



## Elma Genotiplerinin Mikro Çoğaltımında Farklı Amonyum Nitrat Düzeylerinin Sürgün ve Kök Oluşumu Üzerine Etkileri

Hatice DUMANOĞLU<sup>1\*</sup>

Ahmet AYGÜN<sup>2</sup>

Veli ERDOĞAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Dışkapı, Ankara, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ordu, TÜRKİYE

\*Sorumlu Yazar

e-posta: hatice.dumanoglu@agri.ankara.edu.tr

Geliş Tarihi : 5.11.2009

Kabul Tarihi : 12.12.2009

### Özet

Bu çalışmada, "Golden Delicious" ve "Mondial Gala" elma çeşitlerinin (*Malus x domestica* Borkh.) sürgün ucu kültürü ile çoğaltımında Murashige ve Skoog (MS) temel besin ortamına amonyum nitratın 1/4, 1/3, 1/2 ve 1/1 düzeylerinde katılmasının sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Ortamlara sürgün çoğaltma aşamasında 1.0 mg/l BA ve 0.5 mg/l GA<sub>3</sub>, köklendirme aşamasında 0.2 mg/l IBA+0.2 mg/l NAA ilave edilmiştir. Ayrıca *in vitro* köklenmenin iyileştirilmesi amacıyla zor köklenen "Golden Delicious" ve kolay köklenen "MM106" (kontrol) genotiplerine ait mikro çelikler farklı dozlarda IBA (0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 ve 3.0 mg/l) veya IBA+NAA (0.5+0.5 mg/l) ilave edilmiş makro element düzeyi 1/2 olan MS besin ortamına doğrudan ya da IBA solusyonlarına (1000 ve 4000 ppm) hızlı daldırmanın ardından dikilmiştir. Köklendirme denemelerinde kültürler ilk 1 hafta karanlıkta tutulmuştur. En yüksek sürgün oluşumu 8.7 adet/eksplant ile "Mondial Gala" çeşidinde 1/4 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> düzeyinde elde edilmiştir. "Golden Delicious" çeşidinde 4.0-5.2 adet/eksplant arasında değişen sürgün sayısı üzerine NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> düzeylerinin etkisi istatistiksel anlamda benzer olmuştur. Zor ve kolay köklenen elma genotiplerinde köklenme oranı 1000 ppm IBA uygulaması ile %50 (Golden Delicious) ve %100 (MM106) düzeylerine çıkarılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Elma, *in vitro*, amonyum nitrat, sürgün oluşumu, köklenme

## Effect of Ammonium Nitrate Levels on Shoot and Root Formation in Micropropagation of Apple Genotypes

### Abstract

In this study, effect of ammonium nitrate at 1/4, 1/3, 1/2 and 1/1 strength within Murashige Skoog basal medium on shoot and root formation of 'Golden Delicious' and 'Mondial Gala' apples *Malus x (domestica)* Borkh.) was investigated for propagation by shoot tip culture. MS media was supplemented with 1.0mg/l BA and 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> at shoot multiplication stage and with 0.2 mg/l IBA+0.2 mg/l NAA at rooting stage. In addition, to improve *in vitro* rooting, micro cuttings of difficult-to-root cultivar 'Golden Delicious' and easy-to-root rootstock 'MM106' (control) were either directly planted to MS media including 1/2 strength of macro elements plus IBA (0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 mg/l) or IBA+NAA (0.5+0.5 mg/l), or they were planted to the media after fast dipping in 1000 and 4000 ppm IBA. Cultures were kept in dark during the first week of rooting experiments. The highest number of shoots was obtained in 'Mondial Gala' (8.7) at 1/4 strength of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. In 'Golden Delicious', number of shoots per explant varied between 4.0 and 5.2, and the effect of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> strengths on shoot number was similar statistically. Rooting was increased to 50% (Golden Delicious) and to 100% (MM106) by 1000 ppm IBA treatment in difficult-to root and easy-to root apple genotypes.

**Key words:** Apple, *in vitro*, ammonium nitrate, shoot formation, rooting

### GİRİŞ

Sürgün ucu kültürü, kısa sürede çok sayıda bir örnek bitkisel materyalin üretilmesine olanