdir. İlk aşamada mikro çelikler 0.2 mg/L veya 0.3 mg/L IBA ilave edilmiş ½ kuvvetindeki MS besin ortamı üzerinde dönüşümlü olarak 7 gün karanlık ve 7 gün aydınlık koşullarda inkübe edilmiştir. İkinci aşamada bu mikro çelikler 2 mg/L IBA solüsyonuna (%50 etil alkol) 10 ve 15 saniye süreyle daldırılmış ve oksin içermeyen ½ kuvvetindeki MS ortamına dikilmiştir. Çalışmada en yüksek köklenme değerleri Bet 1 genotipinde kaydedilmiştir. Bu genotipte, 0.3 mg/L IBA içeren ½ MS ortamından sonra 2 mg/L IBA solüsyonuna 15 saniye hızlı daldırma uygulamasında %86.67 oranında köklenme ve 7.33 adet/sürgün kök sayısı belirlenmiştir. Uss genotipinde ise 0.2 mg/L IBA içeren ½ MS ortamı + 2 mg/L IBA'ya 15 saniye daldırma uygulaması ile %80 köklenme oranı ve çalışmanın en yüksek kök uzunluğu 3.23 cm olarak saptanmıştır. Bet 2 (%46.6-53,3) ve Bet 3 (%33.33-46.67) genotiplerinde köklenme oranı bakımından uygulamalar arasında önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır. Sürgün başına ortalama kök sayısı bakımından da Bet 2 (3.78-4.67 adet), Bet 3 (2.0-2.67 adet) ve Uss (4.33-6.61 adet) genotiplerinde uygulamaların etkisi benzer bulunmuştur. Dış koşullara alışma oranı en yüksek Bet 1 genotipinde %60 olarak belirlenmiştir.

Najafabadi ve Roohollahi (2019), yerli İran armut çeşidi Natanzi'de (*P. communis*) mycorrhiza mantarları ile bulaştırmanın köklenmiş mikro çeliklerin dış koşullara alışması üzerine etkilerini araştırmışlardır. İn vitro köklendirme denemelerinde farklı dozlarda IBA ya da NAA ilave edilmiş MS besin ortamı kullanılmış, kültürler karanlık ve aydınlık koşullarda inkübe edilmiştir. En yüksek köklenme oranı 0.5 mg/L NAA ilave edilmiş MS ve ½ kuvvetinde MS besin ortamlarında aydınlık ve karanlık koşullarda elde edilmiştir. Köklenmiş mikro çeliklerin dikimi için 1:1 oranında kokopit+perlit veya torf+perlit (v/v) karışımları kullanılmıştır. *Glomus mosseae* ve *G. intraradices* mantarlarının sporları bir karışım formunda saksılarda bitkilerin dikileceği

deliğe köklerin yaklaşık 1 cm altında kalacak şekilde 10 gram olarak uygulanmıştır. Bitkiler yüksek nem koşullarında dış koşullara alıştırılmıştır. Kontrol ile karşılaştırıldığında mycorrhiza mantarları ile bulaştırmanın köklü mikro çeliklerin büyüme ve gelişmesi üzerine olumlu etkisi olduğu ve köklü çeliklerin %100 oranında dış koşullara alıştırıldığı belirlenmiştir. Bitkilerin yaprak fosfor konsantrasyonu ve kök kolonizasyon yüzdesi sonuçları, fosfor konsantrasyonu ile kolonizasyon yüzdesi arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermiştir.

Karakeçili vd. (2019), OHxF 333 armut (*P. communis* L.) ve köklenme yeteneği çok düşük bir ahlat tipinde (*P. elaeagrifolia*) mikro çeliklerin in vitro köklenmesi üzerine IAA (12.3, 24.5, 49.0, 112.6 ve 245.3 mg/L), IBA (16.3, 32.5, 65.0, 162.6 ve 325.2 mg/L) ve 20, 40, 80, 200 ve 400 mg/L dozlarında çinko nanopartikül, IAA veya IBA yüklü çinko nanopartiküllerin etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında uygulamaları aseptik koşullarda yavaş daldırma yöntemiyle (1 saat) yapmışlardır. Çalışmada kontrol ve oksinsiz çinko nanopartikül uygulamalarında genel olarak köklenme gözlenmemiştir. Bununla birlikte 185.7 mg/L IBA yüklü çinko nanopartikülün 400 mg/L dozunda ahlat tipinde %50 ve OHxF 333'de %100 köklenme sağlanmıştır. Çalışmada, oksinler ile yüklü çinko oksit nanopartiküllerin özellikle köklenme yeteneği düşük genotiplerde mikro çeliklerin köklenmesinde oksinlere göre başarıyı en az iki kat artırabileceği vurgulanmıştır.

Kotb vd. (2020), Le-Conte armut çeşidinin (*P. communis*) mikro çeliklerini 0.0, 1.0, 2.0 ya da 3.0 mg/L IAA veya IBA ve 2 g/L aktif kömür ilave edilmiş MS besin ortamı üzerinde köklendirmişlerdir. Çalışmada en yüksek köklenme oranları 3.0 mg/L IAA (%100) ve 3.0 mg/L IBA (%88,89) uygulamalarında elde edilmiştir. Bu kök sayısı 7.0 adet/çelik ve kök uzunlukları sırasıyla 7.90 cm ve 5.60 cm olarak kaydedilmiştir. Kök sayısı en fazla (8.0 adet/çelik) 1.0 mg/L IAA dozundan elde edilmiştir. Bu uygulamada köklenme oranı ise %55.56 olmuştur.

İbrahim Ahmed Osman ve Dumanoglu (2020), çalışmalarında ümitvar armut anacı bazı ahlat klonlarının (*Pyrus elaeagrifolia* Pall.) (Ahlat 32, Ahlat 50, Ahlat 75 ve Ahlat 78) mikro çeliklerinin in vitro köklenmesi üzerine 250, 500, 1000, 2000 ppm IBA

dozlarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada temel besin ortamı olarak %2 sakaroz ve %0.7 agar ilave edilmiş ½ kuvvetindeki MS ortamı kullanılmıştır. IBA, mikro çeliklerin dip kısımlarına hızlı daldırma yöntemiyle 10 saniye süreyle aseptik koşullarda uygulanmıştır. Kùltürler ilk 5 gün karanlıkta ve daha sonra 16 saat aydınlık koşullarda tutulmuştur. Dört haftanın sonunda istatistiksel anlamda önemli bir farklılıkla en yüksek köklenme oranı Ahlat 32’de 500 ve 1000 ppm IBA dozlarında %72.5 ve %84.0; Ahlat 50’de 250 ppm’de %90.0; Ahlat 75’de 250, 500, 1000 ve 2000 ppm dozlarında %57.5, %48.0, %48.0, %51.4; Ahlat 78’de 250 ve 500 ppm dozlarında %92.6 ve %85.7 olarak kaydedilmiştir. Kontrol uygulamasında genotiplerde köklenme meydana gelmemiştir. İn vitro bitkilerinin gelişme özellikleri de dikkate alındığında 250 ve 500 ppm IBA dozlarının ahlat klonlarının mikro çeliklerinin in vitro köklendirilmesi için uygun olduğu belirlenmiştir.

Dimitrova and Nacheva (2021), sentetik büyümeyi düzenleyici maddeler yerine doğal bitki biyostimülatörü Charkar’ın OHxF 333’ün mikro çeliklerinin ex vitro koşullarda köklendirilmesinde kullanım potansiyelini araştırmışlardır. Çalışmada yer alan uygulamalar kontrol, toz olarak NAA (1 g/L) , toz olarak Charkar (0.5 ml/L), 3 veya 6 saat süreyle sıvı formda 0.5 ml/L Charkar uygulamalarıdır. Uygulamalardan sonra mikro çelikler 1:1 (v:v) oranında torf:perlit bulunan viyollere dikilmiş ve nem oranı %96’nın üzerinde olan bitki büyütme ünitesinde 16 saat aydınlık koşullarda 2 hafta süreyle tutulmuştur. Daha sonra ortam nemi aşamalı olarak %60’a düşür÷lmüştür. Doksan günün sonunda mikro çeliklerde yaşama oranı kontrol uygulamasında %31 olurken diğér tüm uygulamalarda %67’nin üzerinde kaydedilmiştir. Toz formda Charkar dışındaki uygulamalarda yaşama oranı %70 ile %86 arasında değışmiş ve uygulamalar arasında bu bakımdan istatistiksel anlamda önemli bir farklılık bulunmamıştır. Mikro çelik başına en yüksek ortalama kök sayısı, kök uzunluğu ve yaprak sayısı 1 g/L NAA uygulamasında elde edilmiştir. NAA veya Charkor ile yapılan uygulamalarda mikro çeliklerde çok sayıda küçük yan kökler ile daha kompakt bir kök sisteminin gelişimi uyarılmıştır. Araştırmacılar doğal biyostimülatör Charkor’un sentetik büyüme düzenleyicilere alternatif olarak mikro çeliklerin ex vitro köklendirme araştırmalarında kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Nadal vd. (2022), *P. communis* anaçlarının in vitro köklenmesinde sentetik oksinler yerine endofitik bakterilerin kullanımı konusunda yaptıkları çalışmada in vitro armut anaç kültürlerinde oksin üreten bakterilerin izolasyonu, tanımlanması ve seçimini gerçekleştirmişler ve seçilen mikroorganizmaların mikro çeliklerin köklenme ve aklimatizasyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, OH×F 87 ve Pyrodwarf armut anaçlarının in vitro kültürlerinde *Acinetobacter*, *Bacillus* ve *Buttiauxella* bakteri cinsleri baskın bulunmuştur. Araştırmacılar, mikroorganizmalarla bulaştırmanın armut mikro çeliklerinde sentetik oksin uygulamalarına benzer bir büyüme ve gelişme sağladığını ve bu uygulamanın in vitro kültürlerde kullanılan oksinlerin yerine geçebileceğini, bazı mikroorganizmaların özellikle dış koşullara alıştırma aşamasında bitkilerin hayatta kalma oranını artırdığını bildirmişlerdir.

2.2 Diğer Bitki Türlerinde Mikro Çeliklerde Köklendirme ve Dış Koşullara Alıştırma Çalışmaları

Welander (1983), M 26 (*Malus pumila* Mill.) elma anacının çiçek ve meyve veren olgun ve her yıl budanan genç gelişme safhasındaki bitkilerinde mikro sürgünlerin in vitro köklenmesi ve dış koşullara alıştırılması üzerine farklı uygulamaların etkilerini araştırmıştır. Araştırma konuları temel besin ortamları, IBA ve PG dozları, steroidler, karanlık uygulaması, besin ortamının pH'sı, Jiffy 9 torf ve torf+perlit karışımlarıdır. Çalışmada dört farklı köklendirme denemesi kurulmuştur. Birinci denemede farklı kombinasyonlarda IBA (5, 10, 15 μ M) (1, 2, 3 mg/L) ve PG (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} M) katılmış, makro elementleri $\frac{1}{2}$ kuvvetindeki modifiye MS besin ortamı kullanılmıştır. Bu denemede PG'siz IBA dozları arasında köklenme oranı bakımından önemli bir farklılık belirlenmemiştir. Bununla birlikte 5 μ M IBA'nın 10^{-4} ve 10^{-5} M PG ile oluşturduğu ve 15 μ M IBA'nın 10^{-4} M PG ile oluşturduğu kombinasyonlarda köklenme oranı artmış, ancak kallus gelişimi çok yüksek olduğundan bu bitkilerin dış koşullarda yaşama oranı düşmüştür. İkinci denemede kök oluşumunun uyarılması için mikro sürgünler 10 μ M (2 mg/L) IBA ve 10^{-4} M PG ilave edilmiş olan modifiye MS ortamına dikilmiştir. İlk 5 gün tamamen karanlıkta tutulan ya da tutulmayan kültürler bu sürenin sonunda IBA ve PG katılmamış besin ortamına taşınmış ve 24/22°C gündüz/gece sıcaklık değerlerine sahip 16 saat aydınlık koşullarda inkübe edilmiştir. Bu denemede sürgünlerin 5 gün karanlıkta tutulması köklenme oranını önemli düzeyde artırmıştır.

Karanlık uygulanan sürgünlerde köklenme oranı %79.8, uygulanmayanlarda %59.7 olarak kaydedilmiştir. Kallus gelişimi $10 \mu\text{M}$ IBA+ 10^{-4} M PG bulunan ortamda 5 gün karanlıkta bekletildikten sonra IBA içermeyen aynı ortama taşınan sürgünlerde yine belirgin olmuştur. Üçüncü denemede modife edilmiş MS besin ortamı ile LEP besin ortamı karşılaştırılmıştır. Besin ortamlarına $10 \mu\text{M}$ (2 mg/L) IBA eklenmiştir. Ortamlarda iki pH değeri 5.2 ve 6.0 test edilmiştir. İlk 5 gün karanlıkta tutulan kültürler daha sonra IBA içermeyen ortama transfer edilmiştir. Bu deneme kapsamında ayrıca köklenme üzerine D vitamininin analogları steroidlerin etkileri de incelenmiştir. Bu amaçla $10 \mu\text{M}$ (2 mg/L) IBA ilave edilmiş besin ortamında ilk 5 gün karanlıkta tutulan sürgünler daha sonra IBA içermeyen ancak PG (10 M^{-4}), ergocalciferol (10 M^{-5}) ya da dihydrotachysterol (10 M^{-5}) katılmış köklendirme ortamına taşınmıştır. Köklenmiş sürgünler dış koşullara alıştırılmak üzere 1:3 oranında perlit+torf karışımına dikilmiş ve üzeri plastik ile örtülmüştür. Yaşama oranları 4 hafta sonra gözlenmiştir. Bu denemede LEP ortamında, MS ortamına göre kallus gelişiminin daha az olduğu saptanmıştır. Özellikle pH değeri 6.0 olan LEP ortamında kallus geliştiren sürgün oranı %36'ya düşmüştür. Bu oran MS ortamı üzerinde %79-94 olarak belirlenmiştir. Ayrıca LEP ortamında köklenen sürgünlerde sürgün başına kök sayısı (5.5-6.2 adet) ve köklü sürgünlerin dış koşullara alışma oranları da (%83-84), MS ortamına (4.4-4.6 adet, %47-55) göre daha yüksek olmuştur. Denemede ergokalsiferol ve dihidrotakisterol steroidleri ile elde edilen sonuçlar tutarlı olmamış, test edilen konsantrasyonlarda fenolik bileşikler köklenme yüzdesini artırmamıştır. Dördüncü denemede sürgünler 0, 0.5, 1.25, 2.5, 5 veya $10 \mu\text{M}$ (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 veya 2 mg/L) dozlarında IBA ilave edilmiş LEP ortamında 5 gün karanlık koşullarda tutulmuştur. Daha sonra kültürler büyümeyi düzenleyici madde içermeyen besin ortamına transfer edilerek 16 saat aydınlık koşullarda inkübe edilmiştir. Köklenmiş sürgünler dış koşullara alıştırılmak üzere perlit+torf karışımına ya da Jiffy 9'a dikilmiştir. Jiffy 9'un deliğine girebilmesi için uzun kökler ~1 cm'den kısaltılmıştır. Bitkiler sera koşullarına alınmıştır. Bu denemede köklenme oranına ve kök sayısına göre M 26 elma anacında genç büyüme evresi için $1.25 \mu\text{M}$ (0.25 mg/L) ve olgun büyüme evresi için $0.5 \mu\text{M}$ (0.1 mg/L) IBA dozunun mikro sürgünlerin köklenmesi için uygun olduğu bildirilmiştir. Jiffy 9 üzerinde dış koşullara alıştırılan bitkiler perlit+torf karışımlarına göre daha iyi ve bir örnek gelişmiştir. Araştırmada yapılan anatomik incelemelerde karanlık koşullarda 5 gün IBA

uygulanmış sürgünlerde kök oluşumlarının başladığı belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra sürgünler doğrudan steril olmayan koşullara transfer edildiğinde %90 yaşama oranına sahip olmuştur. Böylece henüz kökleri gelişmemiş sürgünlerin kolaylıkla Jiffy 9'a dikilebildiği ve ayrıca bu yöntemle karanlık uygulamasından sonra sürgünlerin büyümeyi düzenleyici madde içermeyen köklendirme ortamında kültüre alınmasına gerek kalmadığı bildirilmiştir.

James (1983), çalışmasında M9 elma anacının in vitro adventif kök oluşumunda oksin duyarlı fazın uzunluğunun etkilerini araştırmıştır. Çalışmada PG (10^{-3} M) varlığında ya da yokluğunda oksin olarak IAA (2.8×10^{-5} M) ve IBA (1.5×10^{-5} M) kullanılmıştır. Çalışmada PG, IBA ile birlikte uygulandığında aydınlık koşullarda 2 gün sonra sinerjik etkinin görüldüğü ve köklenme oranının %60'ın üzerine çıktığı, oysa kök sayısı bakımından bu etkinin 4. günde (~11 adet) görüldüğü ve 8 günden sonra hızla azaldığı belirlenmiştir. Karanlık koşullarda PG ile IAA birlikte uygulandığında sinerjik etkinin sürekli artarak köklenme oranını 9. günde (%100) ve kök sayısını 6. günde (~8.5 adet) en yüksek düzeye ulaştırdığı ve etkinin 13. güne kadar devam ettiği belirlenmiştir. PG varlığında oksin duyarlı fazda sıvı kültürün kullanımında kök sayısı azalmıştır. Işığın etkisini belirleme kapsamında PG+IAA kombinasyonunda kültürleri 6 gün karanlıkta tutup daha sonra hormonsuz ortamda 35 gün aydınlık koşullarda tutma uygulamasında köklenme oranı %70 ve kök sayısı 9.5 ± 1.7 olarak belirlenmiştir. Oysa ışık uygulamasında bu değerler sırasıyla %35 ve 4.7 ± 0.8 olarak bildirilmiştir.

Hammerschlag vd. (1987), şeftali çeşitlerinin (*Prunus persica* L. Batsch) mikro sürgünlerinin köklendirilmesinde temel besin ortamı olarak 555.1 μ M myoinositol, 4.06 μ M nicotinic acid, 2.43 μ M pyridoxine HCl, 1.18 μ M thiamine HCl kapsayan ve mineral maddeleri $\frac{1}{2}$ kuvvetinde olan MS besin ortamını kullanmışlardır. Çalışmada bu ortama 58.4 mM (20 g/L) sakaroz ve %0.6 Phytagar ilave edilmiştir. Mikro sürgünler köklendirme denemelerinden önce temel besin ortamında 4°C'de karanlık koşullarda 35-40 gün inkübe edilmiştir. Köklendirme denemelerinde temel besin ortamına 2.9 μ M (0.5 mg/L), 5.8 μ M (1.0 mg/L) ve 28.5 μ M (5.0 mg/L) dozlarında IAA, IBA veya NAA katılmıştır. Bu ortamlara dikilen mikro sürgünler 2 hafta 26°C'de karanlık koşullarda ve sonraki 2 hafta 16 saat aydınlık koşullarda ($40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) tutulmuştur. Fenolik

köklendirme kofaktörlerinin ışıktaki köklenmeyi teşvik edip etmediğini test etmek için mikro sürgünler 28.5 μM IAA, 100 μM chlorogenic acid, PG, quercetin ya da rutin ile desteklenmiş temel besin ortamında 2 hafta ve temel besin ortamında 2 hafta olmak üzere aydınlık koşullarda tutulmuştur. Köklenen mikro sürgünler 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda 2 hafta inkübe edildikten sonra 1 hafta süreyle sera koşullarında mist sistemi altında kademeli olarak tam gün ışığına alıştırılmış ve devamında serada tutulmuştur. Çalışmada 28.5 μM IAA'da sadece %6 oranında köklenen Compact Redhaven ve Redhaven çeşitleri aynı dozda IBA'da %31 ve %27, NAA'da ise %36 ve %42 oranlarında köklenmiştir. Tüm çeşitlerde özellikle 2.9 μM (%48-100) ve 5.8 μM (%35-100) NAA içeren ortamlarda daha yüksek oranlarda köklenme sağlanmıştır. Nemaguard en yüksek köklenme oranına sahip şeftali genotipi olmuştur. Çeşitlerin çoğunda 2.9 ya da 5.8 μM NAA ile karşılaştırıldığında PG ile desteklenmiş IAA uygulaması köklenme oranlarını ve köklenen sürgünlerde kök sayısı artırmıştır. Bitkilerin dış koşullara alıştırılmasında kayıp yaşanmamıştır.

Marino (1988), çalışmasında vişne anacı CAB 11 E klonu (*P. cerasus*), S 749 x S 1490 hibrit anacı (*P. persica* x *P. kansuensis*) ve Abbe Fetel armut çeşidinin (*P. communis*) in vitro köklenmesi, bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması ve gelişmesi üzerine paclobutrazolün (PP333) etkilerini araştırmıştır. Köklendirme ortamı olarak mineral maddeleri ½ kuvvetinde olan MS ortamı esas alınmıştır. Bu ortama IBA (0 veya 0.2 mg/L) ve PP333 (0, 0.25 veya 0.5 mg/L) ilave edilmiştir. PP333, filtre ile sterilize edilmiş ve otoklavlanmış besin ortamına katılmıştır. Kültürler $22\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 16 saatlik aydınlık ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) koşullarında inkübe edilmiştir. Zor köklenen Abbe Fetel armudu ilk 1 hafta tamamen karanlık koşullarda tutulmuştur. Çalışma sonucunda köklenme için IBA'nın gerekli olduğu, 0.2 mg/L IBA ilavesi ile köklenme oranının S749xS1490 hibrit anacında %16.7'dan %57.6'ya, CAB II E klonunda %61.2'den %93.7'ye ve Abbe Fetel armut çeşidinde %0'dan %43.3'e yükseldiği belirlenmiştir. Bu armut çeşidinde 0.5 mg/L PP333 kullanımı ile köklenme oranı %73.3'e ulaşmıştır. Diğer genotiplerde PP333 ile köklenme oranında önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir. Çalışmada paclobutrazol içeren ortamlarda köklenmiş sürgünlerin çoğunluğunun kontrol uygulamasında olduğu gibi yüksek oranda dış koşullara alıştığı (%80) saptanmıştır.

Kunneman ve Albers (1992) çalışmalarında *Malus* genotiplerinin in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerinin köklenmesi ve dış koşullara alışması üzerine çoğaltma ortamında kullanılan makro element ve sakaroz düzeyleri ile köklenme ortamlarının etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar sürgün çoğaltma aşamasında MS ya da LEP besin ortamlarının makro elementlerini, MS ortamının mikro elementlerini esas almışlar ve bu ortamlara 100 mg/L myoinositol, 0.5 mg/L nicotinic acid, 1.0 mg/L thiamine-HCl, 0.5 mg/L pyridoxine-HCl ilave etmişlerdir. Çalışmada sürgün çoğaltma aşamasında Elstar elma çeşidi ve M 26 elma anacında besin ortamına 20, 25 veya 30 g/L sakaroz ilave edilmiştir. Köklendirme aşamasında LEP besin ortamının ½ kuvvetinde makro elementlerini, 1/1 kuvvetinde mikro elementlerini ve çoğaltma ortamının vitaminlerini esas almışlar, ortama 0.2 mg/L IBA ve 30 g/L sakaroz katmışlardır. R1 köklendirme ortamına ayrıca 100 mg/L proline ve 1 mg/L riboflavin ilave edilirken, R2 ortamına proline ve riboflavin katılmamıştır. Golden Delicious çeşidi ise sürgün çoğaltma aşamasında sadece MS ortamında kültüre alınmış ve bu ortama 20, 25, 30, 35 ve 40 g/L sakaroz ilave edilmiştir. Bu çeşitte köklendirme R1 ortamında gerçekleştirilmiştir. Köklendirme denemelerinde mikro çelikler ilk hafta tamamen karanlıkta bırakılmış ve daha sonra 20°C’de 16 saat aydınlık koşullarda ($70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) inkübe edilmiştir. Köklenen mikro çelikler fog sistemine sahip serada %95 nem koşullarında tutulmuştur. Çalışmada Elstar ve M 26 genotiplerinde en yüksek köklenme oranları, çoğaltma ortamında 30 g/L sakaroz içeren MS ortamından gelen mikro çeliklerde kaydedilmiştir. Bu ortam üzerinde köklenme Elstar çeşidinde %96.1 ve M26 anacında %93.3 olmuştur. Köklenme oranı üzerine R1 ve R2 köklendirme ortamlarının etkisi önemli olmamıştır. Kök sayısı MS çoğaltma ortamından gelen mikro çeliklerde, R1 köklendirme ortamında daha yüksek olarak belirlenmiştir. Kök sayısı M26 anacında 8.97 adet ve Elstar çeşidinde 8.78 adet olmuştur. Kök sayısı üzerine çoğaltma ortamındaki sakaroz dozunun etkisi olmamıştır. Dış koşullara alıştırma aşamasında da çoğaltma ortamına 30 g/L sakaroz ilavesi en iyi sonucu vermiş ve Elstar çeşidinde bitkilerin %79’u ve M 26 anacında %84’ü canlı kalmıştır. Golden Delicious çeşidinde mikro çeliklerin köklenme oranı üzerine çoğaltma ortamında kullanılan sakaroz dozu etkili olmamış ise de dış koşullara alıştırmada önemli düzeyde etkili olmuştur. En iyi sonuç 35 g/L sakarozdan elde edilmiş ve köklü sürgünlerin ~%95’i dış koşullara alışmıştır.

Van Telgen vd. (1992), otsu bir saksı bitkisi olan kalatya bitkisinin (*Calathea ornata*) ve elma genotiplerinin (*Malus*) in vitro çoğalma ve köklenme koşullarının ve rejenere olan ana ve yan köklerin sayısının, toprağa dikimden sonra bitkilerin yaşama oranı ve performansı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kalatya bitkisinde sürgün çoğaltımı, 1 mg/L BA ilave edilmiş ½ kuvvetindeki LS besin ortamı (Linsmaier ve Skoog 1965) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kùltürler 25°C’de 12 saat aydınlık koşullarda ($70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) inkübe edilmiştir. Elma genotipleri (Elstar, M9-COST ve M26) ise MS ya da LEP besin ortamlarının makro elementlerini, MS ortamının mikro elementlerini içeren besin ortamı üzerinde çoğaltılmıştır. Bu ortama 0.5 mg/L nicotinic acid, 1.0 mg/L thiamine-HCl, 0.5 mg/L pyridoxine-HCl ve 100 mg/L myo-inositol, 1.0 mg/L BA, 0.1 mg/L IBA, 20, 25 veya 30 g/L dozlarında sakaroz katılmıştır. Köklendirme ortamı 0.2 mg/L IBA ilave edilmiş olan makro ve mikro elementleri ½ kuvvetindeki LEP besin ortamıdır. Bu ortamda vitaminler ve sakaroz (30 g/L), çoğaltma ortamındaki gibi kullanılmıştır. Köklendirme ortamına ayrıca 100 mg/L proline ve 1 mg/L riboflavin ilave edilmiş ya da edilmemiştir. *Malus* genotipleri köklendirme ortamına dikildikten sonra 20°C’de ilk 7 gün karanlıkta ve daha sonra 16 saat aydınlık koşullarda ($70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) inkübe edilmiştir. Dış koşullara alıştırmak için kalatya bitkileri ticari saksı toprağına, *Malus* bitkileri ise torf:perlite karışımına dikilmiş, serada fog sistemi bulunan şeffaf plastik tünelde minimum 18°C, maksimum 35°C’de %96-100 nem koşullarında tutulmuştur. Prolin ve riboflavin içeren besin ortamı içerisinde köklendirilmiş M9 sürgünleri tünelde $800 \text{ mL}/\text{m}^3$ konsantrasyonda CO_2 bulunan atmosferde dış koşullara alıştırmıştır. Çalışmada kalatya sürgünlerinde köklenme kolay ve yüksek oranlarda gerçekleşmiştir. Sürgünler BA (1.0 mg/L), IBA (0.5 veya 1.0 mg/L) ya da IAA (0.5 veya 1.0 mg/L) ilave edilmiş köklendirme ortamlarında %75-100 oranlarında köklenmiştir. BA içeren ortamda köklenen sürgünlerde yan kökler meydana gelmediğı için dış koşullara alıştırma başarılı olmamıştır. Diğer uygulamalarda köklendirilen bitkilerde yan kök sayısı 7-11 adet arasında değişmiş ve dış koşullara başarıyla alışmıştır. *Malus* genotiplerinde köklenme LEP ortamına göre MS ortamı üzerinde ve 30 g/L sakarozda yüksek oranlarda gerçekleşmiştir. Bu ortamda köklendirilen mikro sürgünlerin dış koşullara alışması da daha yüksek oranlarda olmuştur. Bu ortamda Elstar elma çeşidinde köklenme oranı %92.8 ve sonrasında dış koşullarda canlılık oranı %75.2 olarak kaydedilmiştir. M26 elma anacında bu değerler %92.9 ve %83.4’dür.

Araştırmacılar toprağa dikimden sonra bitkilerin canlı kalma oranları ve performanslarının köklendirme ortamında meydana gelen kök sayısına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Köklenmiş ve köklenmemiş sürgünlerin dış koşullarda yaşama oranı ve bitki boyu CO₂ uygulamasıyla artırılmıştır.

Isutsa vd. (1994), Berkeley (*Vaccinium corymbosum* L.) ve Northsky (*V. angustifolium* × *corymbosum*) mavi yemiş çeşitlerinin ex vitro koşullarda köklendirilmesi ve kontrollü olarak dış koşullara alıştırılması yoluyla hızlı çoğaltımı konusunda bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada mikro çelikleri 4 torf:1 perlit (v/v) karışımına dikmişler ve 3.6×2.4×0.56 m boyutlarında bir fog odasında %94-%100 nem koşullarında 7 hafta süreyle inkübe etmişlerdir. Mikro çeliklerde ilk kök başlangıçları 7 günde ve tipik kök oluşumları 14 gün sonra meydana gelmiştir. Köklenme oranları özellikle 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda %100'e yakın düzeylerde gerçekleşmiştir. Yedi hafta sonra bitkiler serada şeffaf polietilen örtü ile 3.5×1.0×0.75 m boyutlarında oluşturulmuş fog tünelde 2 hafta ve daha sonra serada 7 haftadan uzun bir süre tutulmuştur. Çalışmada fog odasında 450 ve 1200 ppm seviyelerinde CO₂ uygulaması ve 18 saat süreyle 30±5, 50±10 veya 100±20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fotosentetik ışık yoğunlukları denenmiştir. Bitkicikler 100±20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda hızla büyüüp gelişirken daha düşük ışık yoğunluklarında büyüme ve gelişme yavaşlamış, 50±10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda CO₂ uygulaması büyüme ve gelişmeyi iyileştirmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar mavi yemiş mikro çeliklerinin başlangıçta 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 'nin üzerindeki ışık yoğunluklarını tolere edemediğini bildirmişler ve 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunu önermişlerdir. Fog tünele taşındığında bitkilerde büyüme ve gelişme yavaşlamış ancak, yüksek ışık yoğunluğundaki fog odasından gelen bitkilerde kök sistemleri, düşük ışık yoğunluklarında tutulmuş bitkilere göre 16. haftanın sonunda 15-30 kat daha büyük olmuştur. Bitkiler düşük ışık yoğunluğunda küçük kalsalar dahi yaşama oranları %97-%100 arasında belirlenmiştir. Yüksek ışık yoğunluğunda (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) gelişen bitkiler serada 6 haftada 30-60 cm boya ulaşmış ve bahçeye dikilebilecek düzeye gelmiştir.

Dimassi-Theriou (1995), GF-677 anacının (*P. amygdalus* x *P. persica*) mikro çeliklerin in vitro köklenmesi üzerine besin ortamının mineral madde konsantrasyonu ve kültür

tüplerinin kapatıldığı materyal tipinin etkilerini araştırdığı çalışmasında birbiri ardına iki deneme yapmıştır. İlk denemede MS (Murashige ve Skoog 1962) ve WPM (Lloyd ve McCown 1980) besin ortamlarının makro elementlerini x0.5, x1 ve x2 kuvvetlerinde ele almıştır. Besin ortamlarına 1 mg/L IBA ve 30 g/L sakaroz ilave etmiş, 6 g/L agar ile besin ortamlarını katılaştırmıştır. Kültür kaplarını CO₂ ve etilen birikimini azaltmak için alüminyum folyo ile kapatmıştır. İlk denemeden elde ettiği sonuçlara göre 2. denemede besin ortamı olarak makro elementleri x1 ve x2 kuvvetinde olan WPM ortamını esas almış ve tüpleri parafilm veya kauçuk ile kapatmıştır. Kültürler, 22±1°C ve 16 saat aydınlık (45 µmol·m⁻²·s⁻¹) koşullarda 4 hafta inkübe edilmiştir. Çalışmada GF-677 anacında köklenmenin besin ortamlarının makro elementlerinin konsantrasyonuna bağlı olduğu, makro element düzeyi normale göre iki kat artırılmış WPM ortamı ve yarıya indirilmiş MS ortamı üzerinde köklenme oranlarının yüksek olduğu (~%90), kök sayısını ve uzunluğunu artırdığı için genel olarak WPM ortamının köklenme üzerine MS ortamından daha etkili olduğu belirtilmiştir. Tüplerin kapatıldığı materyalin köklenmeyi etkilediği, kauçuk kaplamanın köklenme yüzdesi, sayısı ve taze kök ağırlığı açısından parafilmde daha üstün olduğu, ancak ortalama kök uzunluğunun parafilmde daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir.

Bolar vd. (1998), elma mikro sürgünlerinin in vitro köklendirilmesi ve bitkilerin dış koşullara alıştırılması için etkili bir yöntem üzerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar köklendirme ortamı olarak 1 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L myo-insitol, 3 mg/L IBA ve 20 g/L sakaroz ilave edilmiş ve 7 g/L agar ile katılaştırılmış olan mineral maddeleri 1/2 kuvvetindeki MS ortamını kullanmışlardır. Mikro sürgünler bu ortama dikildikten sonra 25±2°C sıcaklıktaki iklim dolabında 1 hafta süreyle karanlıkta tutulmuş ve daha sonra IBA içermeyen köklendirme ortamına taşınarak 16 saat aydınlık koşullarda (50-60 µmol·m⁻²·s⁻¹) 2-3 hafta inkübe edilmiştir. Kökler ~10-15 mm uzunluğu ulaştığında bitkiler in vitro koşullardan çıkartılmış ve Jiffy-7 tabletlere dikilmiştir. Dikimden önce 10 g biyolojik bitki koruyucu (*Trichoderma harzianum* Rifai strain KRL-AG2, T-22G granülü) ve 10 g 15 N-30 P-15 K gübresi bir litre su içerisinde karıştırılmış ve Jiffy-7 tabletler bu karışımla ıslatılmıştır. Bitkilerin dikili olduğu Jiffy-7 tabletler şeffaf plastik nem kubbesi (humidity dome) altına yerleştirilmiş ve iklim dolabında 16 saat aydınlık koşullarda 2-3 hafta inkübe edilmiştir. Daha sonra Jiffy-7 tabletler torf:perlit:vermikulit

(4:1:1) doldurulmuş plastik saksılara taşınmıştır. Saksıların üzerine şeffaf plastik torba geçirilmiş ve %70-80 nem içeren $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki iklim dolabında 16 saat aydınlık koşullara alınmıştır. Üç gün sonra ya da yeni yaprak gelişimleri başlayınca plastik torbanın köşesi 1 cm kesilmiş, 4 gün sonra da tamamen kaldırılmıştır. Haftalık aralıklarla gübreli su ile sulanan bitkiler sera koşullarına taşınmaya kadar iklim dolabında tutulmuştur. Araştırmacılar biyolojik bitki koruyucu ve gübre karışımı ile ısıtılmış Jiffy-7 tabletlerin bitkilerin canlılığını önemli düzeyde artırdığını bildirmişlerdir. Bu teknik ile in vitro sürgünlerin %70-100'ü sera koşullarında güçlü gelişen sağlıklı bitkilere dönüşmüştür.

Kooi vd. (1999), sentang ağacı (*Azadirachta excelsa* L.) mikro sürgünlerinin in vitro köklenmesi ve dış koşullara alıştırılması amacıyla 6 farklı deneme kurmuşlardır. Çalışmada eksplant olarak 15-25 cm uzunlukta, 5-7 yapraklı in vitro sürgünler kullanılmıştır. 1. denemede 1/1 ya da $\frac{1}{2}$ kuvvetindeki MS besin ortamına 0, 2, 4, 6, 8 veya 10 mg/L NAA ilave edilmiştir. 2. denemede IBA (0, 0.5, 1.0 veya 1.5 mg/L) + NAA (0, 0.5, 1.0 mg/L) kombinasyonları $\frac{1}{2}$ kuvvetindeki MS besin ortamına katılmıştır. 3. denemede $\frac{1}{2}$ kuvvetindeki MS ortamına 0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L IBA kombinasyonu eklenmiş ve denemede sıvı ortam, katılaştırıcı tipi, sakaroz dozu, PG ve aktif kömürün etkileri araştırılmıştır. 3. denemede besin ortamları L (15 g/L sakaroz içeren sıvı besin ortamı), G (5 g/L sakaroz içeren 2 g/L gelrite ile katılaştırılmış ortam), P (15 g/L sakaroz ve 162 mg/L PG ilave edilmiş ve 7 g/L Difco-bacto agar ile katılaştırılmış ortam), C (15 g/L sakaroz, 2.5 g/L aktif kömür ilave edilmiş ve 7 g/L Difco-bacto agar ile katılaştırılmış ortam), S (30 g/L sakaroz içeren ve 7 g/L Difco-bacto agar ile katılaştırılmış ortam) ortamları olarak kodlanmıştır. 4. denemede kültür paketinin köklenme üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu paket, dış boyutu 7.5x7.5x10.5 cm paslanmaz çerçeve olan 25 μM kalınlığındaki fluorocarbon polimer filminden yapılmıştır. Kültür paketine önce kuru sterilizatörde 150°C 'de 1 saat süreyle sterilize edilmiş 16'lık birleşik blok halinde cam yünü yerleştirilmiş ve paket 121°C 'de 35 dakika otoklavlanmıştır. Steril kültür paketine 100 ml steril sıvı besin ortamı (0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L IBA, 2.5 g/L aktif kömür bulunan ya da bulunmayan, 15 g/L sakaroz ilave edilmiş $\frac{1}{2}$ kuvvetindeki MS besin ortamı) uygulanmış ve her bir cam yünü bloğuna 1 mm çap, 10 mm derinlikte olacak şekilde 16 delik açılarak sürgünler

dikilmiştir. Araştırmada 1.-4. denemelerde kültürler $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat aydınlık koşullarda ($32 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) inkübe edilmiştir. 5. denemede sürgünler 2500 ppm IBA solüsyonuna (%55 etil alkol içinde) daldırılmış, su ile doygün duruma getirilmiş Jiffy şişen tabletlere dikilmiş ve gölgeleme ile ışığı geçirme oranı en az %60 oranında engellenmiş olan, mist sistemi 10 dakikada 6 saniye süreyle çalışan koşullarda 4 hafta boyunca tutulmuştur. 6. denemede bitkiciklerin dış koşullara alıştırılması için 1., 2., 3. ve 4. denemelerden elde edilmiş in vitro bitkicikler mantar enfeksiyonlarına karşı %0.1'lik Benlate solüsyonuna 1 dakika süreyle daldırılmış, daha sonra dikkatlice Jiffy tabletlere dikilmiş ve 5. denemede belirtilen koşullarda mist sistemi altında 5-7 gün süreyle tutulduktan sonra diğer 7 gün için %50 oranında gölgelenen koşullara taşınmıştır. Çalışmada, 1. denemede en yüksek köklenme oranı (%35) 4 mg/L NAA ilave edilmiş 1/1 kuvvetindeki MS ortamında belirlenmiştir. Yarı kuvvetteki MS ortamında köklenme meydana gelmemiştir. 2. denemede en iyi sonuç ½ kuvvetindeki MS ortamında 0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L IBA kombinasyonundan elde edilmiştir. Bu uygulamada köklenme oranı %55.5 olmuş, kök uzunluğu ve sayısı artmıştır. 3. denemede en yüksek köklenme oranı %68.4 ile C ortamında (0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L IBA, 2.5 g/L aktif kömür, 15 g/L sakaroz ilave edilmiş 7 g/L agar ile katılaştırılmış ½ kuvvetindeki MS) belirlenmiştir. 4. denemede köklenme oranı kültür paketinde aktif kömür bulunan sıvı ortam kullanıldığında %75'e ve aktif kömürsüz sıvı ortam kullanıldığında %100'e ulaşmıştır. Kökler kültür paketi denemesinde güçlü ve sağlıklı gelişmiş, ikincil ve üçüncül kökler meydana gelmiştir. 5. denemede köklenme meydana gelmemiştir. 6. denemede in vitro bitkicikler 4 haftada dış koşullara alışmış ve bu bitkilerin %80'i bahçe koşullarına adapte olmuştur. Sonuç olarak, bu çalışmada mikro sürgünler 0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L IBA ilave edilmiş ½ kuvvetindeki MS ortamı kullanılan kültür paketi yönteminde başarıyla köklenmiştir. İn vitro bitkiler 10 dakika aralıklarla 6 saniye su püskürten mist sistemi altında 5-7 gün ve sonraki 7 gün %50 gölge koşullarda tutulduğunda başarıyla dış koşullara alışmıştır.

Goncalves vd. (1999) çalışmalarında mikro çoğaltım yöntemiyle elde edilmiş kestane bitkilerinin (*Castanea sativa* x *C. crenata*) dış koşullara alıştırma sürecinde yaşama oranı ve gelişimi üzerine köklendirme koşullarının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada sürgün çoğaltma aşamasından gelen mikro sürgünler köklendirme denemelerinden önce

makro element düzeyi $\frac{1}{2}$ kuvvetinde olan MS ortamında 4 hafta kültüre alınmıştır. Bu aşamada ve köklendirme denemelerinde kültürler 25°C gündüz ve 20°C gece sıcaklıkları ile 16 saat aydınlık koşullarda ($45 \pm 5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inkübe edilmiştir. Köklendirme için temel besin ortamı olarak 1 mg/L düzeyinde thiamine, pyridoxine, pantothenic acid, ascorbic acid, nicotinic acid ve 100 mg/L inositol ilave edilmiş, nitratlar dışındaki makro elementleri $\frac{1}{2}$, nitratları ise $\frac{1}{4}$ kuvvetinde olan MS besin ortamı kullanılmıştır. Bu ortama sakaroz 30 g/L ve agar 7 g/L katılmıştır. Kök uyarımı için temel besin ortamına 3 mg/L IBA ilave edilmiş ve mikro sürgünler bu ortam üzerinde 5 gün tutulmuştur. Mikro sürgünlerde kök gelişimi ise in vitro ya da ex vitro koşullarda sağlanmıştır. İn vitro koşullarda kök gelişimi için kök uyarma ortamından gelen mikro sürgünler oksin bulunmayan, 6 g/L aktif kömür katılmış temel besin ortamına taşınmıştır. Ex vitro köklenme denemesinde ise mikro çelikler %70 düzeyinde nemlendirilmiş 10 litre steril torf:perlit (1:2) (v/v) karışımının bulunduğu 60x40x20 cm boyutlarında strafor kutulara dikilmiştir. Kutuların üzeri şeffaf akrilik plastik örtü ile kapatılmış ve yukarıda tanımlanan kültür koşullarında 4 hafta süreyle tutulmuştur. Mikro sürgünlere her gün su püskürtülmüştür. İn vitro ve ex vitro koşullarda köklendirilmiş mikro sürgünler torf:perlit (1:2) (v/v) karışımının bulunduğu plastik saksılara dikilmiş, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık ($250 \pm 10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), nemi ultrasonik fog sistemi ile sağlanan kontrollü kabinlere taşınmıştır. Kabinlerin nispi nem düzeyi 4 haftada tedrici olarak %95'den oda koşullarına düşürülmüştür. Çalışmanın sonunda köklendirme koşullarının bitkilerin dış koşullara alıştırılmasında önemli bir faktör olduğu, ex vitro koşullarda köklendirilen mikro sürgünlerin dış koşullara alıştırma sürecinin sonunda yaşama oranının %100, in vitro koşullarda köklendirilenlerin ise %50 olduğu bildirilmiştir. Ex vitro koşullarda köklendirilen bitkiler dış koşullara alıştırma aşamasının sonunda daha iyi gelişme göstermiş, yaprak kuru ağırlığı 634.8 mg ve kök kuru ağırlığı 127.2 mg olarak kaydedilmiştir. Bu değerler in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro sürgünlerde sırasıyla 225.3 mg ve 45.6 mg olmuştur. Araştırmacılar mikro sürgünlerin strafor kutularda ex vitro koşullarda köklendirilmesi ile kestande mikro çoğaltım maliyetinin azaltılacağını öne sürmüşlerdir.

Roussos ve Pontikis (2002), Koroneiki zeytin çeşidinin (*Olea europaea* L.) mikro çoğaltımında mikro sürgünlerin köklendirilmesinde 20 g/L sakaroz ilave edilmiş WPM temel besin ortamını kullanmışlardır. Bu çeşitte 100 mg/L IBA veya NAA'ın tek başına ya da kombinasyon halinde temel besin ortamına katılmasının veya eksplantların dip kısmının oksin solüsyonlarına kısa süre daldırılmasının köklenmeyi uyarmadığı belirtilerek iki aşamalı bir köklenme denemesi uygulanmıştır. İlk aşamada sürgünlerin dip kısımlarına uzunlamasına iki adet kısa kesim yapılmış ve 1 mL sıvı ortam içerisinde 1 hafta karanlıkta inkübe edilmiştir. Sıvı ortama, IBA ya da NAA (1, 2 veya 4 mg/L) tek olarak veya IBA+NAA kombinasyonları halinde (1+1, 2+2 veya 4+4 mg/L) katılmıştır. İkinci aşamada mikro sürgünler sıvı ortamdan alınarak büyüme düzenleyici madde içermeyen katılaştırılmış temel besin ortamına taşınmış ve yüzeyi küçük bir perlit tabakasıyla kaplanmıştır. Kùltürler 5 hafta 16 saat aydınlık koşullarda tutulmuştur. Köklendirme çalışmalarında ayrıca *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* bakterisinin neden olduğu zeytin dal kanseri düğümlerinin ham özütü filtreden geçirilmiş ve 50 mg/L konsantrasyonunda oksin ile birlikte besin ortamına ilave edilmiştir. Bunun dışında mikro sürgünlerin dip kısmı 5 saniye süreyle doğrudan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* bakteri süspansiyonuna daldırılmış ve daha sonra oksin içeren ya da içermeyen sıvı ortamda 1 hafta karanlıkta ve daha sonra 5 hafta katılaştırılmış temel besin ortamında tutulmuştur. Dış koşullara alıştırma çalışmalarında ise köklenmiş mikro sürgünler steril torf+perlit (2:1) karışımının doldurulduğu saksılara dikilmiş ve 1 ay boyunca sera koşullarında mist sistemi altına alınarak aklimatizasyon için ışık yoğunluğu azaltılmıştır. Çalışmada oksin uygulamalarında en yüksek köklenme oranı %76 ile 1 mg/L IBA+1 mg/L NAA kombinasyonundan elde edilmiştir. Bu kombinasyonun 50 mg/L özüt ile birlikte uygulanması ile köklenme oranı %87'ye ulaşmıştır. Eksplantların *Pseudomonas* bakterisi ile yapay enfeksiyonu ise oksinlerin varlığında bile kök oluşumunu engellemiştir. Çalışmada köklenmiş sürgünler mist sistemi altında başarıyla dış koşullara alışmış ve yaşama oranları %76 olarak bildirilmiştir.

Mencuccini (2003) çalışmasında zeytin (*O. europaea* L.) çeşitlerinin in vitro köklenme kapasitesi ve mevsimlere göre köklenme durumu üzerine karartma uygulamalarının etkisini araştırmıştır. Frantoio, Dolce Agogia ve Moraiolo çeşitlerinde yürütülen

denemelerde köklendirme ortamı olarak 5 μ M (1 mg/L) NAA ilave edilmiş MS besin ortamı kullanılmıştır. Karartma amacıyla besin ortamına 0, 10, 100 veya 200 mg/L parlak siyah gıda boyası (Sigma) katılmıştır. Siyah boya ile besin ortamının karartılması uygulamalarının karşılaştırması için kültür kaplarının dışının siyaha boyandığı ve besin ortamının yüzeyinin steril siyah polikarbonat granüllerle kaplandığı kontrol uygulaması da çalışmada yer almıştır. Çalışmada zeytin çeşitlerinin mikro sürgünleri Ocak, Mayıs ve Eylül periyodunda köklendirilmiştir. Ocak periyodunda karanlık uygulaması yapılmayan 0 mg/L boya uygulamasında çeşitlerin ortalaması olarak köklenme oranı %20 olurken bu oran 10, 100, 200 mg/L boya uygulamaları ve kontrolde sırasıyla %30.7, %88, %86.7 ve %81.3 olarak belirlenmiştir. Kök sayısı 0, 10, 100, 200 mg/L boya ve kontrol uygulamalarında 0.9, 1.5, 4.4, 4.9 ve 4.5 adet, kök uzunluğu 1.5, 1.5, 3.8, 3.2 ve 2.9 mm olarak kaydedilmiştir. Ocak periyodu değerleri karanlık uygulamaları ile önemli düzeyde yükselmiştir. Bu etki hafif de olsa Mayıs ve Eylül'de de gözlenmiştir. Köklendirme periyodu ve çeşitlerden bağımsız olarak çalışmada 100 ve 200 mg/L boya ile karartma uygulaması ile köklenme oranları %100'e ulaşmıştır.

Grigoriadou vd. (2003), Chondrolia Chalkidikis Yunan zeytin çeşidinde (*O. europaea sativa* L.) mikro sürgünlerin in vitro ve ex vitro köklenmesi üzerine besin ortamının etkilerini araştırmışlardır. İn vitro köklenme denmesinde mikro sürgünler 0-12 μ M (0-2 mg/L) IBA veya NAA ya da bunların kombinasyonlarının ilave edildiği WPM ortamına dikilmiştir. Ayrıca uygun oksin uygulamalarında besin ortamına katılan 30 μ M putrescine ve 1 mM fosforik asidin köklenme üzerine etkileri de belirlenmiştir. İn vitro koşullarda köklendirilen mikro sürgünler torf: perlit (4:1) (v:v) karışımına dikilmiş, fog sistemi bulunan %90 nispi neme sahip sera koşullarında %50 gölgeleme altında 10 gün tutulmuştur. Sonraki 10 gün boyunca sera nemi günde %5 oranında azalmış, ışık seviyesi kademeli olarak artırılmıştır. Ex vitro köklendirme denemesinde ise mikro sürgünlerin dip kısımları 5 saniye süreyle 2 g/L IBA solüsyonuna daldırılmış, torf:perlit (1:1) (v:v) karışımına dikilmiş ve %90 nisbi neme sahip sera koşullarına taşınmıştır. İn vitro köklendirme denemelerinde 30 günlük sürenin sonunda 12 μ M IBA+3 μ M NAA uygulamasında mikro sürgünlerin %70'ı kök oluşturmuştur. Sürgün başına ortalama kök sayısı 2.3 adet ve kök uzunluğu 2.3 cm olmuştur. Bu ortama 30 μ M putrescine ilavesiyle köklenme oranı %93 olarak kaydedilmiştir. 12 μ M IBA+3 μ M NAA+1 mM

fosforik asit ve 12 μM IBA+3 μM NAA+1 mM fosforik asit+30 μM putrescine uygulamalarında ise köklenme oranı %85 olmuştur. İki aylık dış koşullara alıştırma sürecinde in vitro koşullarda köklendirilmiş bitkilerin %90'ı dış koşullara alışmıştır. Ex vitro köklendirme denemelerinde mikro sürgünlerde köklenme meydana gelmemiştir.

Custodio vd. (2004) çalışmalarında keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) mikro çeliklerinin in vitro köklenmesi ve aklimatizasyonu üzerine köklenme ortamına ilave edilen şekerlerin etkisini araştırmışlardır. Yarı kuvvetli MS temel besin ortamına sakaroz (58, 87, 116 veya 145 mM), glikoz (58, 116 veya 145 Mm), fruktoz (116 mM), sorbitol (116 mM) ya da filtreden geçirilerek sterilize edilmiş fruktoz (116 mM), ikili kombinasyonlar halinde 58 mM glikoz+58 Mm fruktoz veya 58 Mm glikoz+58 Mm manitol katılmıştır. Mikro çelikler köklendirme ortamına dikilmeden önce dip kısımları 4.9 mM (1000 ppm) IBA'ya 3 dakika süreyle daldırılmıştır. Kültürler 1 hafta karanlık ve 3 hafta 16 saat aydınlık ($60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) koşullarda tutulmuştur. Dış koşullara alıştırma denemelerinde en az üç köke sahip bitkicikler önce bir fungusit solüsyonuna (Benomyl®, $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) 1 dakika batırılmış ve daha sonra torf:vermikulit (3:1) (v/v) karışımı bulunan saksılara dikilmiştir. Saksılar, %90-95 nispi nem ve $25\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklığa sahip olan 16 saat foto periyodun ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) uygulandığı iklim kabininde 4 hafta bekletilmiştir. Sonraki 4 haftada ortam nemi kademeli olarak %65'e düşürülmüştür. Daha sonra bitkiler sera koşullarına taşınmıştır. Sera koşullarında iki hafta aralıklarla bitkiler 1/10 kuvvetindeki MS makro besin solüsyonu ile sulanmıştır. Çalışmada en yüksek köklenme oranı %90 ile 145 mM (50 g/L) sakaroz içeren köklendirme ortamında belirlenmiştir. Bu ortamda kök sayısı 14 adet/sürgün ve en uzun kök uzunluğu 5.0 cm olarak kaydedilmiştir. Köklenme sürecinde farklı şeker uygulamaları bitkilerin dış koşullara alışma ve gelişimini az etkilemiştir. Köklenme ortamında glikoz konsantrasyonunun azalması bitkilerin aklimatizasyonu için yararlı olmuştur. Çalışmada, köklenme ortamında 87 mM (30 g/L) sakaroz, 145 mM (26 g/L) glikoz veya 58 mM (10.4 g/L) glikoz+fruktoz kullanılan uygulamalardan gelen bitkilerin aklimatizasyon oranları sırasıyla %63, %42 ve %50 olarak denemenin en düşük değerlerini oluşturmuştur. Diğer tüm şeker uygulamalarından gelen bitkilerde dış koşullara alışma oranları %81-100 arasında kaydedilmiştir.

Nas ve Read (2004), myo-inositol ve bakır sülfatın çeşitli kombinasyonlarını içeren NRM (Nas and Read Medium) besin ortamından (Nas ve Read 2004) gelen mikro sürgünlerin in vitro ve ex vitro köklenmesi ve köklenmiş sürgünlerin dış koşullara alıştırılması konusunda yaptıkları çalışmayı 4 hibrit fındık genotipi üzerinde yürütmüşlerdir. İn vitro köklendirme denemelerinde mikro sürgünlerin dip kısımları 1000 ppm IBA solüsyonuna 5 veya 10 saniye süreyle daldırılmış ve büyüme düzenleyici madde içermeyen bakır sülfat ve myo-inositol düzeyi 0.025 mg/L+100 mg/L olan NRM ortamına dikilmiştir. Uygulamadan 8-15 gün sonra köklenen mikro çelikler, steril olmayan suyla doygun hale getirilmiş olan Jiffy tabletlere dikilmiş ve içerisinde az miktarda su bulunan plastik kaplara alınarak 22-26°C sıcaklıktaki, nem düzeyi kontrolsüz olan ve gölgeleme ile ışık yoğunluğu $125-145 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ olarak ayarlanan 16 saat aydınlık koşullara sahip seraya taşınmıştır. Kökler Jiffy tabletlere dışına çıktığında ya da tabletlere dikimden 7 gün sonra bitkiler Jiffy tabletlilerle birlikte %60 torf ve %40 perlit karışımının bulunduğu saksılara dikilmiş ve bir hafta süreyle üzerleri şeffaf plastik ile kapatılmıştır. Saksıların üzerindeki gölgeleme ve plastik örtü dördüncü haftada tamamen kaldırılmış ve bitkiler $300-420 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda 15-16 saat aydınlık standart sera koşullarında geliştirilmiştir. Ex vitro denemelerde ise mikro sürgünlerin dip kısmı 1000 ppm IBA solüsyonuna 10 saniye süreyle daldırılmış, torf tüplere dikilmiş ve az miktarda su bulunan plastik kaplara alınarak özellikleri daha önce belirtilen sera koşullarına transfer edilmiştir. Çalışmada IBA uygulamasından 8.2-9.5 gün sonra sürgünlerin %50'den fazlası köklenmiş, 15 gün sonra sürgünlerde 12 adet kök meydana gelmiştir. NRM ortamının bakır sülfat ve myo-inositol düzeyi 0.025 mg/L+100 mg/L olan C1M1, 1.28 mg/L+200 mg/L olan C2M2, 2.55 mg/L+400 mg/L olan C3M3 ve 5.1 mg/L+800 mg/L olan C4M4 kombinasyonlarından gelen sürgünlerin in vitro köklenme oranları, aralarında önemli bir farklılık bulunmadan sırasıyla %98, %97, %95 ve %93 olmuştur. IBA solüsyonuna 5 veya 10 saniye süreyle daldırma işleminden sonra büyümeyi düzenleyici madde içermeyen ortama dikilen sürgünlerde 15 gün sonra in vitro köklenme oranları yine benzer değerlerde %97 ve %95 olarak kaydedilmiştir. Genotiplerde köklenme oranları %88-98 arasında değişmiştir. İn vitro koşullarda köklendirildikten 3 ay sonra bitkilerin dış koşullarda yaşama oranları IBA'nın 5 saniye uygulamasında %66 ve 10 saniye uygulamasında %73 olmuştur. Ex vitro koşullarda 10 saniye IBA uygulanmış sürgünlerin köklenme ve dış koşullarda

yaşama oranı %97 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar, in vitro köklendirme ile karşılaştırıldığında ex vitro köklendirme ve dış koşullara alıştırmada daha yüksek canlılık oranları elde edildiğini ve daha az zaman harcadığını bildirmişlerdir.

Vahdati vd. (2004) ceviz çeşitlerinin (*Juglans regia*) in vitro koşullarda köklendirilmesinde iki fazlı işlem uygulamışlardır. Kök oluşumu fazında mikro sürgünler in vitro koşullarda 15 μ M (3.0 mg/L) IBA ilave edilmiş MS ortamında karanlık koşullarda 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu fazda besin ortamına 10, 20, 30, 40 ya da 60 g/L dozlarda ilave edilen sakarozun, 1.8-2.5, 3-4.5 ve 5-6.5 cm mikro sürgün uzunluğunun, 22°C ve 30°C inkübasyon sıcaklığının, 2, 4, 6, 8 veya 10 günlük inkübasyon süresinin, alt kültürlerde sürgün çoğaltma aşamasında DKW besin ortamının NH_4NO_3 konsantrasyonunun (0, 708, standart doz 1416 ya da 2932 mg/L) kök oluşumuna etkileri araştırılmıştır. Kök gelişimi fazında mikro sürgünler in vitro koşullarda 2.4 g/L Phytigel ve 30 g/L sakaroz içeren $\frac{1}{4}$ kuvvetinde DKW besin ortamı ve vermikulit (1:1.25) (v/v) karışımında 16 saat aydınlık koşullarda tutulmuştur. Bu ortamda 28 günün sonunda köklenen mikro sürgünler 2.15 kg/m³ oyster lime ilave edilmiş köknar ağacı kabuğu, torf ve volkanik kaya karışımının (hacim olarak 3:1:1) bulunduğu saksılara dikilmiş ve plastik örtü altında nemlendirici ile sağlanan yüksek nem koşullarındaki seraya taşınmıştır. Saksılar 14-21 günlük periyotda kademeli olarak normal ortam nemine alıştırılmıştır. Aklimatizasyon sürecinde ceviz bitkilerinin gelişimi herhangi bir stresin etkisiyle kolayca durabilmekte ve sonrasında bitkilerde rozetleşme meydana gelebilmektedir. Bu nedenle tomurcukların uyanması ve gövde uzaması için 12.5 ml/L veya 25 ml/L Promalin (%1.8 GA_{4/7} ve %1.8 BA, w:w) ya da 25 mg/L GA₃ tepe tomurcuğu ve yapraklara püskürtülmüş ve 28 gün sonra yeni yaprak sayısı ve sürgün gelişimi belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda sürgün boyutunun köklenmeyi etkilemediği fakat canlılığı etkileyebileceği, kök oluşturma fazında tam NH_4NO_3 konsantrasyonu (1416 mg/L) içeren DKW ortamı üzerinde gelişen sürgünlerin, 40 g/L sakaroz ilave edilmiş ortamın, 6-8 gün süreyle 22°C sıcaklıkta inkübasyonun kullanımının uygun olduğu saptanmıştır. Aklimatizasyonda 25 ml/L Promalin uygulaması apikal tomurcuğun gelişimini ve uzamasını iyileştirmiştir.

Fotopoulos ve Sotiropoulos (2005) çalışmalarında şeftali x badem hibridi PR204/48 anacının (*P. persica* x *P. amygdalus*) mikro sürgünlerinin in vitro köklenmesi üzerine mineral maddeleri 1/1 ve 1/2 kuvvetinde olan (demir dışında) MS ortamının, IBA dozlarının ve karanlık uygulamasının etkilerini araştırmıştır. MS ortamının mineral madde konsantrasyonunun etkisinin incelendiği denemede 0, 2.5, 5 ve 10 µM (0, 0.5, 1.0 ve 2 mg/L) IBA dozları esas alınmıştır. Karanlık uygulamasının etkisinin araştırıldığı diğer denemede tam kuvvetteki MS ortamı ve 0, 1, 2.5, 5 ve 10 µM IBA dozları kullanılmış, kültürler 12 gün süreyle karanlık koşullarda tutulmuş ve 12 gün standart koşullara (22±1°C ve 16 aydınlık) transfer edilmiştir. Çalışmada en yüksek köklenme oranı (%100), 5 ve 10 µM IBA ilave edilmiş tam kuvvetli MS ile 2.5, 5 ve 10 µM IBA içeren 1/2 MS ortamında kaydedilmiştir. MS ortamının mineral madde konsantrasyonu normal değerın yarısına düşürüldüğünde köklenme önemli düzeyde artmıştır. 10 µM IBA katılmış 1/2 MS ortamında kök sayısı 14.5 adet, kök uzunluğu 9.2 mm, yaş kök ağırlığı 2147 mg ve kuru kök ağırlığı 228 mg olmuştur. Kültürlerin 24 gün süreyle 16 saat aydınlık koşullarda tutulmasıyla en yüksek köklenme oranı (%90), 5 µM ve 10 µM IBA uygulamalarında belirlenmiştir. Bu uygulamalarda kök sayısı sırasıyla 8.0 ve 15.2 adet/sürgün, kök uzunluğu ise 14.5 mm ve 9.6 mm olmuştur. Mikro çeliklerin 12 gün karanlık koşullarda ve 12 gün 16 saat aydınlık koşullarda tutulduğu denemede ise en yüksek köklenme oranı %90 ile 1 µM ve 2.5 µM IBA uygulamasında saptanmıştır. Bu uygulamalarda kök sayısı 7.2 ve 10.1 adet/sürgün, kök uzunluğu 12.6 mm ve 9.7 mm olarak ölçülmüştür.

Caboni ve Damiano (2005), zor köklenen Sorrento ceviz çeşidinin (*J. regia* L.) mikro çeliklerinin in vitro köklenmesi üzerine temel besin ortamı ve makro element konsantrasyonu, oksin tipi ve dozu, karanlık uygulaması, kök uyarımından sonra hormonsuz ortama taşıma, köklenme ortamında agarın bulunması, mikro çeliklerin dip kısımlarını *Agrobacterium rhizogenes* bakterisinin yabani tipi ile bulaştırma faktörlerin etkilerini araştırmışlardır. Denemede temel besin ortamı olanak MS ya da DKW ortamları, oksin olarak IAA (10 µM), IBA (10 ya da 20 µM), NAA (10 µM) kullanılmış, IBA'nın uygulama süresi (0, 12, 16 veya 20 gün), mikro çeliklerin oksin uygulamasından sonra büyüme düzenleyici içermeyen bir besin ortamına transfer edilmesi, mikro çeliklerin sıvı ya da katılaştırılmış, 10 µM IBA katılmış, mineral

maddeleri tam ya da ½ kuvvetindeki DKW ortamı üzerinde 12 gün karanlıkta tutulması ve 10 gün sonra oksin içermeyen ortama transfer edilmesi, mikro çeliklerin alt kısımlarının *A. rhizogenes* (wild type 1855NCPB) süspansiyonuna 24 saat daldırılması, daha sonra 24 saat boyunca 10 µM IAA ya da IBA ilave edilmiş katı DKW ortamına ve ardından cefotaxime içeren taze besin ortamına transferi ve 12 gün karanlıkta tutulup daha sonra aydınlığa alınması işlemlerinin etkileri araştırılmıştır. Çalışmada köklenme üzerine DKW ortamı, MS ortamına göre daha etkili olmuştur. Özellikle agar ile katılaştırılmış ½ kuvvetindeki DKW ortamı üzerinde en yüksek köklenme oranı (%58) ve kök sayısı (3.3 adet) belirlenmiştir. Oksinler arasında sadece IBA köklenmede sonuç vermiş, NAA kallus oluşumuna neden olmuştur. *A. rhizogenes* ile lokalize enfeksiyonda yüksek köklenme oranı (%60) elde edilmiştir. Bakteri uygulaması sonrasında oluşmuş köklerin aynı bitki üzerindeki genetik yapısı normal (transgenik olmayan), tamamen transgenik, kimerik ya da transgenik olarak belirlenmiştir.

Kolozsvari Nagy ve Sule (2006) çalışmalarında Pinova elma çeşidinin (*M. domestica*) in vitro köklenmesi üzerine IBA dozlarının ve ortam tipinin etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar mikro sürgünlere başlangıçta 28°C’de karanlık koşullarda 4 günlük bir ön uygulama yapmışlardır. Ön uygulamalarda köklendirme ortamı olarak 0, 1, 2 veya 3 mg/L IBA ve 20 g/L sakaroz ilave edilmiş, makro ve mikro elementleri ½ kuvvetinde olan MS ve Gamborg’s vitaminlerinden oluşan sıvı ya da agar (7 g/L) ile katılaştırılmış besin ortamını kullanmışlardır. Ön uygulamadan sonra mikro sürgünler aynı içerikli ancak oksin bulunmayan, agar ile katılaştırılmış ya da vermikulit ile desteklenmiş besin ortamını kök uzatma ortamı olarak esas almışlardır. Vermikulit, sıvı ortam ile ıslatılmış ya da 4 g/L dozda agar ile birlikte (4 ml ortam/5 ml vermikulit) kullanılmıştır. Kültürler 24°C’de 16 saat aydınlık koşullarda tutulmuştur. Çalışmada en yüksek köklenme oranı (%73), ön uygulaması IBA içermeyen (0 mg/L IBA) sıvı besin ortamında yapılmış ve daha sonra vermikulit ile desteklenmiş sürgün uzatma ortamına taşınmış sürgünlerde belirlenmiştir. Ön uygulaması 1 mg/L IBA içeren sıvı ya da agar ile katılaştırılmış besin ortamında yapıldıktan sonra sürgün uzatma aşamasında agar ile katılaştırılmış ortama alınan sürgünlerde köklenme oranı %66.7, vermikulit ile desteklenmiş ortama taşınanlarda %60 olarak kaydedilmiştir. Ön uygulamada IBA dozunun yükselmesi ile

birlikte köklenme oranları azalmıştır. Vermikulit ile desteklenmiş ortamlara dikilen sürgünlerde kök sayısı (2.4-4.7 adet), agar ile katılaştırılmış ortamlara dikilenlerden (1.4-2.2 adet) önemli düzeyde daha yüksek olmuştur. Bununla birlikte kök uzunlukları agar ile katılaştırılmış ortamlarda (12.9-29.3 mm), vermikulit ortamdan (6.2-8.8 mm) daha fazla olmuştur. Vermikulit ile desteklenmiş ortamda çok sayıda kökün dallandığı, sert ve kahverengi bir görünüm sergilediği belirlenmiştir. Araştırmacılar hormonsuz bir ön uygulamayı takiben vermikulit ile desteklenmiş besin ortamının elmanın köklenmesini teşvik ettiği sonucuna varmışlardır.

De Lima vd. (2006) çalışmalarında süs bitkisi olarak kullanılmakta olan *Anthurium andraeanum* türüne (antoryum, flamingo çiçeği) dâhil Eidibel çeşidinin in vitro koşullarda köklendirilmiş bitkilerinin dış koşullara alıştırılmasında arbuscular mycorrhizal funguslarının (AMF) etkilerini araştırmışlardır. Denemede kökleri yaklaşık 2.0 cm olan üç yapraklı bitkiler seçilmiş ve dikim 200 mL plastik saksılara yapılmıştır. Bitki yetiştirme ortamı olarak 1:1 oranında kum ve vermikulit karışımı hazırlanmış ve 121°C'de 1 saat sterilizasyona tabi tutulmuştur. Uygulamalar, M0 = kontrol (inokülasyon yapılmamış), M1 = *Gigaspora albida*, *Glomus etunicatum* ve *Acaulospora longula* karışımı ile inokülasyon, M2 = *G. albida*, M3 = *G. etunicatum*, M4 = *A. longula* ile inokülasyondur. Her bitki için 300 spor kullanılmıştır. M1 uygulamasında her fungus türünden 100 spor alınmıştır. Fosfor 0.31 mg/L olarak ortamda bulunduğu için fosfor dışında tam Hoagland besin solüsyonu yetiştirme ortamına uygulanmıştır. Aklimatizasyonun 180. gününde bitkilerde yaprak sayısı, sürgün ve kök yaş ve taze ağırlıkları, su kapsamı ve fosfor konsantrasyonu belirlenmiştir. Dikimden 60 gün sonra bitkiler dış koşullara alışmıştır. AMF uygulamaları özellikle çoklu spor karışımlarında (M1) su ve fosfor alımını iyileştirmiş, bitki büyüme ve gelişimini olumlu yönde etkilemiştir.

Modgil vd. (2010), EMLA111 elma anacının mikro sürgünlerinin in vitro köklenmesi üzerine IBA ve NAA'nın, sıvı ve katılaştırılmış besin ortamlarının, ışık ve karanlık koşulların ve PG uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada dört köklendirme denemesi kurulmuştur. 1. denemede mikro sürgünler 0.3, 0.5, 0.7 veya 1.0 mg/L IBA ya da 0.1, 0.25 veya 0.5 mg/L NAA ve %2 sakaroz ilave edilmiş ½ kuvvetindeki MS besin

ortamında köklendirilmiş, bir veya iki aşamalı olarak yapılmıştır. 2. denemede mikro çelikler 50-200 mg/L IBA solüsyonuna 30 dakika veya 3 saat daldırılmış ve daha sonra temel besin ortamına taşınmıştır. 3. denemede mikro çelikler 0.1-0.4 mg/L IBA ve 100 mg/L PG içeren veya içermeyen ½ MS besin ortamına dikilmiş ve 1 hafta karanlık koşullarda tutulmuştur. Mikro çeliklerin yarısı oksin içermeyen sıvı ortama transfer edilmiştir. 4. denemede, bir önceki denemede olduğu gibi kültüre alınan mikro sürgünler ışık altında inkübe edilmiştir. Köklenen mikro sürgünlerin dış koşullara alıştırılması safhasında ortam olarak biyolojik bitki koruyucu *Trichoderma viridae* ile ıslatılmış kokopit-torf kullanılmıştır. Alıştırma, 20-22°C sıcaklığa sahip mist ve fan-ped sistemi bulunan sera koşullarında gerçekleştirilmiştir. Dış koşullara alışan bitkiler toprak, kum ve çiftlik gübresi karışımı doldurulmuş saksılara ya da doğrudan bahçeye dikilmiştir. Çalışmanın sonunda IBA ve NAA'nın köklenme üzerine olumlu etki yaptığı ve bir aşamalı yöntemde en yüksek köklenme oranlarının 0.3 mg/L IBA (%75) ve 0.1 mg/L NAA (%71) uygulamalarından elde edildiği belirtilmiştir. Mikro çeliklerin IBA solüsyonlarına (50-200 mg/L) daldırıldığı ve temel besin ortamına dikildiği denemede en yüksek köklenme oranları %80.33 ile 70 mg/L IBA'ya 2 saat daldırma ve %79.37 ile 50 mg/L IBA'ya 3 saat daldırma uygulamalarında kaydedilmiştir. IBA ve PG ile desteklenen ortamda köklenme düşük oranlarda meydana gelmiştir. Bu denemede PG bulunmayan 0.1 mg/L IBA içeren ortamda %81.03 köklenme belirlenmiştir. PG'nin olumlu etkisi ışık altındaki kültürlerde gözlenmiştir. Dış koşullara alıştırmada uygun bir protokol olarak köklendirme aşamasında IBA içeren sıvı kültürlerde kök uyarımının gerçekleştirilmesi ve sonrasında IBA bulunmayan ortamda kök gelişiminin sağlanması önerilmiştir. Dış koşullara alıştırılan bitkiler Mayıs-Ağustos ayları arasında bahçe koşullarına transfer edildiğinde yüksek sıcaklıktan dolayı yaşama oranları düşmüş ve %50-55 olarak kaydedilmiştir. Dış koşullara alışmış 2 aylık bitkiler Mart-Nisan ayında ve daha büyük bitkiler Eylül-Kasım ayları arasında bahçe koşullarına taşındığında yaşama oranları %95-100 olmuştur. İlkbaharda taşınanlarda gelişme sağlıklı olarak devam ederken sonbaharda taşınanlarda düşük sıcaklıklar ve dinlenme durumu nedeniyle gelişme yavaşlamıştır.

Chaari Rkhis vd. (2011), Oueslati zeytin çeşidinin (*O. europaea* L.) mikro çoğaltımında köklendirme aşamasında tepe tomurcuğu bulunan ve bulunmayan mikro sürgünleri ilk

denemede 1 mg/L IBA, 1.0 mg/L thiamin, 30g/L mannitol içeren ve 8 g/L agar ile katılaştırılmış ½ kuvvetindeki MS besin ortamına dikmişlerdir. İkinci denemede ise mikro sürgünlerin dip kısımlarını aseptik koşullarda 4-5 saniye süreyle 2000 ppm IBA solüsyonuna daldırdıktan sonra 1. denemede belirtilen 1 mg/L IBA, 1.0 mg/L thiamin, 30g/L mannitol içeren ve 8 g/L agar ile katılaştırılmış ½ kuvvetindeki MS besin ortamına dikmişlerdir. Her iki denemede de kültürlerin alt kısımları karanlık oluşturmak üzere alüminyum folyo ile sarılmış ve 25±1°C’de 16 saat aydınlık koşullarda 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ koşullarda inkübe edilmiştir. Köklenen sürgünler kompost, sfagnum yosunu ve torf karışımı (1:1:1) (v:v:v) ile doldurulmuş plastik saksılara dikilmiştir. Bitkiler %80 nem, 20-25°C sıcaklık koşullarına sahip seraya taşınmış, dikimi takip eden ilk hafta yüksek nem koşulu sağlamak üzere polietilen ile örtülmüş ve serada haftada bir kez 1/2 kuvvetinde MS mikro ve makro elementlerini içeren besin solüsyonu ile 10-20 mL olacak şekilde sulanmıştır. Çalışmada en yüksek köklenme oranları 2. denemeden elde edilmiştir. Dikimden 40 gün sonra tepe tomurcuğu bulan mikro sürgünlerde köklenme oranı %90.9, tepe tomurcuksuz sürgünlerde %81.8 olmuştur. İlk denemede ise bu oranlar sırasıyla %45.45 ve %50 olarak belirlenmiştir. Seraya transfer edildikten 1 ay sonra bitkilerin %88’i dış koşullara alışmıştır.

Kaina vd. (2011), süs elması crabapple (*Malus* spp.) mikro sürgünlerinin in vitro köklenmesi üzerine 1/1 ya da ½ MS temel besin ortamına ilave edilen büyümeyi düzenleyici maddelerin etkilerini incelemişlerdir. Bu kapsamda 1/1 MS, 1/1 MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA, ½ MS, ½ MS+0.2 mg/L BA, ½ MS+0.5 mg/L NAA veya ½ MS+0.5 mg/L uygulamaları yapılmıştır. Dış koşullara alıştırma denemeleri için sürgünler 5-6 cm ve kökler 3-5 cm uzunluğa ulaştığında kültürlerin kapağı açılmış, 3 gün sonra yıkanarak in vitro bitkiler steril vermikulit:torf:kum (1:1:1) veya vermikulit:perlit (1:1) karışımı bulunan saksılara dikilmiş, %80-85 nem, 25±2°C sıcaklık ve 1500-2000 lux ışık yoğunluğuna sahip mist sistemi bulunan seraya taşınmıştır. Çalışmada köklenme oranları 1/1 MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA (%76) ve ½ MS+0.5 mg/L NAA (%67) dışındaki uygulamalarda %90-100 seviyelerinde belirlenmiştir. Bununla birlikte kalın ve uzun kökler ile kallussuz sağlıklı bir kök sistemi oluşturan ½ MS+0.2 mg/L BA uygulaması süs elmasının in vitro köklendirilmesi için uygun bulunmuştur. Bu uygulamada %100 köklenme oranı, 14 adet

kök/sürgün ve 4.2 cm kök uzunluğu kaydedilmiştir. Dış koşullara alıştırma denemesinde ise 20 gün sonra en iyi sonuç köklü sürgünlerde %95 ve köksüz sürgünlerde %70 canlılık oranları ile vermikulit:perlit karışımından elde edilmiştir. Vermikulit:torf:kum karışımında bu değerler sırasıyla %30 ve %10'dur.

Leva (2011), zeytinin (*O. europaea* L.) mikro çoğaltımında üretim maliyetini ve zamanını azaltmak amacıyla mikro sürgünlerin ex vitro köklenmesi konusunda yaptığı çalışmayı yedi zeytin çeşidinde gerçekleştirmiştir. Explant olarak kullanılan ve sürgün ucu ile birlikte 3 boğumdan oluşan mikro sürgünler, ex vitro köklendirme denemelerinden önce büyümeyi düzenleyici madde içermeyen temel besin ortamında 15 gün kültüre alınmış ve böylece sürgün çoğaltma aşamasında besin ortamına ilave edilen zeatinin etkisinden arındırılmıştır. Çalışmada Maurino çeşidinde 5. (225 gün), 6. (267 gün) ve 7. (309 gün) alt kültürlerden gelen mikro sürgünlerin köklenme başarısı da incelenmiştir. Ex vitro köklendirme denemelerinde mikro sürgünlerin dip kısmı 2.7 mM (500 ppm) NAA solüsyonuna 5 dakika süreyle daldırılmıştır. NAA, sterilize edilmemiş asidik su içerisinde çözünmüş ve pH'sı 6.5 olarak ayarlanmıştır. NAA uygulamasından sonra mikro sürgünler önceden ıslatılmış sterilize edilmemiş coco pot saksılara (Hindistan cevizi liflerinden yapılmış saksı) dikilmiş ve çatısı cam olan 1.0x1.0x0.3 m boyutlarındaki küçük strafor kabin içine alınmıştır. Kabinin duvar kalınlığı 6 cm olup nemi korumak için şeffaf polietilen ile kaplanmıştır. Deneme sürecinde gerekli olduğu durumda haftada bir veya iki kez coco potlara su püskürtülerek nem seviyesi %80-85 seviyelerinde korunmuştur. Işıklanma süresinin ex vitro köklenme üzerine etkisini belirlemek üzere saksılar 16 saatlik ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) veya sürekli aydınlık koşullarda ($80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 25-30°C sıcaklıklarda tutulmuştur. Işık kaynağı olarak kullanılan soğuk beyaz floresan lambalar kabinin dışına cam tavanın 50 cm yukarısına yerleştirmiştir. Köklenme gerçekleştikten sonra cam kapak çıkartılmış ve strafor kabinde potlar 1 ay süreyle bekletilmiş ve daha sonra küçük saksılara aktarılacak sera koşullarına taşınmıştır. Çalışmada 16 saat aydınlık koşullarda mikro sürgünlerde dikkate değer köklenme sağlanamamış ve sonraki ex vitro köklendirme denemelerinde mikro sürgünler sürekli aydınlık koşullarda tutulmuştur. Bu koşullarda Maurino çeşidinde 5., 6. ve 7. alt kültürlerden gelen mikro sürgünlerde köklenme oranı sırasıyla %30, %48 ve %64 olmuştur. En iyi sonucu veren 7. alt kültürden gelen mikro sürgünler

ile zeytin çeşitlerinin ex vitro köklenme oranları %28 (Correggiolo) ile %76 (S. Francesco) arasında değişmiştir. Köklenmiş mikro çeliklerin %90'ı dış koşullara alışıma ve daha sonra gelişimlerini sürdürmüştür.

Martins vd. (2013), Brezilya'nın çok yıllık endemik bitki türlerinden *Neoregelia concentrica*'nın in vitro ve ex vitro köklenmesi üzerine sentetik oksinlerin etkisini araştırdıkları çalışmalarında in vitro köklendirme denemelerinde besin ortamı olarak 10 mg/L sitrik asit ilave edilmiş MS ortamını kullanmışlardır. Bu ortama 0, 1, 2, 3 ve 4 µM (0.0, 0.2, 0.4, 0.6 ve 0.8 mg/L) IBA veya NAA ilave edilmiştir. Kùltürler 30 ve 60 gün süreyle 27±2°C'de 16 saat aydınlık koşullarda (25.2 µmol·m⁻²·s⁻¹) inkübe edilmiştir. Ex vitro köklendirme denemelerinde ise mikro çeliklerin dip kısımları 0, 5, 10 ve 15 µM (0.0, 1.0, 2.0 ve 3.0 mg/L) NAA veya IBA solüsyonuna 60 dakika süreyle daldırılmıştır. Daha sonra vermikülit ile doldurulmuş plastik viyollere dikilen mikro çelikler serada aralıklı mist sistemi ile %70 nem ve 30°C sıcaklık koşullarında 40 gün süreyle tutulmuştur. Bitkiler 20 gün arayla ½ MS besin solüsyonu ile sulanmıştır. İn vitro çalışmalarda IBA ile karşılaştırıldığında NAA'nın 1 µM'den daha yüksek dozlarında mikro sürgünlerde daha fazla kök sayısı belirlenmiştir. Bu bakımdan 3 µM NAA uygulaması *Neoregelia concentrica*'nın in vitro köklenmesinde ümit verici bulunmuştur. İnkübasyonun 30. gününde köklenme oranları NAA uygulamalarında ortalama %86.2 ile IBA uygulamalarından (ortalama %67.7) daha yüksek bulunurken 90. günde uygulamalar arasındaki farklılıklar ortadan kalkmış ve köklenme oranı %90'ın üzerinde belirlenmiştir. Ex vitro çalışmalarda ise NAA uygulamalarına göre IBA uygulamaları ve özellikle 5 µM IBA uygulaması ile mikro sürgünlerde daha yüksek köklenme oranı ve kök sayıları ile daha iyi bir kök sistemi meydana gelmiştir. Araştırmacılar ex vitro köklendirme yönteminin maliyetleri ve süreyi azaltması bakımından *Neoregelia concentrica*'nın mikro çoğaltımında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Clapa vd. (2013), bahçe bitkilerinde mikro sürgünlerin ex vitro köklendirilmesi ve in vitro bitkiciklerin dış koşullara alıştırması amacıyla yüzen su kültürü tekniğini geliştirmişlerdir. Bu teknik ile böğürtlen (*R. fruticosus*) ve kesme gülde (*Rosa hybrida*) in vitro köklenmeye gerek kalmadan ex vitro koşullarda köklenme ve dış koşullara

alıştırmayı tek bir aşama olarak başarıyla tamamlamışlardır. Bu teknikte ex vitro koşullarda köklendirme başarısı viyollerin hücre büyüklüğü ve mikro sürgünlerin uzunluğuna göre değişmiştir. Ex vitro köklenme oranı böğürtlende %61.66 ile %93.14 ve kesme gülde %86.86 ile %93.33 arasında bulunmuştur. Bununla birlikte ahududu (*R. idaeus*), gojiberi (*Lycium barbarum*), taş armudu (*Amelanchier canadensis*), stevya (şekerotu) (*Stevia rebaudiana*), Gisela 5 kiraz anacı (*Prunus cerasus* x *P. canescens*) ve bir böğürtlend x ahududu melezi olan tayberi (*R. fruticosus* x *R. idaeus*) genotiplerinde mikro sürgünler, yüzen su kültürü tekniği uygulandığında ex vitro koşullarda 3-7 gün içerisinde ölmüşlerdir. Ahududu, siyah frenk üzümü (*Ribes nigrum*), Gisela 5 kiraz anacı, gojiberi ve taş armudu gibi odunsu bitki türleri ile *Drosera rotundifolia* ve *D. capillaris* (etobur bitki türleri) ile *Nephrolepis* türünde (eğreltiotu) in vitro koşullarda köklendirilmiş bitkicikler yüzen su kültürü tekniği ile %58 ile %100 arasında değişen oranlarda dış koşullara alıştırılmıştır. (Clapa vd. 2013). Clapa vd. (2013), bahçe bitkilerinde mikro sürgünlerin ex vitro köklendirilmesi ve in vitro bitkiciklerin dış koşullara alıştırması amacıyla yüzen su kültürü tekniğinin yanısıra perlitin su yüzeyine serilmesiyle oluşturulan yüzen perlit tekniğini de araştırmalarında kullanmışlardır. Bu teknik ile ahududu mikro sürgünlerinde uzunluğun artmasıyla birlikte ex vitro köklenme oranı %98.11'e, yaban mersininde (*Vaccinium corymbosum*) %100'e, taş armudunda %97.14'e ulaşmıştır. İn vitro koşullarda köklendirilmiş bitkiciklerin yüzen perlit yöntemiyle dış koşullara alıştırılmasında ahududu, böğürtlend, yaban mersini, tayberi, Gisela 5 kiraz anacı ve kesme gül genotiplerinde %67.24 ile %98.38 arasında belirlenmiştir.

Elezaby ve Allatif (2017) çalışmalarında guava (*Psidium guajava* L.) mikro sürgünlerinin IBA ve/veya NAA'nın ilave edildiği ½ MS besin ortamında başarıyla köklendirildiğini, 2.0 mg/L IBA+2.0 mg/L NAA kombinasyonunda en yüksek köklenme yüzdesinin (%62.67) ve kök uzunluğunun (4.20 cm) kaydedildiğini bildirmişlerdir. Sürgünlerin dip kısmının 250 mg/L IBA solüsyonuna 30 saniye daldırıldığı ve daha sonra büyüme düzenleyici madde içermeyen ½ kuvvetindeki MS ortamına dikildiği in vitro uygulamada ise en yüksek kök sayısına (2.85) ulaşıldığını belirtmişlerdir.

Cüce ve Sökmen (2017), bataklık yaban mersininin (*V. uliginosum* L.) in vitro çoğaltımı kapsamında mikro sürgünleri 0.25, 0.5 ya da 1.0 mg/L IBA, IAA veya NAA ilave edilmiş, aktif kömür (1 g/L) içeren ya da içermeyen WPM besin ortamında köklendirmişlerdir. Kültürler $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat aydınlık koşullarda ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) inkübe edilmiştir. Çalışmada en yüksek köklenme oranı %18.89 ve kök uzunluğu 12.27 mm 0.5 mg/L IBA ve 1.0 g/L aktif kömür ilave edilmiş besin ortamında belirlenmiştir. Aktif kömürün artmasıyla birlikte köklenme oranı %29.4'e yükselmiştir. Köklenmiş mikro sürgünler 2:1 oranında torf:perlite karışımı bulunan viyollere dikilmiş, üzeri şeffaf plastik örtü ile kapatılmış ve 8. haftanın sonuna kadar örtü kademeli olarak açılarak dış koşullara alıştırmıştır. Üç ay sonra bitkiler daha büyük saksılara taşınmıştır. Bitkilerin yaşama oranı %60-70 oranında belirlenmiştir.

Quambusch vd. (2017), altı kiraz genotipinde (*P. avium*) mikro sürgünlerin in vitro köklendirilmesinde oksin ve karanlık uygulamalarının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında köklendirme ortamı olarak $4.9 \mu\text{M}$ (1 mg/L) IBA ilave edilmiş makro element düzeyi 1/3 kuvvetindeki MS ortamını kullanmışlardır. Kültürler bu ortam üzerinde 24°C sıcaklık ve $40\text{-}56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda 16 saat aydınlık koşullarda ilk 4 gün karanlık uygulaması yapılarak ya da yapılmayarak 4 hafta süreyle tutulmuştur. Diğer bir denemede köklendirme ortamının IBA dozu 10 kat artırılarak $49 \mu\text{M}$ 'a (10 mg/L) çıkartılmış ve mikro sürgünler bu ortam üzerinde 48 saat tutulduktan sonra IBA içermeyen ortama taşınmıştır. Dış koşullara alıştırma aşamasında mikro sürgünler köklenmemişler, sürgün başına kök sayısı 1-3 adet ve 3 adetten fazla olanlar şeklinde üç gruba ayrılmıştır. Tüm sürgünler beyaz torf+ $\frac{1}{4}$ perlite karışımı doldurulmuş saksılara dikilmiş ve sera koşullarında %100 nem içeren 22°C 'deki tünel altında 2 hafta tutulmuştur. Daha sonra nem yavaş bir şekilde düşürülmüş ve 3-4 hafta sonra saksılar minimum 18°C sıcaklık ve 16 saatlik aydınlatma süresi olan sera koşullarına taşınmıştır. Bitkilere haftada bir kez %0.07 Ferty® MEGA 3 gübresi uygulanmıştır. Gözlemler 7 hafta sonra yapılmıştır. Aklimatizasyon, özellikle kök sayısı fazla sağlıklı bitkiciklerde başarılı olmuştur. Çalışmada 4 gün karanlık uygulaması ve $49 \mu\text{M}$ IBA dozu köklenme oranlarını artırmıştır. Yüksek dozda IBA uygulaması en fazla Achilleus genotipinde köklenme oranını artırmış ve kontrolde %65 olan bu oran %86'ya çıkmıştır. Ancak bu uygulama sonucu bitkicikler sağlıklı olmadığı için aklimatizasyon başarısı düşük

olmuştur. Karanlık uygulaması ile Achilles genotipinde köklenme oranı %65'den %84'e, Asteria genotipindeki ise %33'den %58'e yükselmiştir. Kök sayısı 1-3 olan mikro çeliklerde Neptun, Apollo ve Achilles genotiplerinde yaşama oranları sırasıyla %48, %32 ve %31 olmuştur.

Tarinejad ve Amiri (2019), Shahroudi üzüm çeşidinin (*Vitis vinifera* L.) mikro çoğaltımı kapsamında mikro çeliklerde en yüksek köklenme oranını 0.5 mg/L IBA ilave edilmiş ½ ve ¼ kuvvetlerindeki MS besin ortamında %88.88 ve %81.48 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar in vitro bitkileri otoklavlanmış torf ve perlit (1:1) karışımı doldurulmuş plastik torbalara dikmişler, Hoagland sıvı ortamı ile nemlendirdikten sonra 4 hafta boyunca 20±2 °C sıcaklık ve %70-80 nispi neme sahip 16 saatlik fotoperiyodun uygulandığı mist kabinde tutmuşlardır. Bitkiler 6 yapraklı olduğunda kontrollü koşullara sahip sera ortamına taşınmıştır. Bu aşamada torf, perlit ve bahçe toprağı (2:1:1) karışımı kullanmışlardır.

Lebedev vd. (2019), Rus ahududu çeşitlerinin (*R. idaeus*) mikro sürgünlerinin in vitro köklendirilmesinde 0.1 mg/L IBA ve 0.1 mg/L IAA ilave edilmiş, makro elementleri ½ kuvvetinde olan QL ortamını esas almışlardır. Kültürler 22-24°C'de, 16 saatlik aydınlık koşullarda inkübe edilmiştir. Çalışmada sürgünlerin ex vitro köklenmesi üzerine sürgün çoğaltma aşamasında kullanılan büyümeyi düzenleyici maddelerin ve katılaştırıcıların etkileri de araştırılmıştır. İn vitro koşullarda köklendirilmiş mikro sürgünler ve ex vitro koşullarda köklendirme için mikro sürgünler sera koşullarında 3:1 oranında torf:perlit karışımı doldurulmuş plastik viyollere dikilmiş, viyollerin üzeri spunbond kumaş (tela) ve polietilen film ile kaplanarak %90-95 nem koşullarında iki hafta bekletilmiştir. Sonraki haftada polietilen film kaldırılmış, spunbond kumaş 1 hafta daha kalmıştır (%70-75 nem). Sera koşullarına alındıktan 6 hafta sonra gözlemler yapılmıştır. İn vitro koşullarda köklendirilmiş mikro sürgünlerin sera koşullarında yaşama oranı %81.1 ile %97.9 arasında belirlenirken bu oran ex vitro köklenenlerde %43.3 ile %76.4 arasında değişmiştir. Bu çalışmada ex vitro köklenmede kullanılan sürgünlerin kalitesi üzerine proliferasyon ortamının büyümeyi düzenleyici madde ve katılaştırıcı içeriğinin önemli düzeyde etkili olduğu Atlant çeşidi ile gösterilmiştir. Bu çeşitte önceki denemede 0.7 mg/L BA ve 8 g/L agar bulunan proliferasyon ortamından gelen sürgünlerin ex vitro

koşullarda köklenme ve dış koşullara alışma oranı %71.4 iken bu oran çoğaltma ortamında 0.2 mg/L BA+0.1 mg/L IBA büyümeyi düzenleyici kombinasyonu ve 5 g/L agar+0.2 mg/L Phytigel katılaştırıcı kombinasyonunun kullanımı ile en yüksek düzeyde (%97.2) belirlenmiştir. Araştırmacılar, ahududunun mikro çoğaltımında maliyetin ve emek yoğunluğunun ex vitro köklendirme ile azaltılabileceğini, geliştirilen protokolün ahududunun hızlandırılmış mikro çoğaltımında ticari olarak başarıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Masoudi vd. (2020), bazı elma çeşitlerinin (*M. domestica* Borkh) mikro sürgünlerinin in vitro köklenmesi üzerinde *Piriformospora indica* mikorizal fungusun etkilerini araştırmışlardır. Tüm köklendirme denemelerinde 100 mg/L PG, 30 g/L sakaroz, 7 g/L agar içeren MS ortamı esas alınmıştır. Kùltürler 23±1°C sıcaklık, 16 saat aydınlık (500-3000 lux) koşullarda inkübe edilmiştir. Köklendirme denemeleri kapsamında 6 uygulama esas alınmıştır. Bu kapsamda oksinsiz MS besin ortamında 6 hafta inkübasyon, düşük oksin (0.5 µmol NAA + 0.5 µmol IBA) içeren MS ortamında 6 hafta ya da yüksek oksin (2 µmol NAA + 2 µmol IBA) içeren MS ortamında 6 hafta inkübasyon, oksinsiz MS besin ortamında 3 hafta + *P. indica* ilave edilmiş MS ortamında 3 hafta, düşük oksin ortamında 3 hafta + *P. indica* ilave edilmiş MS ortamında 3 hafta ya da yüksek oksin ortamında 3 hafta + *P. indica* ilave edilmiş MS ortamında 3 hafta inkübasyon uygulamaları yapılmıştır. *P. indica* miselleri MS besin ortamının her litresine 3 g olarak ilave edilmiştir. Çalışmanın sonunda tüm çeşitlerde düşük ya da yüksek oksin konsantrasyonu içeren MS ortamında 3 hafta tutulduktan sonra *P. indica* fungus miselleri ilave edilmiş besin ortamında 3 hafta kültüre alınan mikro sürgünlerde köklenme oranı, kök uzunluğu, kök kalınlığı ve sürgün başına kök sayısı en yüksek değerlerde kaydedilmiştir. Bu uygulamalar ile köklenme oranı farklı çeşitlerde %80, kök sayısı 10.75 adet/sürgün, kök uzunluğu 18.75 cm olarak belirlenmiştir. Oksinsiz MS ortamında 3 hafta tutulduktan sonra 3 hafta *P. indica* bulunan ortamda kültüre alınmış mikro çeliklerde köklenme meydana gelmemiştir. Çalışmada özellikle yüksek oksin ortamında köklenme meydana gelmiş ise de *P. indica*, düşük ve yüksek oksin uygulamalarının etkinliğini artırmıştır. Çalışmada, düşük oksin ortamında 3 hafta + *P. indica* ilave edilmiş MS ortamında 3 hafta ve yüksek oksin

ortamında 3 hafta + *P. indica* ilave edilmiş MS ortamında 3 hafta uygulamaları ile köklendirilmiş bitkiler başarıyla dış koşullara alıştırılmıştır.

Oakes vd. (2020), bazı Amerikan kestane çeşitlerinde (*C. dentata*) in vitro sürgünleri WPM ortamının mineral maddeleri ile Nitsch ve Nitsch ortamının vitaminlerini (109 mg/L) içeren 0.5 µM BA (0.1 mg/l), 0.5 µM IBA (0.1 mg/L), 30 g/L sakaroz, %0.7 agar bulunan ve pH'sı 5.5'e ayarlanmış sürgün uzatma ortamında 3 haftalık standart bekletme süresinin 1 ya da 2 kez taze ortamlara taşınarak artırılmasının, farklı köklendirme ortamlarının, oksin uygulamalarının, köklenmeyi uyarıcı maddelerin, kesilen bölgenin suya daldırılmasının ve ışık yoğunluğunun ex vitro köklenme üzerine etkilerini araştırmışlardır. En etkili yöntemler arasında mikro sürgünleri uzatma ortamında yedi hafta bekletme, köklendirme ortamı olarak su ile şişirilmiş Jiffy tabletlerin kullanılması, kallusun mikro sürgünler suya batırılmış haldeyken kesilmesi ve %0.31 IBA içeren köklendirme jeline daldırılması ve köklendirmeden sonra bitkiciklerin 60 µmol·m⁻²·s⁻¹ düşük ışık yoğunluğunda inkübasyonu yer almıştır.

Shekhawat vd. (2021), ekonomik açıdan önemli ancak hassas bir tropik ağaç türü olan Hint sandal ağacının (*Santalum album* L.) 3-5 cm uzunluktaki mikro sürgünlerini 1-5 mg/L IBA ya da NAA ile desteklenmiş ½ kuvvetindeki MS ortamında in vitro koşullarda köklendirmeye almışlardır. Köklenen sürgünler soilrite® ve kokopit (1:1) içeren kâğıt bardaklara aktarılmış ve MS ortamının mineral maddelerinden ¼ kuvvetinde hazırlanmış solüsyon ile haftada üç kez sulanmıştır. Dört hafta sonra bitkiler soilrite® ve kokopit karışımı (1:1) bulunan torbalara aktarılmış ve ilk 4 hafta serada ve daha sonra 8 hafta 24±5°C sıcaklık ve %60-70 neme sahip normal gece/gündüz koşullarında tutulmuştur. Bahçeye aktarıldıktan 6 hafta sonra bitkilerin hayatta kalma oranı kaydedilmiştir. Çalışmada 1.0 mg/L IBA oksin uygulaması ile sürgünlerde %97.0 oranında köklenme meydana gelmiştir. Bu uygulama ile sürgün başına kök sayısı 4.0 ve kök uzunluğu 3.5 cm olarak belirlenmiştir. Anatomik çalışmalar in vitro bitkiciklerin az gelişmiş kütikula, organize olmamış doku sistemleri, azalmış mezofil dokular, daha az vasküler eleman ve mekanik doku ve gevşek bir şekilde düzenlenmiş ince duvarlı parankimatik dokular gibi yapısal anormalliklere sahip olduğunu göstermiştir. Dış

koşullara alıştırma sürecinde bu anormallikler onarılmış ve hayatta kalma oranı %98.0 olarak kaydedilmiştir.

Korpayev vd. (2021) biyopolimerik bir nanotaşıyıcı olan kitosan ve metalik bir nanotaşıyıcı olan gümüşün IAA ve IBA yüklü nanopartiküllerinin MM106 elma anacında mikro çeliklerin in vitro adventif köklenme potansiyeli üzerine etkilerini araştırmışlardır. IAA ile yüklü kitosan nanopartiküllerinin çapı 167.5 ± 0.1 nm, IBA ile yüklü olanlar 123.2 ± 2.6 nm, aynı oksinler ile yüklü gümüş nanopartiküllerin çapı ise sırasıyla 93.66 ± 5 nm ve 71.41 ± 3 nm olarak ölçülmüştür. Yaklaşık 2 cm uzunluğunda hazırlanan mikro çelikler oksin içeren veya içermeyen %2 sakaroz ve %0.7 agar bulunan $\frac{1}{2}$ kuvvetindeki MS ortamında köklendirilmiştir. Besin ortamına 0.5, 1.0, 2.0 mg/L serbest IAA veya IBA, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L IAA ya da IBA yüklü kitosan veya gümüş nanopartikülleri ilave edilmiştir. Kültürler $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta başlangıçta ilk 7 gün tamamen karanlık ve daha sonra 16 saat aydınlık koşullarda ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) tutulmuştur. Mikro çeliklerin köklenme oranları oksin yüklü kitosan ve gümüş nanopartikül uygulamalarında (%91.7-%62.5), 2.0 mg/L serbest IBA (%66.7) hariç IAA ve IBA uygulamalarına (%50.0-%33.3) göre önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar IAA yüklü kitosan, IAA ve IBA yüklü gümüş nanopartiküllerindeki 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L oksin konsantrasyonlarının, kontrol, IBA yüklü kitosan nanopartikülleri, serbest IAA ve IBA'ya göre MM106 elma anacının mikro çeliklerinin köklenmesi için umut verici olduğunu bildirmişlerdir.

Alizadeh ve Dumanoglu (2022), ateş yanıklığı hastalığına dayanıklı 67 nolu yerel elma çeşidinin (*M. domestica* Borkh.) mikro çeliklerinin in vitro köklenmesi üzerine 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 mg/L IAA veya IBA'nın serbest veya çinko nanopartiküllerine yüklü formlarının etkilerini araştırmışlardır. Temel besin ortamı olarak %2 sakaroz ve %0.7 agar içeren $\frac{1}{2}$ kuvvetindeki MS ortamının kullanıldığı çalışmada mikro çelikler ilk 5 günü karanlık ve daha sonra 16 saat aydınlık koşullarda ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 6 hafta süreyle $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de tutulmuştur. Oksin içermeyen kontrol uygulamasında köklenmenin meydana gelmediği çalışmada en yüksek köklenme oranı %58.4 ile 1 mg/L IBA yüklü çinko nanopartikül uygulamasından elde edilmiştir.

Souza vd. (2022) alışmalarında Marubakaido (*M. prunifolia*) elma anacında mikro sürgünlerin in vitro köklenmesi ve dış koşullara alışması üzerine sentetik ve biyolojik kaynaklardan elde edilen IAA'nın etkilerini araştırmışlardır. Bir im türü olan *Axonopus catharinensis* Valls'in rizosfer toprağından izole edilen N 39 bakteri suşu, IAA retim potansiyeline dayanılarak bu çalışma için seçilmiştir. İn vitro köklendirme çalışmalarında 3 cm uzunlukta hazırlanan mikro sürgünler sentetik ya da biyolojik IAA içeren MS ortamında 60 gün süreyle tutulmuştur. Mikro sürgünlerde köklenme oranı, kallus oluşumu, kuru kök ve sürgün ağırlığı, kök uzunluğu, kök hacmi ve çapı değerlendirilmiş, bitkiciklerin aklimatizasyon aşamasından sonra hayatta kalma oranları belirlenmiştir. Her iki IAA ilavesi köklenme oranlarını artırmış ancak konsantrasyona bağlı olarak sentetik IAA uygulamasında sürgünlerin dip kısmında kallus oluşumu artırmıştır. Bununla birlikte bakteri ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınan sürgünlerde kallus oluşumu görülmemiştir. İn vitro köklendirme aşamasında kullanılan sentetik IAA konsantrasyonu arttıkça 45 günlük dış koşullara alıştırma sürecinin sonunda bitkilerin hayatta kalma oranı %96'dan %66'ya düşmüştür. Bakteriyel IAA ile desteklenmiş MS ortamında kallus oluşturmadan meydana gelen ince köklere sahip bitkiciklerin hayatta kalma oranı ise %98'e ulaşmıştır. N39 suşunun Marubakaido elma anacının in vitro köklenmesi ve aklimatizasyonunda etkili olduğu ve yüksek kaliteli bitkilerin elde edilmesini sağladığı bildirilmiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji II Laboratuvarı, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuvarı'nda 2019-2021 yılları arasında yürütülmüştür.

3.1 Materyal

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak “Armutlar İçin Bodur Ahlat Klon Anaç Islah Programı” kapsamında Ankara’da Ahlatlıbel mevkiinden seçilmiş iki ahlat tipinin (Ahlat 75 ve Ahlat 32) (*P. elaeagrifolia* Pall.) ve kontrol olarak OHxF 333 standart armut klon anacının (*P. communis* L.) in vitro kültürlerinden sağlanan mikro çelikler ve in vitro koşullarda köklendirilmiş bitkicikleri kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 İn vitro kültürlerin oluşturulması ve mikro çeliklerin hazırlanması

Tez çalışmasında armut ve ahlat genotiplerinin in vitro kültürleri Aygun ve Dumanoglu’na (2015) göre sürgün ucu yöntemi ile oluşturulmuştur.

İn vitro kültürlerde besin ortamı olarak başlangıç ve alt kültürler ile sürgün çoğaltma aşamalarında amonyum nitrat kapsamı 1/3 düzeyinde olan Murashige ve Skoog besin ortamı (Murashige ve Skoog 1962) kullanılmıştır. Bu ortama 1.0 mg/L BA, 0.3 mg/L GA₃ ve %3 sakaroz ilave edilmiş, pH düzeyi 5.8’e ayarlanmış ve %0.7 agar ile katılaştırılmıştır. Hazırlanan besin ortamı başlangıç aşamasında payreks cam tüplere (2.5 cm x 15 cm) 10’ar mL, sürgün çoğaltma aşamasında 250 mL’lik erlenlere 50’şer mL dağıtıldıktan sonra 121°C’de 1 atmosfer basınç altındaki otoklavda 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

İn vitro kültürlerin ilk oluşturulduğu başlangıç aşamasında sürgün uçları ilkbahar gelişme döneminde bahçe koşullarındaki bitkilerin aktif gelişme halindeki sürgünlerinin uç kısımlarından yaklaşık 2 cm uzunlukta toplanmış, laboratuvara getirilerek musluk suyu altında yarım saat süreyle yıkanmıştır. Daha sonra içerisine 1-2 damla Tween 20 ilave edilmiş, sodyum hipoklorit solüsyonunda (%15) 15 dakika süreyle dezenfekte edilmiştir. Ardından sürgün uçları aseptik koşullarda 3 kez 5'er dakika süreyle steril saf su ile çalkalanmış ve steril kabinde yaklaşık 1 cm uzunlukta hazırlanarak kültüre alınmıştır. Sürgün uçlarından gelişen mikro sürgünler 4 hafta sonra sürgün çoğaltma ortamına taşınmış ve 4-6 hafta aralıklarla alt kültürlerle alınarak çoğaltılmıştır. Köklendirme çalışmalarında kullanılan mikro çelikler, alt kültürden alınmış mikro sürgünlerden yaklaşık 2 cm uzunlukta hazırlanmıştır. Hazırlanan mikro çelikler köklendirmeye alınmadan önce büyümeyi düzenleyici madde içermeyen %3 sakaroz ilave edilmiş ve pH'sı 5.8'e ayarlandıktan sonra %0.7 agar ile katılaştırılmış MS ortamında yaklaşık 10-15 gün bekletilmiştir. Belirtilen besin ortamı 250 mL'lik cam kavanozlara 50'er mL dağıtılmış ve otoklavlanmıştır. Bu ortamda mikro çelikleri bekletme ile köklenme üzerine engelleyici etkisi olduğu bilinen BA ve GA₃ kalıntılarından dokuların arındırılması hedeflenmiştir (Moshkov vd. 2008, Van Staden vd. 2008). Her kavanoza en az 100 mikro çelik dikilmiştir.

Başlangıç, sürgün çoğaltma ve mikro çelikleri bekletme aşamalarında in vitro kültürler 16 saat aydınlık ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 8 saat karanlık fotoperiyodun uygulandığı $25\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıktaki iklim odasında inkübe edilmiştir.

3.2.2 İn vitro köklendirme denemeleri

İn vitro köklendirme denemeleri öncesinde steril kabinde bekletme ortamından çıkartılan mikro çeliklerin dip kısımları eğimli olarak yaklaşık 1 mm kesilerek uzaklaştırılmış ve nem kaybına karşı içerisinde az miktarda steril saf su bulunan kapaklı petri kaplarında tutulmuştur. Mikro çelikler yine steril kabinde 2.5 cm çapında ve boyundaki küçük cam kaplar içerisine dik olarak yerleştirilmiş ve 50'lik gruplar halinde yaklaşık 5 mm'lik dip kısımlarına hızlı daldırma yöntemiyle 10 saniye süreyle 250, 500, 1000 ve 2000 ppm steril IBA solüsyonu uygulanmıştır. Uygulama süresinin sonunda

mikro çelikler topluca IBA solüsyonundan çıkartılmış ve köklendirme için hazırlanan besin ortamına dikilmiştir (Aygün ve Dumanoglu 2015, İbrahim Ahmed Osman ve Dumanoglu 2020).

IBA solüsyonu hazırlamak üzere önce laboratuvar ortamında hassas terazide (Sartorius BP121S, max. 120 g, d=0.1 mg) tartılan IBA (Sigma15386) %96'lık etil alkolde çözünmüştür. Bu amaçla kullanılan %96'lık etil alkolün miktarı mikro çeliklerde yanıklığa neden olmaması için düşük tutulmuş ve IBA solüsyonunun son haciminin %10'u kadar kullanılmıştır. IBA çözündükten sonra solüsyonun son hacmi deiyonize saf su ile ayarlanmıştır. İn vitro köklendirmeler için IBA solüsyonları steril kabinde aseptik koşullarda şırınga ucuna takılan 0.22 µm por büyüklüğüne sahip steril filtreden (Isolab) geçirilerek steril hale getirilmiştir.

İN vitro köklendirme denemelerinde besin ortamı olarak büyümeyi düzenleyici madde içermeyen makro ve mikro elementleri ½ kuvvetindeki MS temel besin ortamı kullanılmıştır (Murashige ve Skoog 1962). Bu ortama 100 mg/L myo-inositol, 2 mg/L glisin, 0.1 mg/L tiamin hidroklorür, 0.5 mg/L nikotinik asit ve 0.5 mg/L piridoksin hidroklorür, %2 sakaroz ilave edilmiş, ortamın pH'sı 5.8'e ayarlanmış ve %0.7 agar ile katılaştırılmıştır. Besin ortamı 250 mL'lik cam kavanozlara 50'şer mL dağıtılmış ve otoklavlanmıştır. IBA uygulamalarından sonra mikro çelikler her kavanoza 15'er adet dikilmiştir. Kùltürler ilk 5 günü tamamen karanlıkta olmak üzere 16 saat aydınlık (35 µmol·m⁻²·s⁻¹), 8 saat karanlık fotoperiyodun uygulandığı 25±2°C sıcaklıktaki iklim odasında toplam 4 hafta süreyle inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda IBA dozlarının mikro çeliklerde köklenme oranı (%), köklenen mikro çeliklerde köklenme düzeyi (1 = zayıf, 2 = orta, 3 = iyi, 4 = çok iyi) ve kallus düzeyi (0 = kallus yok, 1 = küçük, 2 = orta, 3 = büyük, 4 = çok büyük) üzerine etkileri tespit edilmiştir.

3.2.3 Ex vitro köklendirme denemeleri

Ex vitro köklendirme çalışmaları, iklim odasında yüzen su kùltürlerinde ve ayrıca kontrol amacıyla sıcaklık kontrollü ve sisleme ünitesi bulunan serada perlit ortamında gerçekleştirilmiştir.

Ex vitro köklendirme için 10-15 gün bekletme ortamında tutulmuş mikro çelikler laboratuvar koşullarında kavanozlardan çıkartılmış, agar kalıntılarından su ile yıkanarak arındırılmış ve içerisinde saf su bulunan beherlere alınmıştır. Dip kısımları yaklaşık 1 mm eğimli olarak kesilen mikro çelikler uygulama yapılncaya kadar içerisinde az miktarda su bulunan kapaklı petrilere tutulmuştur. Mikro çeliklerin 10'u bir araya getirilerek yaklaşık 5 mm'lik dip kısımları hızlı daldırma yöntemiyle 10 saniye süreyle 250, 500, 1000 ve 2000 ppm IBA solüsyonlarına daldırılmıştır. Uygulama yapılan mikro çelikler yüzen su kültürüne alınmış ya da perlit doldurulmuş plastik kaplara dikilmiştir.

Yüzen su kültürleri için önce 25 cm x 25 cm x 11 cm boyutlarındaki plastik küvetlerin dış kısmı siyah plastik örtü ile kaplanmıştır. Bu küvetler, üstte 3 cm boşluk kalacak şekilde 3.5 litre çeşme suyu ile doldurulmuştur. Gözleri 3 cm x 3 cm x 6 cm olan strafor köpük viyoller, küvet yüzeyinde yüzebilmesi için kesilerek 17 x 17 cm boyutlara küçültülmüştür. Böylece her bir viyoldeki göz sayısı 25 adet olmuştur. Daha sonra IBA uygulanmış mikro çelikler OHxF 333'de 7'şerli ve ahlut genotiplerinde 6'şarlı demetler halinde ince bir pamuk ip ile bağlanmıştır. Mikro çeliklerin 1/3'lük kısmı su içerisinde kalacak şekilde demetler, viyollerin alt kısmındaki 0.7 cm çapa sahip deliklere yerleştirilmiştir. Sera denemelerinde ise mikro çelikler içerisine tarımsal perlit doldurulmuş olan 17 cm x 8 cm x 6 cm boyutlarındaki plastik kaplara dikilmiştir.

Hem yüzen su kültürü ve hem de sera denemelerinde mikro çeliklere ilk 5 gün tamamen karanlık uygulaması yapılmıştır. Daha sonra yüzen su kültürleri 16 saat aydınlık ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 8 saat karanlık fotoperiyodun uygulandığı $25\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıktaki iklim odasında, perlit kaplar ise sıcaklık kontrollü sisleme ünitesi bulunan serada toplam 4 hafta inkübe edilmiştir. Ex vitro köklendirme denemelerinde bu periyodun sonunda incelenen parametreler mikro çeliklerde köklenme oranı, köklenen mikro çeliklerde köklenme düzeyi (1 = zayıf, 2 = orta, 3 = iyi, 4 = çok iyi) ve kallus düzeyidir (0 = yok, 1 = küçük, 2 = orta, 3 = büyük, 4 = çok büyük).

3.2.4 İn vitro bitkicikleri dış koşullara alıştırma denemeleri

İn vitro koşullarda köklendirme sonrasında bitkicikleri dış koşullara alıştırma denemeleri, yüzen su kültürü tekniği ve ayrıca kontrol olarak sera koşullarında plastik tünel altında kurulmuştur.

Hızlı daldırma yöntemiyle 250, 500, 1000 ve 2000 ppm IBA uygulamaları ile in vitro koşullarda köklendirilmiş bitkiciklere başlangıçta yüzen su kültürü denemesinde ayrı ayrı yer verilmiştir. Daha sonraki denemelerde ise dış koşullara alıştırmada genellikle canlılık oranı, canlılık düzeyi ve bitkilerin gelişme özelliklerinin daha iyi olması nedeniyle in vitro köklendirmede sadece 250 ppm IBA uygulaması esas alınmıştır. Yüzen su kültürü tekniği ile bitkicikleri dış koşullara alıştırma denemelerinde in vitro besin ortamından ayrılan bitkiciklerin kök kısmındaki agar kalıntıları yıkanmış ve daha sonra bitkicikler genotiplere göre sürgünleri ince olan OHxF 333 anacında 7'şerli, sürgünleri kalın olan Ahlat 32'de 3'erli ve sürgünleri orta kalınlıkta olan Ahlat 75'de 5'erli demetler halinde bağlanmıştır. Demetler, plastik küvetlere doldurulan suda yüzen strafor viyollerin altındaki deliklere bitkiciklerin 1/3'lük kısmı su içerisinde kalacak şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra yüzen su kültürleri 16 saat aydınlık ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 8 saat karanlık fotoperiyodun uygulandığı $25\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıktaki iklim odasında 4 hafta süreyle inkübe edilmiştir. Yapraklarda anatomik incelemeler ve klorofil analizleri için yaprak örnekleri alınmıştır.

Dış koşullara alıştırılmak üzere yüzen su kültürü tekniği dışında in vitro koşullarda köklendirilmiş bitkicikler uygulamada genellikle yaygın olarak kullanılmakta olan sera koşullarına da taşınmıştır. Bu kapsamda in vitro bitkicikler besin ortamından ayrıldıktan ve agar kalıntılarından temizlendikten sonra %80 torf ve %20 perlit karışımının bulunduğu küçük saksılara doğrudan dikilmiş ve tedrici olarak 4 haftalık periyotta dış koşullara alıştırılmak üzere sıcaklık kontrollü ve mist sistemi bulunan sera koşullarında plastik tünel altına taşınmıştır.

Dış koşullara alıştırma denemelerinde 4 haftalık periyodun sonunda bitkiciklerde canlılık oranı ve canlılık düzeyi (1 = kötü, 2 = orta, 3 = iyi, 4 = çok iyi), sararanların

oranı ve sararma düzeyi (1 = az, 2 = orta, 3 = çok), kararanların oranı ve kararma düzeyi (1 = az, 2 = orta, 3 = çok) belirlenmiştir. Yaşayan bitkiciklerde boy, yaprak sayısı, kök sayısı, en uzun kökün uzunluğu, kök gelişim düzeyi (1= zayıf, 2= orta, 3=iyi, 4= çok iyi) ölçüm ve gözlemleri yapılmıştır.

3.2.5 Dış koşullara alıştırılmış bitkilerin sera koşullarında geliştirilmesi

Tez çalışması kapsamındaki denemelerde dış koşullara alıştırılan bitkiler %80 torf ve %20 perlit karışımının bulunduğu küçük saksılarda sera koşullarında 3 ay geliştirilmiştir. Üç aylık gelişme periyodunun sonunda söküm yapılmadan bitkilerde boy, yaprak sayısı ve gelişme düzeyleri (1 = kötü, 2 = orta, 3 = iyi, 4 = çok iyi) belirlenmiş, anatomik incelemeler ve klorofil analizleri için yaprak örnekleri alınmıştır.

3.2.6 Yaprak örneklerinde anatomik incelemeler ve klorofil analizleri

Yüzen su kültürü tekniği ile in vitro bitkicikleri dış koşullara alıştırma sürecinin sonunda ve bitkilerin sera koşullarında 3 ay geliştirilmesinin ardından anatomik çalışmalar için yaprak örneklerinden el ile alınan kesitler safranin-fast green ikili boyama yöntemi ile boyanmıştır. Yaprak alt ve üst yüzeylerinden alınan kesitlerde stoma sayıları (adet/mm²), stoma indeksi ve stoma indeks oranları hesaplanmıştır. Yaprak enine kesitlerinde yaprak ayasında ortalama yaprak kalınlığı (µm) ölçülmüştür (Algan 1981).

Yaprak örneklerinde klorofil ölçümleri için ise 0.25 g yaprak örneği %80'lik aseton ile ekstrakte edildikten sonra toplam klorofil miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapılmıştır (Arnon 1949, Withan vd. 1971).

Klorofil a (mg/g) = $12.7 \times (A_{663}) - 2.69 \times (A_{645}) \times \text{tamamlanan son hacim}/1000 \times \text{yaş bitki ağırlığı}$

Klorofil b (mg/g) = $22.91 \times (A_{645}) - 4.68 \times (A_{663}) \times \text{tamamlanan son hacim}/1000 \times \text{yaş bitki ağırlığı}$

Toplam klorofil (mg/g) = Klorofil a + Klorofil b

3.2.7 Deneme planı ve verilerin istatistik analizi

Tez çalışmasındaki tüm denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Denemeler en az 2 kez tekrar edilmiştir. Veriler, varyans analizi yöntemi ile Minitab Paket Programı (MINITAB Inc., Trial Version) ile F testine göre kontrol edilmiş, ortaya çıkan önemli farklılıklar Duncan testi ile saptanmış ($P \leq 0.05$) ve farklılıklar harfler yardımıyla belirlenmiştir. Analizlerde yüzde oranların açısı değeri karşılıkları kullanılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *Pyrus* Genotiplerinde İn Vitro Köklendirme Bulguları

Çalışmada yer alan üç *Pyrus* genotipinde mikro çeliklerin in vitro köklenmesi üzerine IBA dozlarının etkisi çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 *Pyrus* genotiplerinde mikro çeliklerin in vitro köklenmesi üzerine IBA dozlarının etkisi^a

IBA (ppm)	Köklenme oranı (%)	Köklenme düzeyi ^b (1-4)	Kallus düzeyi ^b (0-4)
<u>OHxF 333</u>			
250	59.4 ± 6.9 A ^c	2.26 ± 0.14	1.48 ± 0.15 B
500	43.1 ± 8.0 A	2.14 ± 0.29	1.73 ± 0.16 B
1000	9.0 ± 2.3 B	2.43 ± 0.40	2.50 ± 0.33 A
2000	4.0 ± 2.3 B	1.33 ± 0.33	2.83 ± 0.44 A
<i>P</i>			
	0.000^{***}	0.230^{ö.d.}	0.003^{**}
<u>AH-32</u>			
250	60.6 ± 4.5 AB	2.78 ± 0.19	0.96 ± 0.12 C
500	72.5 ± 6.3 A	2.24 ± 0.27	1.50 ± 0.14 B
1000	73.5 ± 11.3 A	2.15 ± 0.23	2.55 ± 0.25 A
2000	37.9 ± 10.6 B	2.48 ± 0.22	2.90 ± 0.19 A
<i>P</i>			
	0.028[*]	0.207^{ö.d.}	0.000^{***}
<u>AH-75</u>			
250	47.4 ± 4.8	2.19 ± 0.08	1.31 ± 0.07 B
500	32.0 ± 6.3	2.15 ± 0.11	1.36 ± 0.11 B
1000	50.0 ± 3.0	1.97 ± 0.12	1.78 ± 0.13 A
2000	56.4 ± 9.6	2.05 ± 0.22	1.96 ± 0.17 A
<i>P</i>			
	0.114^{ö.d.}	0.706^{ö.d.}	0.001^{***}

^a IBA dozları mikro çeliklere aseptik koşullarda 10 saniye süreyle hızlı daldırma yöntemi ile uygulanmış ve kültürler ilk 5 gün tamamen karanlık koşullarda inkübe edilmiştir.

^b Köklenme düzeyi, 1 = zayıf, 2 = orta, 3 = iyi, 4 = çok iyi; kallus düzeyi, 0 = yok, 1 = küçük, 2 = orta, 3 = büyük, 4 = çok büyük.

^c Sütunlardaki farklı harfler Duncan testine ($P \leq 0.05$) göre her genotipte IBA dozları arasındaki farklılığı göstermektedir.

^{ö.d.} F-testine göre farklılıklar önemli değil, * : $P \leq 0.05$, ** : $P \leq 0.01$ ve *** : $P \leq 0.001$ düzeyinde önemli.

4.1.1 OHxF 333 armut klonunda in vitro köklendirme bulguları

OHxF 333 armut klon anacında in vitro köklenme oranı ve köklenmiş mikro çeliklerde kallus düzeyi bakımından IBA dozları arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemli bulunurken, köklenme düzeyi bakımından uygulamalar arasındaki farklılıklar önemli olmamıştır (Çizelge 4.1).

Bu genotipte en yüksek in vitro köklenme oranı 59.4 ± 6.9 ile 250 ppm IBA uygulamasından elde edilmiştir. Bunu 43.1 ± 8.0 ile 500 ppm IBA uygulaması izlemiştir. Bu iki doz arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemsizdir. IBA'nın 1000 ve 2000 ppm dozlarında ise köklenme oranı sırasıyla 9.0 ± 2.3 ve 4.0 ± 2.3 olarak oldukça düşük seviyelerde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.1).

OHxF 333 armut klonunda yüksek IBA dozları kallus gelişimini de önemli düzeyde artırmıştır. Kallus düzeyi (0-4) 1000 ppm ve 2000 ppm IBA dozlarında sırasıyla 2.50 ± 0.33 ve 2.83 ± 0.44 olarak kaydedilmiştir. IBA'nın 250 ve 500 ppm dozlarında ise kallus düzeyi 1.48 ± 0.15 (Şekil 4.1) ve 1.73 ± 0.16 olarak istatistiksel anlamda diğerlerinden önemli düzeyde daha düşük ve benzer değerlerde belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Bu klonda farklı IBA dozlarında köklenme düzeyi 1.33 ± 0.33 ile 2.43 ± 0.40 arasında saptanmış ve tüm değerler aynı istatistik grup içerisinde yer almıştır (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1 OHxF 333 klon anacında 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin görünümü

4.1.2 AH-32 ahlat klonunda in vitro köklendirme bulguları

Bu çalışmada en yüksek in vitro köklenme oranlarının kaydedildiği AH-32 ahlat klonunda bu bakımdan en yüksek değer 73.5 ± 11.3 ile 1000 ppm IBA dozunda belirlenmiş olmakla birlikte bu uygulama ile 500 ppm (72.5 ± 6.3) ve 250 ppm (60.6 ± 4.5) IBA uygulamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemli olmamıştır. Bu genotipte in vitro köklenme oranı 2000 ppm IBA dozunda 37.9 ± 10.6 ile diğer uygulamalardan önemli düzeyde daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Köklenme düzeyinin 2.15 ± 0.23 ile 2.78 ± 0.19 arasında değiştiği bu *Pyrus* genotipinde bu bakımdan IBA dozları arasındaki farklılıklar önemli olmamıştır (Çizelge 4.1).

AH-32 ahlat klonunda da kallus düzeyi IBA dozunun artmasıyla birlikte önemli düzeyde yükselmiş, 1000 ve 2000 ppm IBA uygulamalarında sırasıyla 2.55 ± 0.25 ve 2.90 ± 0.19 olarak saptanmıştır. Oysa 250 ppm IBA uygulamasında kallus düzeyi 0.96 ± 0.12 ile istatistiksel anlamda en düşük seviyede kaydedilmiştir (Şekil 4.2). Bunu 1.50 ± 0.14 ile 500 ppm IBA uygulaması izlemiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.2 AH-32 ahlat klonunda 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin görünümü

4.1.3 AH-75 ahlat klonunda in vitro köklendirme bulguları

AH-75 ahlat klonunda mikro çeliklerin in vitro köklenme oranları ve köklenme düzeyleri üzerine IBA uygulamalarının etkisi istatistiksel anlamda benzer olmuştur. Bu genotipte köklenme oranı 32.0 ± 6.3 ile 56.4 ± 9.6 ve köklenme düzeyi 1.97 ± 0.12 ile 2.19 ± 0.08 arasında değişmiştir. Kallus düzeyi AH-75'te de diğer genotiplerde olduğu gibi IBA dozunun artmasıyla birlikte önemli düzeyde yükselmiştir. Bu değer, 250 ve 500 ppm IBA uygulamalarında 1.31 ± 0.07 (Şekil 4.3) ve 1.36 ± 0.11 iken 1000 ve 2000 ppm IBA uygulamalarında 1.78 ± 0.13 ve 1.96 ± 0.17 (Şekil 4.4) olmuştur (Çizelge 4.1).



Şekil 4.3 AH-75 ahlat klonunda 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin görünümü



Şekil 4.4 AH-75 ahlat klonunda 2000 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin görünümü

4.2 *Pyrus* Genotiplerinde Ex Vitro Köklendirme Bulguları

Bu çalışmada ex vitro koşullarda hızlı daldırma yöntemiyle 250, 500, 1000 ve 2000 ppm IBA uygulanmış, ardından yüzen su kültürü ve sera koşullarında perlit ortama dikilmiş mikro çeliklerde köklenme meydana gelmemiştir.

4.3 İn Vitro Bitkicikleri Dış Koşullara Alıştırma Bulguları

Bu çalışmada *Pyrus* genotiplerinde mikro çelikleri in vitro koşullarda köklendirildikten sonra sera koşullarında plastik tünel altında perlit ortamda dış koşullara alıştırma denemeleri başarısız olmuştur. Bununla birlikte in vitro bitkicikleri yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırma denemeleri başarılı sonuç vermiş ve elde edilen bulgular çizelge 4.2’de sunulmuştur.

4.3.1 OHxF 333 armut klonunda in vitro bitkicikleri yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırma bulguları

Çizelge 4.2’de görüldüğü üzeri OHxF 333 armut klonunda in vitro bitkiciklerin yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırılmasında kültürlerin 4. haftasının sonunda en yüksek canlılık oranı 88.6 ± 5.1 ile in vitro köklendirme aşamasında 250 ppm IBA uygulanmış bitkiciklerde kaydedilmiştir (Şekil 4.5). Bunu 50.9 ± 15.0 ile 500 ppm IBA uygulamasıyla köklendirilmiş bitkicikler izlemiştir. Bu genotipte 1000 ve 2000 ppm IBA ile köklendirilmiş olanlarda canlılık oranı 18.1 ± 11.2 ve 4.3 ± 3.0 olarak çok düşük düzeylerde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2).

Dış koşullara alıştırılmış bitkiciklerde canlılık düzeyi, köklendirme aşamasında 500 ppm IBA uygulanmışlarda 3.41 ± 0.35 ile diğerlerinden önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Bunu 2.55 ± 0.14 ve 2.30 ± 0.87 ile sırasıyla 250 ve 1000 ppm IBA uygulamaları takip etmiştir. Bu iki değer arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır. Köklendirme aşamasında 2000 ppm IBA uygulanmış bitkiciklerde ise canlılık düzeyi bir hayli düşük seviyede (0.89 ± 0.24) gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 *Pyrus* genotiplerinde in vitro köklendirme aşamasında uygulanan IBA dozlarının, yüzen su kültürü tekniği ile bitkicikleri dış koşullara alıştırmada canlılık oranı, canlılık düzeyi ve gelişme özellikleri üzerine etkileri

Özellik	IBA Dozları				P
	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	2000 ppm	
<u>OHxF 333</u>					
Canlılık oranı (%)	88.6 ± 5.1 A ^b	50.9 ± 15.0 B	18.1 ± 11.2 C	4.3 ± 3.0 C	0.000 ^{***}
Canlılık düzeyi (1-4) ^a	2.55 ± 0.14 B	3.41 ± 0.35 A	2.30 ± 0.87 B	0.89 ± 0.24 C	0.008 ^{**}
Bitkicik boyu (cm)	3.2 ± 0.2 A	2.8 ± 0.3 A	1.7 ± 0.7 B	0.9 ± 0.3 C	0.008 ^{**}
Yaprak sayısı (adet)	4.3 ± 0.4 AB	5.4 ± 0.8 A	3.1 ± 1.1 B	1.3 ± 0.7 C	0.023 [*]
Kök sayısı (adet)	3.1 ± 0.5 B	4.0 ± 0.5 B	5.7 ± 1.0 A	0.6 ± 0.2 C	0.016 [*]
En uzun kök uzunluğu (cm)	1.8 ± 0.2 A	1.7 ± 0.3 A	1.4 ± 0.7 A	0.3 ± 0.3 B	0.039 [*]
Kök gelişim düzeyi (1-4) ^b	2.03 ± 0.13 A	2.57 ± 0.27 A	2.03 ± 0.85 A	0.63 ± 0.21 B	0.008 ^{**}
<u>AH-32</u>					
Canlılık oranı (%)	66.7 ± 10.2 A	0.0 ± 0.0 C	16.7 ± 7.4 B	0.0 ± 0.0 C	0.000 ^{***}
Canlılık düzeyi (1-4) ^a	1.86 ± 0.33	-	1.89 ± 0.56	-	0.968 ^{ö.d.}
Bitkicik boyu (cm)	0.9 ± 0.3	-	1.4 ± 0.6	-	0.487 ^{ö.d.}
Yaprak sayısı (adet)	4.5 ± 1.1	-	3.7 ± 1.3	-	0.638 ^{ö.d.}
Kök sayısı (adet)	0.9 ± 0.2	-	1.2 ± 0.3	-	0.407 ^{ö.d.}
En uzun kök uzunluğu (cm)	2.0 ± 0.5	-	2.3 ± 1.2	-	0.822 ^{ö.d.}
Kök gelişim düzeyi (1-4) ^b	1.26 ± 0.26	-	1.22 ± 0.11	-	0.911 ^{ö.d.}
<u>AH-75</u>					
Canlılık oranı (%)	66.7 ± 13.3 A	0.0 ± 0.0 B	0.0 ± 0.0 B	46.7 ± 6.7 A	0.000 ^{***}
Canlılık düzeyi (1-4) ^a	2.13 ± 0.59	-	-	1.67 ± 0.29	0.519 ^{ö.d.}
Bitkicik boyu (cm)	1.6 ± 0.3	-	-	1.0 ± 0.1	0.192 ^{ö.d.}
Yaprak sayısı (adet)	4.8 ± 0.6	-	-	3.7 ± 0.4	0.188 ^{ö.d.}
Kök sayısı (adet)	1.3 ± 0.3	-	-	0.9 ± 0.1	0.165 ^{ö.d.}
En uzun kök uzunluğu (cm)	1.6 ± 0.6	-	-	0.6 ± 0.1	0.140 ^{ö.d.}
Kök gelişim düzeyi (1-4) ^b	1.30 ± 0.25	-	-	0.90 ± 0.06	0.196 ^{ö.d.}

^a Canlılık düzeyi, 1 = kötü, 2 = orta, 3 = iyi, 4 = çok iyi; kök gelişim düzeyi, 1 = zayıf, 2 = orta, 3 = iyi, 4 = çok iyi.

^b Aynı satırdaki harfler Duncan testine ($P \leq 0.05$) göre IBA dozları arasındaki istatistiksel farklılığın durumunu göstermektedir.

^{ö.d.} F-testine göre aradaki farklılıklar önemli değil, * : $P \leq 0.05$, ** : $P \leq 0.01$ ve *** : $P \leq 0.001$ düzeyinde önemli.

OHxF 333 armut klonunda köklenme aşamasında düşük IBA dozu uygulanmış bitkiciklerin dış koşullara alıştırma aşamasında boyu istatistiksel anlamda önemli bir farklılıkla daha yüksek bulunmuştur. İn vitro köklendirmede 250 ve 500 ppm IBA uygulanmış bitkiciklerde dış koşullara alışma sonrasında boy değerleri sırasıyla 3.2 ± 0.2 cm ve 2.8 ± 0.3 cm olarak ölçülmüştür. Bu iki değer arasındaki farklılık önemsizdir. Bu değerleri 1.7 ± 0.7 cm ile 1000 ppm ve 0.9 ± 0.3 cm ile 2000 ppm IBA uygulaması ile köklendirilmiş bitkicikler izlemiştir (Çizelge 4.2).

Yaprak sayısı bakımından da düşük IBA dozları ile köklendirilmiş bitkiciklerde daha iyi sonuç alınmıştır. Köklenme aşamasında 250 ve 500 ppm IBA uygulanmış bitkiciklerde yaprak sayısı sırasıyla 4.3 ± 0.4 adet ve 5.4 ± 0.8 adet olarak kaydedilmiştir. Bu değerler 1000 ppm (3.1 ± 1.1 adet) ve 2000 ppm (1.3 ± 0.7 adet) IBA uygulanmış olanlardan daha yüksektir (Çizelge 4.2).

Bu armut klonunda bitkiciklerde en yüksek kök sayısı 5.7 ± 1.0 adet ile istatistiksel anlamda önemli bir farklılıkla in vitro köklendirme aşamasında 1000 ppm IBA uygulanmış olanlarda saptanmış, 250 ve 500 ppm IBA uygulanmış olanlar sırasıyla 3.1 ± 0.5 adet ve 4.0 ± 0.5 adet ile bunu takip etmiştir. Çalışmanın en yüksek IBA dozu olan 2000 ppm uygulamasında ise bu genotipin dış koşullara alışmış bitkilerindeki ortalama kök sayısı 0.6 ± 0.2 adet ile en düşük seviyede kaydedilmiştir (Çizelge 4.2).

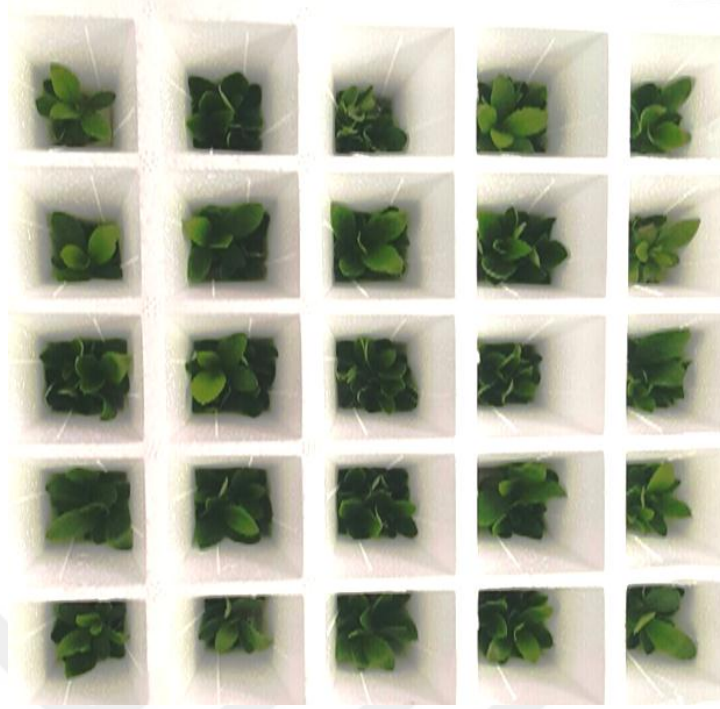
OHxF 333 klonunda dış koşullara alışmış bitkilerde en uzun kökün uzunluğu köklenme aşamasında 250, 500 ve 1000 ppm IBA uygulanmış olanlarda istatistiksel anlamda benzer değerlerde, 1.4 ± 0.7 cm ile 1.8 ± 0.2 cm arasında değişirken, 2000 ppm IBA uygulanmış olanda çok düşük (0.3 ± 0.3 cm) saptanmıştır. Kök gelişim düzeyi de benzer bir seyir göstermiş, 250, 500 ve 1000 ppm IBA uygulanmış olanlarda (2.03 ± 0.13 - 2.57 ± 0.27), 2000 ppm uygulanmış olandan (0.63 ± 0.21) önemli bir farklılıkla daha yüksek değerlerde bulunmuştur (Çizelge 4.2).



Şekil 4.5 OHxF 333 klon anacında 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alışıma 4 haftalık bitkiciklerin strafor viyol içinde görünümü

4.3.2 AH-32 ahlal klonunda in vitro bitkicikleri yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırma bulguları

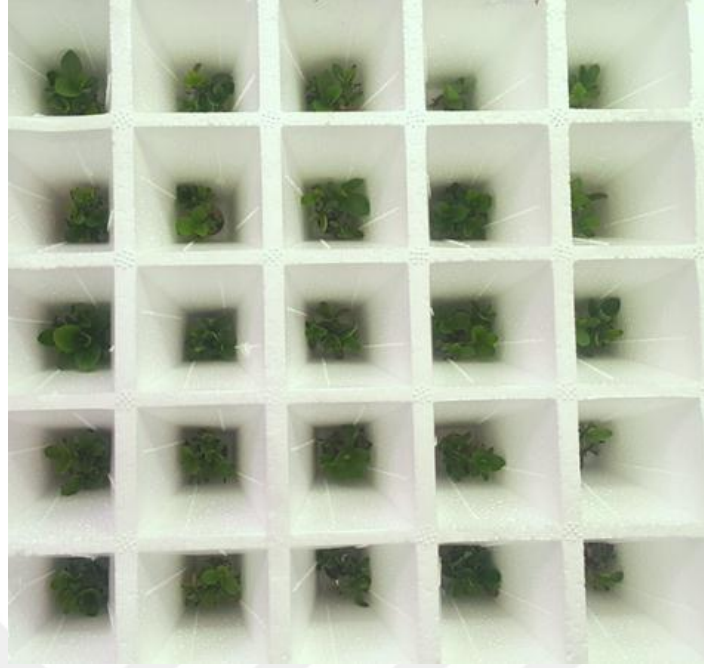
AH-32 klonunda in vitro bitkiciklerin dış koşullara alıştırılmasında en yüksek canlılık oranı 66.7 ± 10.2 ile köklenme aşamasında 250 ppm IBA uygulanmış olanlarda kaydedilmiştir (Şekil 4.6). Köklenme aşamasında 500 ve 2000 ppm IBA uygulanmış olan in vitro bitkicikler dış koşullara alışamamış, 1000 ppm IBA uygulanmış olanlar ise sadece 16.7 ± 7.4 oranında dış koşullara alışıarak canlı kalabilmiştir (Çizelge 4.2). Bu ahlal genotipinde dış koşullara alışıma bitkiciklerin canlılık düzeyi ve bitki gelişme özellikleri üzerine köklendirme aşamasında 250 ve 1000 ppm IBA uygulanmış olanlar arasındaki farklılıklar ise istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. Canlılık düzeyi sırasıyla 1.86 ± 0.33 ile 1.89 ± 0.56 , bitkicik boyu 0.9 ± 0.3 cm ile 1.4 ± 0.6 cm ve yaprak sayısı 4.5 ± 1.1 adet ile 3.7 ± 1.3 adet arasında kaydedilmiştir. Kök sayısı 0.9 ± 0.2 adet ile 1.2 ± 0.3 adet, en uzun kökün uzunluğu 2.0 ± 0.5 cm ile 2.3 ± 1.2 cm ve kök gelişim düzeyi de 1.26 ± 0.26 ile 1.22 ± 0.11 arasında belirlenmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.6 AH-32 ahlat klonunda 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alışmış 4 haftalık bitkiciklerin strafor viyol içinde görünümü

4.3.3 AH-75 ahlat klonunda in vitro bitkicikleri yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırma bulguları

AH-75 klonunda ise köklenme aşamasında sadece 250 ve 2000 ppm IBA uygulanmış in vitro bitkicikler dış koşullara alışabilmiştir. Bu iki uygulamadan gelen bitkiciklerin yüzen su kültürlerinde dış koşullara alışma sürecinin sonunda canlı kalma oranları 66.7 ± 13.3 ve 46.7 ± 6.7 olarak belirlenmiş ve değerler istatistiksel anlamda benzer olmuştur. Dış koşullara alışmış bitkiciklerde canlılık düzeyi ve bitkiciklerin gelişme özellikleri arasında da istatistiksel bakımdan farklılıklar kaydedilmemiştir. Canlılık düzeyi sırasıyla 2.13 ± 0.59 ile 1.67 ± 0.29 , bitkicik boyu 1.6 ± 0.3 cm ile 1.0 ± 0.1 cm ve yaprak sayısı 4.8 ± 0.6 adet ile 3.7 ± 0.4 adet arasında saptanmıştır. Kök sayısı 1.3 ± 0.3 adet ile 0.9 ± 0.1 adet, en uzun kökün uzunluğu 1.6 ± 0.6 cm ile 0.6 ± 0.1 cm ve kök gelişim düzeyi 1.30 ± 0.25 ile 0.90 ± 0.06 arasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.7 AH-75 ahlat klonunda 250 ppm IBA uygulaması ile in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerin yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alışmış 4 haftalık bitkiciklerin strafor viyol içinde görünümü

4.3.4 Yüzen su kültürü tekniği ile in vitro bitkicikleri dış koşullara alıştırma bakımından *Pyrus* genotiplerinin karşılaştırılması

Pyrus genotiplerinde in vitro bitkiciklerin yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırılmasında köklendirme aşamasında 250 ppm IBA uygulaması, 500 ppm, 1000 ppm ve 2000 ppm IBA dozlarına göre daha etkili bulunmuştur (Çizelge 4.2). Bu nedenle sonraki in vitro köklendirme denemelerinde 250 ppm IBA uygulaması esas alınmıştır. Bu uygulama ile üç *Pyrus* genotipinde in vitro bitkiciklerin yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alışma performansları çizelge 4.3’de karşılaştırılmıştır.

Çalışmada yüzen su kültürü tekniği ile in vitro bitkicikleri dış koşullara alıştırmada bitkilerde canlılık oranı, boy, kök sayısı, en uzun kökün uzunluğu ve kök gelişim düzeyi bakımından genotipler arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemli bulunurken, canlılık düzeyi ve yaprak sayısı bakımından ortaya çıkan farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Yüzen su kültürü tekniği ile in vitro bitkicikleri dış koşullara alıştırmada bitkiciklerde canlılık oranı, düzeyi ve gelişme özellikleri bakımından *Pyrus* genotiplerinin karşılaştırılması^a

Özellik	OHxF 333	AH-32	AH-75	P
Canlılık oranı (%)	84.0 ± 3.8 A ^c	62.7 ± 4.4 B	64.7 ± 7.6 B	0.000***
Canlılık düzeyi (1-4) ^b	2.74 ± 0.12	2.27 ± 0.18	2.35 ± 0.30	0.167 ^{ö.d.}
Bitkicik boyu (cm)	3.2 ± 0.2 A	1.4 ± 0.1 B	1.6 ± 0.2 B	0.000***
Yaprak sayısı (adet)	4.0 ± 0.2	3.9 ± 0.4	4.6 ± 0.6	0.493 ^{ö.d.}
Kök sayısı (adet)	5.5 ± 0.4 A	0.9 ± 0.1 B	1.4 ± 0.1 B	0.000***
En uzun kök uzunluğu (cm)	1.3 ± 0.1 B	4.5 ± 0.4 A	1.1 ± 0.3 B	0.000***
Kök gelişim düzeyi (1-4) ^b	2.56 ± 0.13 A	1.60 ± 0.17 B	1.53 ± 0.17B	0.000***

^a Köklendirme aşamasında mikro çeliklere 250 ppm IBA dozu aseptik koşullarda hızlı daldırma yöntemi ile 10 saniye süreyle uygulanmıştır.

^b Canlılık düzeyi, 1 = kötü, 2 = orta, 3 = iyi, 4 = çok iyi; kök gelişim düzeyi, 1 = zayıf, 2 = orta, 3 = iyi, 4 = çok iyi.

^c Aynı satırdaki harfler Duncan testine ($P \leq 0.05$) göre genotipler arasındaki istatistiksel farklılığın durumunu göstermektedir.

^{ö.d.} F-testine göre aradaki farklılıklar önemli değil, * : $P \leq 0.05$, ** : $P \leq 0.01$ ve *** : $P \leq 0.001$ düzeyinde önemli.

Çalışmada genel olarak OHxF 333 armut klonunun in vitro bitkiciklerinin dış koşullara alışma performansı, AH-32 ve AH-75 ahlal klonlarından daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.3). Dört haftalık dış koşullara alıştırma sürecinin sonunda bitkiciklerde canlılık oranı OHxF 333 klonunda %84.0±3.8 ile istatistiksel anlamda önemli bir farklılıkla ahlal klonlarından daha yüksek bulunmuştur. OHxF 333'ü, %64.7±7.6 ile AH-75 ve %62.7±4.4 ile AH-32 izlemiştir. Bu bakımdan ahlal klonları arasındaki farklılık önemli olmamıştır. *Pyrus* genotiplerinde bitkiciklerin canlılık düzeyi 2.27±0.18 ile 2.74±0.12 arasında değişmiştir. Bu bakımdan genotipler benzer değerlere sahip olmuştur. OHxF 333 klonunda mikro çoğaltılmış bitkiciklerin boyu 3.2±0.2 cm ile her iki ahlal klonundan (1.4±0.1 cm ve 1.6±0.2 cm) önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Ahlal klonları arasındaki farklılık ise önemli olmamıştır. Yaprak sayısı yönünden her üç *Pyrus* genotipi de istatistiksel anlamda benzer değerlere sahip olmuş ve yaprak sayıları 3.9±0.4 adet ile 4.6±0.6 adet arasında değişmiştir. İn vitro bitkiciklerin dış koşullara alışmasında OHxF 333 klonunun yüksek performansı, kök sayısı ve kök gelişim düzeyin de de ortaya çıkmıştır. Ortalama kök sayısı OHxF 333 klonunda 5.5±0.4 adet ile ahlal klonlarından (0.9±0.1 adet ve 1.4±0.1 adet) önemli düzeyde daha yüksek saptanmıştır. Kök gelişim düzeyi de OHxF 333 klonunda 2.56±0.13 ile ahlal

klonlarından (1.60 ± 0.17 ve 1.53 ± 0.17) daha yüksek olmuştur. Her iki parametre bakımından ahlal klonları arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemli olmamıştır. En uzun kökün uzunluğu ise AH-32 ahlal klonunda 4.5 ± 0.4 cm ile OHxF 333 ve AH-75 klonlarından daha yüksek kaydedilmiştir (Çizelge 4.3).

Çalışmada yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırılmış in vitro bitkiciklerde incelenen yaprak anatomik özelliklerinden sadece yaprak alt yüzeyi stoma indeksi bakımından genotipler arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemli bulunurken, diğer parametreler bakımından ortaya çıkan farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Yüzen su kültürü ile dış koşullara alıştırılmış in vitro bitkiciklerin yaprak anatomik özellikleri yönünden *Pyrus* genotiplerinin karşılaştırılması^a

Özellik	OHxF 333	AH-32	AH-75	P
<u>Yaprak Üst Kesit Yüzeyi</u>				
Stoma sayısı (adet/mm ²)	275.8 ± 49.0	252.0 ± 69.1	211.0 ± 50.5	0.726^{ö.d.}
Stoma indeksi (%)	93.8 ± 1.2	93.2 ± 1.7	93.1 ± 2.2	0.956^{ö.d.}
<u>Yaprak Alt Kesit Yüzeyi</u>				
Stoma sayısı (adet/mm ²)	208.3 ± 23.8	153.6 ± 29.2	213.8 ± 6.4	0.183^{ö.d.}
Stoma indeksi (%)	92.3 ± 0.9 AB ^b	89.4 ± 2.0 B	95.5 ± 0.1 A	0.038*
Yaprak stoma indeks oranı	1.02 ± 0.02	1.06 ± 0.01	0.97 ± 0.02	0.102^{ö.d.}
Yaprak mezofil kalınlığı (µm)	170.3 ± 11.2	153.0 ± 18.2	173.7 ± 11.6	0.569^{ö.d.}

^a Köklendirme aşamasında mikro çeliklere 250 ppm IBA dozu aseptik koşullarda hızlı daldırma yöntemi ile 10 saniye süreyle uygulanmıştır.

^b Aynı satırdaki harfler Duncan testine ($P \leq 0.05$) göre genotipler arasındaki istatistiksel farklılığın durumunu göstermektedir.

^{ö.d.} F-testine göre aradaki farklılıklar önemli değil, *: $P \leq 0.05$ düzeyinde önemli.

Pyrus genotiplerinde yaprak üst kesit yüzeyinde stoma sayısı 211.0 ± 50.5 adet/mm² ile 275.8 ± 49.0 adet/mm², stoma indeksi % 93.1 ± 2.2 ile % 93.8 ± 1.2 arasında belirlenmiştir. Yaprak alt kesit yüzeyinde stoma sayısı genotiplerde istatistiksel anlamda benzer olarak 153.6 ± 50.5 adet/mm² ile 213.8 ± 6.4 adet/mm² adet arasında saptanırken, stoma indeksi önemli bir farklılıkla AH-75 ahlal ve OHxF 333 armut klonlarında sırasıyla % 95.5 ± 0.1 ve % 92.3 ± 0.9 ile AH-32 ahlal klonundan (% 89.4 ± 2.0) daha yüksek bulunmuştur. Yaprak stoma indeks oranı da *Pyrus* genotiplerinde 0.97 ± 0.02 ile 1.06 ± 0.01 arasında saptanmıştır. Yaprak mezofil kalınlığı bakımından da genotipler benzer sonuçlara sahip

olmuştur. Bu parametre $153.0 \pm 18.2 \mu\text{m}$ (AH-32) ile $173.7 \pm 11.6 \mu\text{m}$ (AH-75) arasında belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Yüzen su kültürü tekniği ile dış koşullara alıştırılmış in vitro bitkiciklerde klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil bakımından *Pyrus* genotipleri arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Yüzen su kültürü ile dış koşullara alıştırılmış in vitro bitkiciklerin klorofil özellikleri yönünden *Pyrus* genotiplerinin karşılaştırılması^a

Özellik	OHxF 333	AH-32	AH-75	P
Klorofil a (mg/g)	0.0565 ± 0.0045 B ^b	0.0760 ± 0.0020 B	0.1413 ± 0.0265 A	0.029 ^{*c}
Klorofil b (mg/g)	0.5870 ± 0.0302 B	0.7350 ± 0.0200 A	0.7303 ± 0.0096 A	0.009 ^{**}
Toplam klorofil (mg/g)	0.6160 ± 0.0341 B	0.8110 ± 0.0220 AB	0.8136 ± 0.0108 A	0.001 ^{***}

^a Köklendirme aşamasında mikro çeliklere 250 ppm IBA dozu aseptik koşullarda hızlı daldırma yöntemi ile 10 saniye süreyle uygulanmıştır.

^b Aynı satırdaki harfler Duncan testine ($P \leq 0.05$) göre genotipler arasındaki istatistiksel farklılığın durumunu göstermektedir.

^c F-testine göre aradaki farklılıklar * : $P \leq 0.05$, ** : $P \leq 0.01$ ve *** : $P \leq 0.001$ düzeyinde önemli.

Çalışmada yer alan *Pyrus* genotipleri arasından ahlat klonlarının genel olarak klorofil değerlerinin OHxF 333 armut klonundan daha yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5). Klorofil a miktarı bakımından en yüksek değer 0.1413 ± 0.0265 mg/g ile AH 75 klonunda belirlenirken, klorofil b 0.7350 ± 0.0200 mg/g ve 0.7303 ± 0.0096 mg/g ile AH-32 ve AH-75 klonlarında tespit edilmiştir. Toplam klorofil miktarı da ahlat klonlarında, OHxF 333 armut klonundan önemli düzeyde daha yüksek kaydedilmiştir. Bu değer, OHxF 333 armut klonunda 0.6160 ± 0.0341 mg/g iken AH-75 ve AH-32 klonlarında sırasıyla 0.8136 ± 0.0108 mg/g ve 0.8110 ± 0.0220 mg/g olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5).

4.4 Sera Koşullarında Geliştirilen Üç Aylık Bitkilere Ait Bulgular

Pyrus genotiplerinin 250 ppm IBA ile in vitro koşullarda köklendirilmiş ve yüzen su kültürü tekniği ile 4 haftalık süreçte dış koşullara alıştırılmış olan bitkicikleri %80 torf ve %20 perlit karışımının bulunduğu küçük saksılara dikilerek sera koşullarında üç ay süreyle gelişmeye alınmıştır. Bu sürecin başından itibaren ahlat klonlarında bitkilerin

tamamı kaybedilmiştir. OHxF 333 armut klonunun bitkileri ise üç aylık gelişme periyodunu başarıyla tamamlamıştır. Bu klon anaçta 71 adet bitkide üç aylık bitkilerin gelişme özelliklerine ait ortalama bulgular çizelge 4.6'da sunulmuştur. Çizelge 4.6'da görülebileceği gibi OHxF 333 klonunda sera koşullarında üç aylık periyotta bitki boyu 1.5 kat artış göstererek 4.9 cm'ye, yaprak sayısı 3.2 kat artarak 13.0 adede ulaşmıştır. Bitkilerin gelişmesi iyi düzeyde (3.1 seviyesinde) kaydedilmiştir (Şekil 4.8).

Çizelge 4.6 OHxF 333 armut klon anacının üç aylık bitkilerinin bazı gelişme özellikleri^a

Özellik	OHxF 333
Bitki boyu (cm)	4.9 ± 0.2
Yaprak sayısı (adet)	13.0 ± 0.3
Bitki gelişme düzeyi (1-4)	3.1 ± 0.1
<u>Yaprak Üst Kesit Yüzeyi</u>	
Stoma sayısı (adet/mm ²)	122.8 ± 0.5
Stoma indeksi (%)	81.9 ± 0.1
<u>Yaprak Alt Kesit Yüzeyi</u>	
Stoma sayısı (adet/mm ²)	267.9 ± 24.3
Stoma indeksi (%)	90.7 ± 0.8
Yaprak stoma indeks oranı	0.9 ± 0.01
Yaprak mezofil kalınlığı (µm)	194.81 ± 4.6
Klorofil a (mg/g)	0.0793 ± 0.0088
Klorofil b (mg/g)	0.6033 ± 0.0311
Toplam klorofil (mg/g)	0.6827 ± 0.0288

^a İn vitro bitkicikler yüzen su kültürü ile iklim odasında dış koşullara alıştırılmış ve ardından sera koşullarına taşınmıştır.



Şekil 4.8 OHxF 333 klon anacının sera koşullarında gelişmiş 3 aylık bitkilerinin görünümü

OHxF 333 klonunda incelenen yaprak anatomik özellikleri bakımından yaprak üst kesit yüzeyinde stoma sayısı (122.8 ± 0.5 adet/ mm^2) ve stoma indeksi ($\%81.9 \pm 0.1$), sera koşullarındaki bitkilerde, yüzen su kültüründen çıkartılanlara göre önemli düzeyde azalmıştır (Çizelge 4.6 ve 4.7). Bahçe koşullarındaki ana bitkilerin yaprak anatomik özellikleri ve klorofil özellikleri ile de karşılaştırmaların yapıldığı bu tez çalışmasında OHxF 333 klonunda, ahlut klonlarında olduğu gibi yapraklarının üst kesit yüzeylerinde stoma tespit edilememiştir (Çizelge 4.7).

Yaprak alt kesit yüzeyindeki stoma sayısı bakımından ise OHxF 333 klonunda sera koşullarında geliştirilmiş üç aylık bitkiler, yüzen su kültüründen çıkartılmış bitkiler ile istatistiksel anlamda benzer bulgular ortaya koymuştur (Çizelge 4.7). Her iki gelişme aşamasına göre bahçe koşullarındaki bitkilerin yaprak alt kesit yüzeyindeki stoma sayısının önemli düzeyde daha düşük olduğu (160.8 ± 11.7 adet/ mm^2) bu genotipte yaprak alt kesit yüzeyi stoma indeksi değerleri arasında ise önemli bir farklılık kaydedilmemiştir. Yaprak stoma indeksi üç aylık bitkilerde 0.90 ± 0.01 ile yüzen su kültüründen çıkartılmış bitkilere göre önemli düzeyde daha düşük bulunmuştur. Yaprak mezofil kalınlığı ise tüm gelişme aşaması ve koşulda istatistiksel anlamda benzer sonuçlar vermiş ve 170.3 ± 11.2 μm ile 194.8 ± 4.6 μm arasında tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 *Pyrus* genotiplerinde yüzen su kültüründen çıkartılan, sera koşullarında geliştirilen bitkiler ve bahçe koşullarındaki ana bitkilerin yaprak anatomik özellikleri ve klorofil özelliklerinin karşılaştırılması

Özellik	Yüzen su kültüründen çıkartılan bitkiler	Üç ay serada geliştirilen bitkiler	Bahçe koşullarındaki ana bitkiler	P
OHxF 333				
Yaprak Üst Kesit Yüzevi				
Stoma sayısı (adet/mm ²)	275.8 ± 49.0 A ^a	122.8 ± 0.5 B	0.0 ± 0.0	0.036*
Stoma indeksi (%)	93.8 ± 1.2 A	81.9 ± 0.1 B	0.0 ± 0.0	0.001***
Yaprak Alt Kesit Yüzevi				
Stoma sayısı (adet/mm ²)	208.3 ± 23.8 AB	267.9 ± 24.3 A	160.8 ± 11.7 B	0.030*
Stoma indeksi (%)	92.3 ± 0.9	90.7 ± 0.8	89.3 ± 0.7	0.109^{ö.d.}
Yaprak stoma indeksi oranı	1.02 ± 0.02 A	0.90 ± 0.01 B	0.0 ± 0.0	0.008**
Yaprak mezofil kalınlığı (µm)	170.3 ± 11.2	194.8 ± 4.6	191.8 ± 2.7	0.098^{ö.d.}
Klorofil a (mg/g)	0.0565 ± 0.0045	0.0793 ± 0.0088	0.0410	0.098^{ö.d.}
Klorofil b (mg/g)	0.5870 ± 0.0302	0.6033 ± 0.0311	0.4830	0.339^{ö.d.}
Toplam klorofil (mg/g)	0.6160 ± 0.0341	0.6827 ± 0.0288	0.5240	0.133^{ö.d.}
AH-32				
Yaprak Üst Kesit Yüzevi				
Stoma sayısı (adet/mm ²)	252.0 ± 69.1	-	0.0 ± 0.0	-
Stoma indeksi (%)	93.2 ± 1.7	-	0.0 ± 0.0	-
Yaprak Alt Kesit Yüzevi				
Stoma sayısı (adet/mm ²)	153.6 ± 29.2	-	133.4 ± 24.2	0.622^{ö.d.}
Stoma indeksi (%)	89.4 ± 2.0	-	84.6 ± 2.2	0.185^{ö.d.}
Yaprak stoma indeksi oranı	1.06 ± 0.01	-	0.0 ± 0.0	-
Yaprak mezofil kalınlığı (µm)	153.0 ± 18.2	-	202.4 ± 4.8	0.059^{ö.d.}
Klorofil a (mg/g)	0.0760 ± 0.0020 A	-	0.0270 B	0.045*
Klorofil b (mg/g)	0.7350 ± 0.0200	-	0.5310	0.107^{ö.d.}
Toplam klorofil (mg/g)	0.8110 ± 0.0220	-	0.5580	0.095^{ö.d.}
AH-75				
Yaprak Üst Kesit Yüzevi				
Stoma sayısı (adet/mm ²)	211.0 ± 50.5	-	0.0 ± 0.0	-
Stoma indeksi (%)	93.1 ± 2.2	-	0.0 ± 0.0	-
Yaprak Alt Kesit Yüzevi				
Stoma sayısı (adet/mm ²)	213.8 ± 6.4 A	-	146.7 ± 6.8 B	0.002**
Stoma indeksi (%)	95.5 ± 0.1 A	-	90.7 ± 0.4 B	0.000***
Yaprak stoma indeksi oranı	0.97 ± 0.02	-	0.0 ± 0.0	-
Yaprak mezofil kalınlığı (µm)	173.7 ± 11.6	-	165.2 ± 4.0	0.530^{ö.d.}
Klorofil a (mg/g)	0.1413 ± 0.0265	-	0.0300	0.157^{ö.d.}
Klorofil b (mg/g)	0.7303 ± 0.0096	-	0.6790	0.924^{ö.d.}
Toplam klorofil (mg/g)	0.8136 ± 0.0108 A	-	0.7090 B	0.017*

^a Aynı satırdaki harfler Duncan testine ($P \leq 0.05$) göre genotipler arasındaki istatistiksel farklılığın durumunu göstermektedir.

^{ö.d.} F-testine göre aradaki farklılıklar önemli değil, *: $P \leq 0.05$ düzeyinde önemli.

OHxF 333 klonunda incelenen klorofil özellikleri bakımından bitkilerde gelişme aşamaları ve bahçe koşulları arasında önemli farklılıklar kaydedilmemiştir. Üç aylık bitkilerde klorofil a 0.0793 ± 0.0088 mg/g, klorofil b 0.6033 ± 0.0311 mg/g ve toplam klorofil 0.6827 ± 0.0288 mg/g olarak saptanmıştır (Çizelge 4.6 ve 4.7).

Ahlat klonlarında bitkilerin sera koşullarında canlı kalamadığı bu tez çalışmasında AH-32 klonunda yüzen su kültüründen çıkartılmış bitkiler, bahçe koşullarındaki bitkilerden sadece klorofil a bakımından önemli düzeyde bir farklılık göstermiştir. Yüzen su kültüründen çıkartılmış bitkilerde bu değer 0.0760 mg/g ile bahçe koşullarındaki bitkilerin yapraklarında belirlenen değerden (0.0270 mg/g) daha yüksektir. AH-75 klonunda ise OHxF 333 klonu gibi yaprak alt kesit yüzeyinde stoma sayısı bakımından bahçe koşullarındaki bitkilerin yapraklarında kaydedilen değer (146.7 ± 6.8 adet/mm²) daha düşüktür. Ayrıca bu klonda yaprak alt kesit yüzeyi stoma indeksi de (90.7 ± 0.4) bahçe koşullarındaki bitkilerin yapraklarında önemli düzeyde daha düşüktür. Benzer durum toplam klorofil değerinde de gözlenmiş, yüzen su kültüründen çıkartılan bitkilerde 0.8136 mg/g olan toplam klorofil, bahçe koşullarındaki bitkilerin yaprağında 0.7190 mg/g olarak saptanmıştır (Çizelge 4.7).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, bazı *Pyrus* genotiplerinin in vitro koşullarda köklendirilmiş mikro çeliklerinin dış koşullara alıştırılmasında ve mikro çeliklerin ex vitro koşullarda köklendirilmesinde yüzen su kültürü tekniğinin (float hydroculture) kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Çalışma, OHxF 333 standart armut klon anacı (*P. communis* L.) ve iki ahlat klonu (*P. elaeagnifolia* Pall.) üzerinde yürütülmüştür.

Çalışmada in vitro köklendirme, aseptik koşullarda mikro çeliklere 250, 500, 1000 ve 2000 ppm IBA'nın hızlı daldırma yöntemiyle 10 saniye süreyle uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Kültürler, ilk 5 gün karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. İbrahim Ahmed Osman ve Dumanoglu (2020), IBA uygulaması yapılmadığında bu genotiplerde mikro çeliklerin köklenmediğini belirtmişlerdir. Çalışmada *Pyrus* genotiplerinde in vitro köklenme, IBA dozlarına göre değişen düzeylerde uyarılmıştır. IBA, stabil yapısı, bitkilere toksik olmaması, doz aralığının geniş olması ve çok sayıda bitki türünde etkili olması nedeniyle köklendirme amacıyla yaygın olarak kullanılan bir oksin tipidir (Nordstrom vd. 1991, Epstein ve Ludwig-Müller 1993, Hartmann vd. 2011). Hızlı daldırma metodu, etil alkol içerisinde çözünmüş oksinin çeliklerin sadece kesim yüzeyinden değil aynı zamanda çözeltiye batırılmış gövde alanı boyunca da epidermisten girişine ve hareketine olanak sağlayan etkin bir yöntemdir (Geneve 2000). Karanlık uygulamaları, mikro çeliklerde adventif kök oluşumunu artıran etkili bir uygulamadır. Elma mikro çeliklerinde (*M. prunifolia* var. Ringo) karanlık uygulamasının içsel oksin artışı yoluyla adventif kök oluşumunu sağladığı ve oksin artışının *MdARF1*, *MdGH3;1*, *MdPAT1-1*; *MdPIN1*, *MdCRF2*, *MdCRF4* ve *MdRR10* gibi oksin ve sitokininler ile ilişkili genlerin karanlık uygulaması ile uyarılmasıyla meydana geldiği gösterilmiştir (Li vd. 2022). Bu tez çalışmasında OHxF 333 armut klon anacında in vitro koşullarda en yüksek köklenme oranları %59.4 ve %43.1 ile sırasıyla 250 ve 500 ppm IBA uygulamalarından elde edilmiştir. IBA'nın 1000 ve 2000 ppm dozlarında ise köklenme oranları sırasıyla %9.0 ve %4.0 ile çok düşük seviyelerde kalmıştır. Bu armut anacında dört IBA dozunun köklenme düzeyi üzerine etkileri (1-4) ise istatistiksel anlamda farklılık göstermemiş ve 1.33 ± 0.33 ile 2.43 ± 0.40 arasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.1). Bulgularımız, Alizadeh vd.'nin (2018) OHxF 333 armut

klon anacında mikro çeliklerin in vitro köklenmesi üzerine hızlı daldırma yöntemiyle 200 ppm IBA uygulamasından elde ettikleri bulgular ile uyumludur. Araştırmacılar bu uygulama ile mikro çeliklerde köklenme oranını %66.7 ve köklenme düzeyini de 2.37 olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda AH-32 ahlat klonunda in vitro köklenmenin, OHxF 333 armut anacından daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Bu ahlat klonunda en yüksek köklenme sonuçları 250, 500 ve 1000 ppm IBA uygulamalarından %60.6 ile %73.5 arasında değişen oranlarda elde edilmiştir. Bu IBA dozları arasındaki farklılık istatistiksel anlamda benzerdir. AH-75 klonunda ise köklenme oranları, IBA dozları arasında önemli bir farklılık olmaksızın %32.0 ile %56.4 arasında değişmiştir. Bu değerler AH-32 klonunun gerisindedir. Aygun ve Dumanoglu (2015), ahlat mikro çeliklerinde in vitro köklenme oranını ilk 10 gün karanlık uygulaması ile birlikte 2000 ve 4000 ppm IBA'nın hızlı daldırma uygulamasında sırasıyla %16.7 ve %12.5 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda yer alan 2000 ppm IBA hızlı daldırma uygulamasında ise AH-32 ve AH-75 klonlarında in vitro köklenme oranları sırasıyla %37.9 ve %56.4 olarak kaydedilmiştir. Elde ettiğimiz değerler, araştırmacıların bulgularından bir hayli yüksektir. İki çalışmadaki ahlat genotiplerinin birbirinden farklı olmasının bunun nedeni olduğu düşünülmektedir. Baraldi vd. (1993), köklenme yeteneği bakımından genotipler arasındaki farklılığın, bunların oksin alımı ve bu oksini metabolize etmesi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda IBA dozlarının köklenme düzeyi üzerine etkisi ise her iki ahlat klonunda da OHxF 333 armut anacı gibi önemsiz bulunmuştur. Köklenme düzeyi, IBA dozlarının ortalaması olarak AH-32 ve AH-75 klonlarında sırasıyla 2.41 ile 2.09 olmuştur. Bununla birlikte yüksek IBA dozları her üç *Pyrus* genotipinde de kallus gelişimini tetiklemiş ve kallus düzeyi (0-4), IBA'nın 1000 ve 2000 ppm dozlarında, 250 ve 500 ppm dozlarına göre önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Nisa vd. (2019), büyüme düzenleyici maddelerin, hücre bölünmesini, gelişimini ve DNA replikasyonunu uyarak kallus oluşumunu uyardığını, hormonların sinyal ağlarının, hücre döngüsü parametrelerini etkilediğini ve hücre döngüsü düzenleyici mekanizmalar ve kallus oluşumu ile ilişkili genler arasında fonksiyonel bağlantılar kurduğunu ileri sürmektedir. Yüksek IBA dozlarında hücrelerde aşırı miktarda IBA birikmesine bağlı olarak ortaya çıkan büyük kallus oluşumu, kök ve gövde arasındaki vasküler bağlantıda yarattığı olumsuzluk nedeniyle sağlıklı kök ve bitki gelişimi için istenilmeyen bir durumdur (Smith vd. 1991, Mokotedi vd. 2000,

Gaba 2005). Ayrıca yüksek IBA dozlarında çalışmamızda OHxF 333 ve AH-32 klonlarında köklenme oranlarının da düştüğü görülmüştür (Çizelge 4.1). Bu sonuç, Gaba (2005) tarafından ileri sürülen yüksek IBA dozlarının kallus oluşumunu tetiklediği ve kök oluşumunu engellediğini görüşü ile paraleldir. Aygun ve Dumanoglu (2015) da yüksek IBA dozlarında (2000 ve 4000 ppm) ahlat mikro çeliklerinde düşük köklenme oranlarını ve aşırı kallus oluşumlarını bildirmişlerdir. Bulgularımız araştırmacıların bulguları ile uyumludur.

Ex vitro köklendirme, mikro çoğaltımda üretim, enerji ve kaynak maliyetlerinin düşmesini ve bitkilerin laboratuvarından bahçeye geçiş sürecinin kısılmasını sağlamaktadır. Bu köklendirme tekniği, in vitro köklendirmenin aksine klasik çoğaltım yöntemlerinde olduğu gibi bitkinin daha fazla lateral kök sayısı, kök uzunluğu ve kök tüylerine sahip olmasına ve böylece dış koşullara alışma ve bahçe koşullarında yaşam şansının artmasına yardımcı olmaktadır (Martin 2003, Shekhawat ve Manokari 2016). Bu çalışmanın hedeflerinden birisi de OHxF 333 armut anacı, AH-32 ve AH-75 ahlat klonlarında hızlı daldırma yöntemiyle IBA uygulanmış mikro çelikleri ex vitro koşullarda yüzen su kültürü tekniği ile köklendirme olmakla birlikte çok sayıda tekrar edilen ex vitro denemelerde maalesef köklenme sağlanamamıştır. Clapa vd. (2013) de ahududu, gojiberi, taş armudu, stevya (şekerotu), Gisela 5 kiraz anacı ve bir böğürtlen x ahududu melezi olan Tayberry'de mikro sürgünleri, yüzen su kültürü tekniği ile ex vitro koşullarda köklendirememiştir. Bulgularımız, araştırmacıların bu türlerdeki bulguları ile uyumludur. Bununla birlikte Clapa vd. (2013), yüzen su kültürü tekniğini ile böğürtlen ve kesme gülde in vitro köklenmeye gerek kalmadan ex vitro koşullarda köklenme ve dış koşullara alıştırmayı tek bir aşama olarak başarmışlardır. Çalışmamızda *Pyrus* genotiplerinde ex vitro köklendirme sera koşullarında mist sistemi altında perlit ortamı üzerinde de gerçekleşmemiştir. Bu bulgumuz ile benzer olarak Yeo ve Reed (1995), OPR 157 (*P. calleryana*), OPR 260 (*P. betulifolia*) ve OHxF 230 (*P. communis*) armut anaçlarında, Shibli vd. (1997) de yabani armudun (*P. syriaca*) mikro çoğaltımında mikro çeliklerde ex vitro koşullarda köklenme sağlayamamışlardır. Bununla birlikte Al-Maarri vd. (1994) Passe Crassane ve Williams armut çeşitlerinde, Saadat vd. (2012), *P. glabra* armut türünde, Aygun ve Dumanoglu (2015) da *P. elaeagnifolia* (ahlat) türünde mikro çeliklerde ex vitro köklenmenin başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Aygun ve

Dumanoglu (2015), ahlat mikro çeliklerinde ex vitro köklendirme denemelerinde 10 mM IBA hızlı daldırma uygulamasıyla %55 köklenme oranı ve 1.8 adet/mikro elik kök sayısına ulaştıklarını belirtmişlerdir. Ex vitro köklendirme araştırmalarından elde edilen farklı sonuçlar genotip, yöntem, uygulanan kimyasal maddelerin yapısı, oksin dozu, evre koşulları ya da mikro çeliklerin boğum sayısı gibi birçok faktörden kaynaklanabilmektedir (Yan vd. 2010, Aygun ve Dumanoglu 2015).

Diğerk bitki türlerinde olduğu gibi *Pyrus* genotiplerinin mikro çoğaltımında da in vitro koşullarda köklendirilmiş bitkicikler genel olarak torf, perlit, toprak, vermikulit gibi ortamların tek ya da kombinasyonlar halinde doldurulduğu kaplara dikilerek ve su kaybını engellemek için hava neminin yüksek seviyelerde tutulduğu sera, tünel, bitki yetiştirme odalarında tutularak dış koşullara alıştırılmaktadır (Haq ve Kaloo 2010, Ruzic vd. 2011, Vujovic vd. 2012, Hassanen ve Gabr 2012, Zakavi vd. 2016, Tsoulpha vd. 2018, Najafabadi ve Roodhollahi 2019). Bununla birlikte alışmamızda *Pyrus* genotiplerinin in vitro bitkiciklerini mist sisteminin bulunduğu sera koşullarında plastik tünel altında perlit ortamı üzerinde dış koşullara alıştırma denemeleri maalesef başarısız olmuştur. Thakur ve Kanwar (2008) da yabani armut türü *P. pyrifolia*'nın in vitro bitkiciklerinin dış koşullara alıştırılmasında perlit bulunan plastik saksılarda %90-100 nem koşullarında canlılık oranını sadece %10.5 olarak saptamışlardır. Araştırmacılar dış koşullara alıştırmadaki bu düşük oranı çalışmalarında özel aklimatizasyon odalarının kullanılmamış olmasına bağlamışlardır (Thakur ve Kanwar 2008). *Pyrus* genotipleri ve diğerk birçok odunsu bitki türünde in vitro bitkilerin dış koşullara alıştırılmasında yoğun ölümler yaşanabilmektedir (Chandra vd. 2010, Chirinea vd. 2012, Kumar ve Rao 2012, Clapa vd. 2013, Irsyadi 2021). Bitkiciklerin heterotrofik (in vitro) koşullardan ototrofik (in vivo) koşullara adaptasyonu bir başka ifadeyle dış koşullara alıştırılması üzerine bitkiciklerin durumu, nem, ışık yoğunluğu ve sıcaklık gibi evre koşulları, dikim ortamının tipi, bitki besleme, zararlı ve mikroorganizmalar gibi birçok faktörün etkili olduğu bildirilmektedir (Irsyadi 2021). Çalışmamızda da in vitro bitkicikler bu faktörler nedeniyle dış koşullara alıştırılamamış ise de bu unsurların bertaraf edilmesini sağlayan yüzen su kültürü tekniğinin kullanımı ile in vitro bitkicikler 4 haftalık süreçte başarıyla dış koşullara alıştırılabilmektedir. Yüzen su kültürü tekniği özellikle nem kaybını, zararlı ve mikroorganizmalar ile bulaşmayı engelleyerek bitki yetiştirme ortamları, sulama ve

beslenmeye ihtiyaç kalmadan in vitro bitkiciklerin dış koşullara alıştırılmasını sağlayan, ucuz ve kolay bir teknik olarak geliştirilmiştir (Clapa 2013). Bu tez çalışmasında ayrıca in vitro köklendirme denemelerindeki IBA dozlarının bitkiciklerin dış koşullara alıştırılmasında önemli düzeyde etkili olduğu saptanmıştır. Her üç *Pyrus* genotipinde de 250 ppm IBA uygulaması ile köklendirilmiş mikro çelikler yüzen su kültürü tekniği ile daha yüksek canlılık oranlarında dış koşullara alıştırılmıştır. Zira IBA'nın yüksek dozları mikro çeliklerde kallus gelişimini teşvik etmekte, kallus ise köklerin gövde ile bağlantısını kesmekte ve buna bağlı olarak bitki gelişimini engellemektedir. Ayrıca yüksek IBA dozları bitki bünyesinde etilen biyosentezini uyararak bitki sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenlerden dolayı in vitro bitkicikler dış koşullara alışamamaktadır (Grossmann 2010, Steinitz vd. 2010, Kilkenny vd. 2012, Gehlot vd. 2014). Çalışmamızda düşük doz olarak 250 ppm IBA uygulaması ile köklendirilmiş olan üç *Pyrus* genotipinde in vitro bitkiciklerin dış koşullara alışma durumları bakımından yapılan karşılaştırmada 4. haftanın sonunda bitki canlılık oranlarının OHxF 333 armut klonunda %84.0, AH-32 ahlat klonunda %62.7 ve AH-75 ahlat klonunda %64.7 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Canlılık oranlarının yanında bitki boyu, kök sayısı, köklenme düzeyi yönünden en iyi sonuçlar OHxF 333 armut klonunda saptanmıştır. Bu sonuç, genotiplerin bu bakımdan performanslarının farklı olmasına bağlanmıştır. Clapa vd. (2013), ahududu, siyah frenk üzümü, Gisela 5 kiraz anacı, gojiberi ve taş armudu (*Amelanchier*) genotiplerinde in vitro koşullarda köklendirilmiş bitkicikleri yüzen su kültürü ile dış koşullara alıştırmaya başarısının %57.9 ile %100 arasında değiştiğini bildirmiştir. Gisela 5 kiraz anacında ise bu oran %58 ve taş armudunda %89 olarak ifade edilmiştir. *Pyrus* genotiplerinde yüzen su kültürü tekniğinin ilk kez ele alındığı bu çalışmada OHxF 333 armut (%84.0), AH-32 (%62.7) ve AH-75 (%64.7) ahlat klonlarından elde ettiğimiz bulgular, belirtilen bitki türlerinden elde edilen sonuçlar ile genotip farklılıklarından dolayı tamamen olmasa da uyumluluk göstermektedir. Yüzen su kültüründe in vitro bitkiciklerin dikim ortamının su olması ve bitkiciklerin bir kısmının su yüzeyinde kalması nedeniyle ilave bir nemlendirme ve havalandırmaya ihtiyaç kalmadan in vitro bitkicikler dış koşullara başarıyla alışabilmektedir (Clapa 2013).

Çalışmamızda yüzen su kültürü tekniği ile 4 haftalık süreçte dış koşullara alıştırılmış bitkicikler %80 torf ve %20 perlit karışımının bulunduğu saksılara dikilerek büyümeleri için sera koşullarına alındığında ahlat klonlarına ait bitkilerin kısa sürede tamamen kuruduğu görülmüştür. OHxF 333 armut anacının bitkileri ise bu koşullarda gelişmelerini sürdürmüştür. OHxF 333 klon anacında yaprak alt kesit yüzeyindeki stoma sayısı yüzen su kültüründen çıkartılmış bitkiler ile sera koşullarında geliştirilmiş üç aylık bitkilerde istatistiksel anlamda benzer bulunmuştur. Ahlat klonlarında bitkiler sera koşullarında geliştirilemediği için yaprak alt kesit yüzeyindeki stoma sayısı bakımından yüzen su kültüründen çıkartılmış bitkiler ile bahçe koşullarındaki ana bitkiler karşılaştırılmıştır. AH-75 klonunda yüzen su kültüründen çıkartılmış bitkilerin stoma sayıları daha yüksek bulunmuş ise de AH-32 klonunda bu yönden bitkiler arasında önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır. Yaprak mezofil kalınlığı yönünden çalışmadaki *Pyrus* genotiplerinde yüzen su kültüründen çıkartılmış bitkilerin değerleri ile bahçe koşullarındaki ana bitkilerin değerleri arasında da önemli bir farklılık bulunmamıştır (Çizelge 7). Bulgularımız yüzen su kültüründen çıkartılmış bitkilerin genel olarak dış koşullara başarıyla alıştığını göstermektedir. Wang vd. (2020) çok yıllık bir bitki olan Tai Zi Shen'in (*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax) mikro çoğaltılmış bitkiciklerinde yapraklarda stoma sayısındaki azalmanın bahçe koşullarına çok daha iyi uyum sağlamanın bir işareti olduğunu bildirmektedir. Chandra vd. (2010) de in vitro koşullarda bulunan bitkiciklerin fonksiyonel olmayan stomalara, zayıf kök sistemine ve yeterince gelişmemiş kütikulaya sahip olduğuna dikkat çekmektedir. Dış koşullara alışma sırasında bitkiciklerde yaprak kalınlığı genellikle artmakta, yaprağın mezofil kısmında palizat ve sünger parankimasında farklılaşma ilerlemekte, stoma yoğunluğu azalmakta ve stoma şekli dairesel yapıdan elipse dönüşmektedir. Kütikul ve epikütikular mumların gelişimi ve terlemede etkili stomal düzenleme, dış koşullara transfer edilen bitkinin su potansiyelinde denge sağlamaktadır (Chandra vd. 2010). Bu çalışmada, OHxF 333 armut klon anacında yapraklarda toplam klorofil, klorofil a ve b miktarı bakımından yüzen su kültüründen çıkartılan, üç ay serada geliştirilen ya da bahçe koşullarındaki ana bitkiler arasında önemli bir farklılık kaydedilmemiştir. Ahlat klonlarında ise yüzen su kültüründen çıkartılan bitkiler ile bahçe koşullarındaki ana bitkiler arasında bu yöndeki farklılık AH-32 klonunda klorofil a, AH-75 klonunda da toplam klorofil miktarı bakımından önemli olmuş ve yüzen su kültüründen çıkartılan

bitkilerde daha yüksek değerler kaydedilmiştir (Çizelge 4.7). Yüksek klorofil içeriğine sahip bitkicikler, yüksek fotosentetik yeterlilik nedeniyle dış koşullara alıştırmada daha yüksek hayatta kalma şansına sahip olabilmektedir (Christensen vd. 2008).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında OHxF 333 armut, AH-32 ve AH-75 ahlat klonlarının in vitro koşullarda 250 ppm IBA uygulaması ile köklendirilmiş mikro çelikleri yüzen su költürü tekniği ile sırasıyla %84.0, %62.7 ve %64.7 oranlarında dış koşullara alıştırılmıştır. Bununla birlikte yüzen su költürü tekniği ile mikro çeliklerde ex vitro köklenme sağlanamamıştır. Ayrıca dış koşullara alıştırılmış ahlat bitkicikleri sera ortamında yaşatılamamıştır. Bu bitkiciklerin sera koşullarında da canlılıklarının devamı ve aynı zamanda büyüme ve gelişmeleri için farklı bitki yetiştirme ortamları, biyolojik ve kimyasal uygulamalar ile sürdürülebilir ve ekonomik yeni protokollerin geliştirilmesi, ayrıca ex vitro köklendirme ile ilgili başarılı yöntemlerin bulunması için çok yönlü araştırmaların başlatılması öncelikli önerilerimizdir.

KAYNAKLAR

- Al-Maarri, K., Arnaud, Y. and Miginiac, E. 1994. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar 'Passe Crassane' seedlings and cultivar 'Williams': factors affecting root formation in vitro and ex vitro. *Scientia Horticulturae*, 58(3); 207-214.
- Algan, G. 1981. Bitkisel Dokular İçin Mikroteknik. Fırat Üniversitesi Yayınları, Elazığ.
- Alizadeh, S., Polat, G. and Dumanoglu H. 2018. Old Home x Farmingdale 333 armut anacının in vitro köklenmesi üzerine oksin ve polivinil alkol uygulamalarının etkileri. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35 (Ek Sayı); 47-53.
- Alizadeh, S. and Dumanoglu, H. 2022. The effects of zinc oxide nanoparticles loaded with IAA and IBA on in vitro rooting of apple microcuttings. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 46; 306-317.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24; 1-15.
- Aygun, A. and Dumanoglu, H. 2015. In vitro shoot proliferation and in vitro and ex vitro root formation of *Pyrus elaeagrifolia* Pallas. *Frontiers in Plant Science*, 6; 225.
- Bahri-Sahloul, R., Ammar, S., Msallem, A. and Mtar, R. 2005. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks. *Advances in Horticultural Science*, 19; 21-28.
- Baraldi, R., Bertazza, G., Predieri, S., Bregoli, A.M. and Cohen, J.D. 1993. Uptake and metabolism of indole-3-butyric acid during the in vitro rooting phase in pear cultivars (*Pyrus communis*). *Acta Horticulturae*, 329; 289-291.
- Baraldi, R., Bertazza, G., Bregoli, A.M., Fasolo, F., Rotondi, A., Predieri, S., Serafini-Fracassini, D., Slovin, J.P. and Cohen, J.D. 1995. Auxins and polyamines in relation to differential in vitro root induction on microcuttings of two pear cultivars. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14; 49-59.
- Barros, M.T.F., Hipolito, C.I. and Baptista, C.G.M. 2005. In vitro rooting of Portuguese pear cultivars (*Pyrus communis*) in response to changes in auxin induction and dark period treatments. *Acta Horticulturae*, 671; 631-636.
- Bell, R.L. and Itai, A. 2011. *Pyrus*, In: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Kole, C. (ed), Springer, 147-177, London.
- Bellini, C., Pacurar, D.I. and Perrone, I. 2014. Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Reviews Plant Biology*, 65; 639-666.
- Blakesley, D., Weston, G.D. and Hall, J.F. 1991. The role of endogenous auxin in root initiation. *Plant Growth Regulation*, 10; 341-353.

- Bolar, J.P., Norelli, J.L., Aldwinckle, H.S. and Hanke, V. 1998. An efficient method for rooting and acclimatization of micropropagated apple cultivars. *HortScience*, 33(7); 1251-1252.
- Bolat, İ., İkinci, A., Dikilitaş, M. and Karakaş Dikilitaş, S. 2018. Use of fruit rootstocks for lime-induced chlorosis tolerance. 1. International Gap Agriculture and Livestock Congress, 25-27 April 2018, Şanlıurfa, Turkey. Papers, 735-738.
- Caboni, E. and Damiano, C. 2005. In vitro propagation of walnut (*Juglans regia* L.): critical factors for the induction of the rooting response. *Acta Horticulturae*, 705; 329-333.
- Chaari Rkhis, A., Maalej, M., Drira, N. and Standardi, A. 2011. Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati'. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35; 403-412.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V. and Chandra, R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32; 1199-1205.
- Chirinea, C.F., Pasqual, M., De Araujo, A.G., Pereira, A.R. and De Castro, E.M. 2012. Acclimatization and leaf anatomy of micropropagated fig plantlets. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(4); 1180-1188.
- Christensen, B., Sriskandarajah, S., Serek, M. and Müller, R. 2008. In vitro culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(2); 151-161.
- Clapa, D., Fira, A. and Joshee, N. 2013. An efficient ex vitro rooting and acclimatization method for horticultural plants using float hydroculture. *HortScience*, 48(9); 1159-1167.
- Custodio., Martins-Loucao, A. and Romano, A. 2004. Influence of sugars on in vitro rooting and acclimatization of carob tree. *Biologia Plantarum*, 48(3); 469-472.
- Cüce, M. and Sökmen, A. 2017. In vitro production protocol of *Vaccinium uliginosum* L. (bog bilberry) growing in the Turkish flora. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41(4); 1704-1719.
- Damiano, C. and Morticelli, S. 1998. In vitro fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 1(2); 12-13.
- Damiano, C., Frattarelli, A. and Giorgioni, M. 2002. Micropropagation of pear through temporary immersion. *Acta Horticulturae*, 596; 425-429.
- De Klerk, G.J., Van der Krieken, W. and De Jong, J.C. 1999. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 35; 189-199.
- De Lima, F.C., Ulisses, C., Camara, T.R., Cavalcante, U.M.T., Albuquerque, C.C. and Willadino, L. 2006. *Anthurium andraeanum* Lindl. cv. Eidibel in vitro rooting and

- acclimatization with arbuscular mycorrhizal fungi. *Revista Brasileira de Ciencias Agrarias*, 1; 13-16.
- Dimassi-Theriou, K. 1995. In vitro rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*) as influenced by mineral concentration of the nutrient medium and type of culture-tube sealing material. *Journal of Horticultural Science*, 70(1); 105-108.
- Dimitrova, N., Nacheva, L. and Berova, M. 2019. Optimisation of rooting and acclimatization of *Pyrus communis* L. with the biostimulator Charkor. *Silva Balcanica*, 20(3); 47-56.
- Dimitrova, N. and Nacheva, L. 2021. An optimized micropropagation protocol by ex vitro rooting of pear rootstock OHF 333 (*Pyrus communis* L.). *Acta Agrobotanica*, 74; 744.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Bonany, J., Iglesias, I., Asin L. and Simard, M.H. 2004. Selection for new pear rootstocks: in vitro screening and field evaluation for tolerance to iron chlorosis. *Acta Horticulturae*, 658; 463-468.
- Dondini, L. and Sansavini, S. 2012. European pear, In: *Fruit Breeding*. Badenes, M.L. and Byrne D.H. (eds), Springer, 369-414, New York.
- Dumanoglu, H., Çelik, A., Büyükkartal, H.N. and Dousti, S. 2014. Morphological and anatomical investigations on in vitro micrografts of OHxF 333 / *Pyrus elaeagrifolia* interstock / rootstock combination in pears. *Tarım Bilimleri Dergisi- Journal of Journal of Agricultural Sciences*, 20; 269-279.
- Epstein, E. and Ludwig-Müller, J. 1993. Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiologia Plantarum*, 88(2); 382-389.
- Elezaby, A.A. and Allatif, A.M.A. 2017. In vitro propagation of guava (*Psidium guajava* L.): effect of antioxidant, nutrient media and growth regulators. *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants*, 9(3); 144-149.
- Fotopoulos, S. and Sotiropoulos, T.E. 2005. In vitro rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* × *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period. *Agronomy Research*, 3(1); 3-8.
- Gaba, V.P., 2005. Plant growth regulators in plant tissue culture and development, In: *Plant Development and Biotechnology*. Trigiano, R.N. and Gray, D.J. (eds), CRC Press, 87-89, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.
- Gehlot, A., Gupta, R.K., Arya, I.D., Arya, S. and Tripathi, A. 2014. De novo adventitious root formations in mini-cuttings of *Azadirachta indica* in response to different rooting media and auxin treatments. *iForest- Biogeosciences and Forestry*, 8(4); 558-564.
- Geneve, R.L. 2000. Root formation in relationship to auxin uptake in cuttings treated by the dilute soak, quick dip, and talc methods. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*, 50; 409-441.

- Gonçalves, J.C., Diogo, G., Coelho, M.T. and Amancio, S. 1999. Effect of rooting on survival and growth during acclimatization of micropropagated chestnut plants (*Castanea sativa* x *C. crenata*). *Acta Horticulturae*, 494; 235-240.
- Grigoriadou, K., Vasilakakis, M. and Eleftheriou, E.P. 2003. Rooting and acclimatization of in vitro propagated olive tree microshoots (*Olea europaea sativa* L.) cv. Chondrolia Chalkidikis. *Acta Horticulturae*, 616; 193-197.
- Grossmann, K. 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, 66(2); 113-120.
- Gür, İ. ve Şan, B. 2017. Su stresinin armut yetiştiriciliğinde kullanılan analarda morfolojik değişimler üzerine etkileri. *Meyve Bilimi*, 4(1); 17-22.
- Hammerschlag, F.A., Bauchan, G.R. and Scorza, R. 1987. Factors influencing in vitro multiplication and rooting of peach cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8; 235-242.
- Haq, Z. and Kaloo, Z.A. 2010. In vitro micro propagation of “sand pear” *Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai. *Frontiers of Agriculture in China*, 4; 358-361.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, Jr.F.T. and Geneve, R.L. 2011. *Plant Propagation: Principles and Practices* (8th Edition). Prentice-Hall, 915, Boston.
- Hassanen, S.A. and Gabr, M.F. 2012. In vitro propagation of pear *Pyrus betulaefolia* rootstock. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 12(4); 484-489.
- Hlaing, N.Z., Fang, M. and Shuling, J. 2019. Study of in vitro root induction and hardening responses of four *Pyrus* spp. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 8(3); 87-90.
- Iglesias, I., Vilardell, P., Bonany, J., Claveria, E. and Dolcet-Sanjuan, R. 2004. Micropropagation and field evaluation of the pear (*Pyrus communis* L.) 'IGE 2002', a new selection of the cultivar Dr. Jules Guyot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129; 389-393.
- İkinci, A., Bolat, I., Ercisli, S. and Esitken, A. 2016. Response of yield, growth and iron deficiency chlorosis of 'Santa Maria' pear trees on four rootstocks. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(2); 563-567.
- Irsyadi, M.B. 2021. Factors that effect of the optimal plantlet growth from tissue culture on the acclimatization stage. *Proceeding International Conference on Science and Engineering*, 4; 100-104.
- Isutsa, D.K., Pritts, M.P. and Mudge, K.W. 1994. Rapid propagation of blueberry plants using ex vitro rooting and controlled acclimatization of micropropagules. *HortScience*, 29(10); 1124-1126.
- İbrahim Ahmed Osman, S. ve Dumanoglu, H. 2020. Ümitvar ahlat klonlarının (*Pyrus elaeagrifolia* Pallas) in vitro köklenmesi üzerine IBA uygulamalarının etkisi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 9(1); 11-16.

- James, D.J. 1983. Adventitious root forination in 'vitro' in apple rootstocks (*Malus pumila*) I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M.9. *Physiologia Plantarum*, 57(1); 149-153.
- Kaina, J., Jie, Z., Junli, L., Hui, G., Hongxiang, S. and Yao, Y. 2011. Establishment of high effective regeneration and propagation system for ornamental crabapple (*Malus* spp.). *African Journal of Biotechnology*, 10(34); 6447-6455.
- Karakeçili, A., Korpayev, S., Dumanoglu, H. and Alizadeh, S. 2019. Synthesis of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid loaded zinc oxide nanoparticles: effects on rhizogenesis. *Journal of Biotechnology*, 303; 8-15.
- Kassa, A. 2015. Lime-induced iron chlorosis in fruit trees. *Journal of Chemistry and Chemical Sciences*, 5(6); 293-302.
- Kilkenny, A.J., Wallace, H.M., Walton, D.A., Adkins, M.F. and Trueman, S.J. 2012. Improved root formation in eucalypt cuttings following combined auxin and anti-ethylene treatments. *Journal of Plant Sciences*, 7(4); 138-153.
- Kolozsvari Nagy, J. and Sule, S. 2006. Optimization of rooting of in vitro propagated *Malus x domestica* 'Pinova'. *Acta Horticulturae*, 725; 431-434.
- Kooi, L.T., Keng, C.L. and Hoe, C.T.K. 1999. In vitro rooting of sentang shoots (*Azadirachta excelsa* L.) and acclimatization of the plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 35; 396-400.
- Korpayev, S., Karakeçili, A., Dumanoglu, H. and Ibrahim Ahmed Osman, S. 2021. Chitosan and silver nanoparticles are attractive auxin carriers: A comparative study on the adventitious rooting of microcuttings in apple rootstocks. *Biotechnology Journal*, 16(8); e2100046.
- Kotb, O.M., Abd EL-Latif, F.M., Atawia, A.R., Saleh, S.S. and EL-Gioushy, S.F. 2020. In vitro propagation and callus induction of pear (*Pyrus communis*) cv. Le-Conte. *Asian Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*, 3(2); AJBGE.56989.
- Kumar, K. and Rao, I.U. 2012. Morphophysiologicals problems in acclimatization of micropropagated plants in -ex vitro conditions-a reviews. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 2(4); 271-283.
- Kunnemen, B.P.A.M. and Albers, M.R.J. 1992. Effects of tissue culture and acclimatization conditions on the survival and growth of rooted and unrooted *Malus* and *Pyrus* mikrocuttings. *Acta Horticulturae*, 314; 147-154.
- Lebedev, V., Arkaev, M., Dremova, M., Pozdniakov, I. and Shestibratov, K. 2019. Effects of growth regulators and gelling agents on ex vitro rooting of raspberry. *Plants (Basel)*, 8(1); 3.
- Leite, G.B., Finardi, N.L. and Fortes, G.R. de L. 2002. Use of vermiculite as a substrate and effect of light on in vitro rooting of pears, cv. Bartlett and clone OH x F97. *Ciencia e Agrotecnologia (Brazil)*, 25(5); 977-982.
- Leva, A. 2011. Innovative protocol for "ex vitro rooting" on olive micropropagation. *Central European Journal of Biology*, 6(3); 352-358.

- Li, S.W., Xue, L., Xu, S., Feng, N. and An, L. 2009. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *The Botanical Review*, 75; 230-247.
- Li, K., Tian, H., Mao, J., Khan, A., Tahir, M.M., Li, S., Chen, S., Shao, Y. and Zhang, D. 2022. Effect of darkness treatment on the morphology, hormone status and gene expression of developing adventitious root in apple rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 148; 331-346.
- Linsmaier, E.M. and Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18(1); 100-127.
- Lloyd, G. and McCown, B.H. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings. International Plant Propagators' Society (USA)*, 30; 421-427.
- Lombard, P.B. and Westwood, M.N. 1987. Pear rootstocks, In: Rootstocks for Fruit Crops. Rom, R.C. and Carlson, R.F. (eds), A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, Inc., 145-183, New York.
- Lucyszyn, N., Quoirin, M., Ribas, L.L.F. and Sierakowski, M.R. 2006. Effect of agar, galactomannan and indole-butyric acid on in vitro rooting of the pear cultivar 'Durondeau' and apple rootstock cultivar 'Marubakaido'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(2); 310-314.
- Marino, G. 1988. The effect of paclobutrazol on in vitro rooting, transplant establishment and growth of fruit plants. *Plant Growth Regulation*, 7; 237-247.
- Martin, K.P. 2003. Rapid in vitro multiplication and ex vitro rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rheophytic woody medicinal plant. *Plant Cell Reports*, 21; 415-420.
- Martins, J.P.R., Schimildt, E.R., Alexandre, R.S., Santos, B.R. and Magevski, G.C. 2013. Effect of synthetic auxins on in vitro and ex vitro bromeliad rooting. *Pesquisa Agropecuaria Tropical*, 43(2); 138-146.
- Masoudi, S., Kermani, M.J., Soleimani, A., Hajnajari, H., Alidadi, A. and Hosseini, Z.S. 2020. Optimizing micropropagation of apple (*Malus × domestica* Borkh) and in vitro root induction by *Piriformospora indica*. *Agriculture (Pol'nohospodarstvo)*, 66(4); 137-147.
- Mencuccini, M. 2003. Effect of medium darkening on in vitro rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 97(2); 129-139.
- Modgil, M., Gupta, R. and Thakur, M. 2010. In vitro rooting and hardening in apple rootstock EMLA111 - Influence of some factors. *Acta Horticulturae*, 865; 339-344.
- Mokotedi, M.E.O., Watt, M.P., Pammenter, N.W. and Blakeway, F.C. 2000. In vitro rooting and subsequent survival of two clones of a cold-tolerant *Eucalyptus grandis* x *E. nitens* hybrid. *HortScience*, 35(6); 1163-1165.
- Moshkov, I.E., Novikova, G.V., Hall, M.A. and George, E.F. 2008. Plant growth regulators III: gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors;

- miscellaneous compounds, In: Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background. George, E.F., Hall, M.A. and De Clark, G.J. (eds), Springer, 227-281, Dordrecht, The Netherlands.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3); 473-497.
- Nadal, M.C., Ferreira, G.M.d.R., Andrade, G.V.S., Buttros, V.H., Rodrigues, F.A., da Silva, C.M., Martins, A.D., Rufato, L., Luz, J.M.Q., Doria, J. and Pasqual, M. 2022. Endophytic bacteria can replace the need for synthetic auxin during in vitro rooting of *Pyrus communis*. *Agronomy*, 1; 1226.
- Najafabadi, A.H. and Roohollahi, I. 2019. In vitro proliferation, rooting and acclimatization of Natanzi pear seedlings (*Pyrus communis* cv. Natnazi) with mycorrhiza fungi infection. *Journal of Horticultural Science*, 32(4); 655-664.
- Nas, M.N. and Read, P. 2004. Improved rooting and acclimatization of micropropagated hazelnut shoots. *HortScience*, 39(7); 1688-1690.
- Nisa, Z.U., Jan, S., Sajad, M.A., Shah, S.H., Farooq, G. and Ali, H. 2019. Micropropagation through apical shoot explants and morphogenic potential of different explants of *Saussurea lappa*: an endangered medicinal plant. *Pure and Applied Biology*, 8(1); 585-592.
- Nordstrom, A.C., Jacobs, F.A. and Eliasson, L. 1991. Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings. *Plant Physiology*, 96; 856-861.
- Oakes, A.D., Pilkey, H.C. and Powell, W.A. 2020. Improving ex vitro rooting and acclimatization techniques for micropropagated American chestnut. *Journal of Environmental Horticulture*, 38(4); 149-157.
- Özbek, S. 1978. Özel Meyvecilik (Kışın Yaprağını Döken Meyve Türleri). Ankara Üniversitesi Basımevi, 485, Ankara.
- Papakosta, E. 2016. The in vitro rooting of pear rootstock (*Pyrus communis pyraster*) *International Journal of Research in Agricultural Sciences*, 3(6); 2348-3997.
- Pasqual, M., Cavalcante-Alves, J.M., Chalfun, N.N.J., Silva, A.B., Dutra, L.F. and Bianchi, J.V. 2002. In vitro rooting and shoot growth of *Pyrus betulaefolia* rootstock. *Acta Horticulturae*, 596; 447-450.
- Pop, T.I., Pamfil, D. and Bellini, C. 2011. Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1); 307-316.
- Previati, A., Da Re, F., Bassi, D., Tagliavini, M. and Marangoni, B. 2002. Development of protocols for in vitro rooting of advanced selections of *Pyrus communis* rootstocks. *Acta Horticulturae*, 596; 485-486.

- Quambusch, M., Gruß, S., Pscherer, T., Winkelmann, T. and Bartsch, M. 2017. Improved in vitro rooting of *Prunus avium* microshoots using a dark treatment and an auxin pulse. *Scientia Horticulturae*, 220; 52-56.
- Quoirin, M. and Lepoivre, P. 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* spp. *Acta Horticulturae*, 78; 437-442.
- Quoirin, M., Lepoivre, P. and Boxus, P. 1977. Un premier bilan de 10 annees de recherches sur les cultures de meristemes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux, In: *Compte Rendu des Recherches 1976-1977 et Rapports de Synthese de la Station de Cultures Fruitieres et Maraicheres, Centre de Recherches Agronomique de l'Etat*, 93-117, Gembloux, Belgique.
- Reed, B.M. 1995. Screening *Pyrus* germplasm for in vitro rooting response. *HortScience*, 30(6); 1292-1294.
- Rehman, H.U., Gill, M.I.S., Sidhu, G.S. and Dhaliwal, H.S. 2014a. Micropropagation of Kainth (*Pyrus pashia*) - an important rootstock of pear in northern subtropical region of India. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Science*, 2(2); 188-196.
- Rehman, H.U., Gill, M.I.S., Sidhu, G.S., Dhillon, W.S. and Bedi, S. 2014b. Micropropagation of Patharnakh (*Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai) pear using explants obtained from forced cuttings. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 2(2); 54-65.
- Roussos, P.A. and Pontikis, C.A. 2002. In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Growth Regulation*, 37(3); 295-304.
- Ruzic, DJ., Vujovic, T., Nikolic, D. and Cerovic, R. 2011. In vitro growth responses of the 'Pyrodwarf' pear rootstock to cytokinin types. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(5); 6630-6637.
- Saadat, Y.A., Jokar, L. and Jahromi, L.S. 2012. In vitro rooting of *Pyrus glabra* Boiss. microshoots. *Iranian Journal of Natural Resources Research*, 1(1); 46-51.
- Shekhawat, M.S. and Manokari, M. 2016. Optimization of in vitro and ex vitro regeneration and micromorphological studies in *Basella alba* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22(4); 605-612.
- Shekhawat, M.S., Mehta, S.R., Manokari, M., Priyadharshini, S., Badhepuri, M.K., Jogam, P., Dey, A. and Rajput, B.S. 2021. Morpho-anatomical and physiological changes of Indian sandalwood (*Santalum album* L.) plantlets in ex vitro conditions to support successful acclimatization for plant mass production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147; 423-435.
- Shibli, R.A., Ajlouni, M.M., Jaradat, A., Aljanabi, S. and Shatnawi, M. 1997. Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). *Scientia Horticulturue*, 68; 237-242.
- Smith, M.A.L., McClelland, M.T. and Timmermann, R. 1991. Anomalous root structure on woody plants in vitro. *Journal of Environmental Horticulture*, 9(2); 61-64.

- Sotiropoulos, T.E., Almaliotis, D., Papadakis, I.E., Dimassi, K.N. and Therios, I.N. 2006. Effects of different iron sources and concentrations on in vitro multiplication, rooting and nutritional status of the pear rootstock 'OHF 333'. *European Journal of Horticultural Science*, 71(5); 222-226.
- Soumare, A., Diedhiou, A.G., Arora, N.K., Al-Ani, L.K.T., Ngom, M., Fall, S., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Kouisni, L. and Sy, M.O. 2021. Potential role and utilization of plant growth promoting microbes in plant tissue culture. *Frontiers in Microbiology*, 12; 649878.
- Souza, J.A., Bettoni, J.C., Costa, M.D., Baldissera, T.C., Dos Passos, J.F.M. and Primieri, S. 2022. In vitro rooting and acclimatization of 'Marubakaido' apple rootstock using indole-3-acetic acid from rhizobacteria. *Communications in Plant Sciences*, 22; 16-23.
- Steinitz, B., Barr, N., Tabib, Y., Vaknin, Y. and Bernstein, N. 2010. Control of in vitro rooting and plant development in *Corymbia maculata* by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion. *Plant Cell Reports*, 29(11); 1315-1323.
- Sun, Q., Sun, H., Bell, R.L. and Xin, L. 2009. Effect of polyvinyl alcohol on in vitro rooting capacity of shoots in pear clones (*Pyrus communis* L.) of different ploidy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99; 299-304.
- Tarinejad, A. and Amiri, S. 2019. Influence of plant growth regulators, carbohydrate source and concentration on micropropagation and other physiological traits of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Shahroudi) under in vitro conditions. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 9(1); 75-82.
- Thakur, A. and Kanwar, J.S. 2006. Effect of phloroglucinol and auxins on in vitro rooting behaviour of five *Pyrus* genotypes, In: *Temperate Horticulture*. Kishore, D.K., Sharma, S.K. and Pramanick, K.K. (eds), New India Publishing Agency, 397-406, New Delhi.
- Thakur, A.T. and Kanwar, J.S. 2008. Micropropagation of 'wild pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. II. Induction of rooting. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36(2); 104-111.
- Tsoulpha, P., Alexandri, S., ve Tsaktsira, M. 2018. Critical factors affecting an efficient micropropagation protocol for *Pyrus spinosa* Forsk. *Journal of Applied Horticulture*, 20(3): 190-195.
- Vahdati, K., Leslie, C.A., Zamani, Z. and McGranahan, G.H. 2004. Rooting and acclimatization of in vitro-grown shoots from mature trees of three Persian walnut cultivars. *HortScience*, 39(2); 324-327.
- Van Staden, J., Zazimalova, E. and George, E.F. 2008. Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists, In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. George, E.F., Hall, M.A. and De Clark, G.J. (eds), 205- 226, Dordrecht, The Netherlands.

- Van Telgen, H.J., Van Mil, A. and Kunneman, B. 1992. Effect of propagation and rooting conditions on acclimatization of micropropagated plants. *Acta Botanica Neerlandica*, 41(4); 453-459.
- Vujovic, T., Ruzic, D. and Cerovic, R., 2012. In vitro shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks. *Horticultural Science (Prague)*, 39(3); 101-107.
- Wang, F., Xin, X., Wei, H., Qiu, X. and Liu, B. 2020. In vitro regeneration, ex vitro rooting and foliar stoma studies of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax. *Agronomy*, 10(7); 949.
- Welander, M. 1983. In vitro rooting of the apple rootstock M 26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiologia Plantarum*, 58; 231-238.
- Withan, F.H., Blaydes, D.F. and Devlin, R.M. 1971. *Experiment in Plant Physiology*. Van Nostrand Reinhold Co., 245, New York.
- Yan, H., Liang, C., Yang, L. and Li, Y. 2010. In vitro and ex vitro rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32; 115-120.
- Yeo, D.Y. and Reed, B.M. 1995. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks. *HortScience*, 30(3); 620-623.
- Yi, J.Y., Lee, G.A., Chung, J.W., Lee, Y.Y., Gwag, J.G. and Lee, S.Y. 2015. Efficient micropropagation of pear germplasm using shoot tips and nodal explants. *Korean Journal of Plant Resources*, 28(6); 690-696.
- Zakavi, M., Hossein A. and Irvani, N. 2016. Optimizing micropropagation of drought resistant *Pyrus boissieriana* Buhse. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22(4); 583-593.
- Zhu, L.H., Li, X.Y., Ahlman, A. and Welander, M. 2003. The rooting ability of the dwarfing pear rootstock BP10030 (*Pyrus communis*) was significantly increased by introduction of the *rolB* gene. *Plant Science*, 165(4); 829-835.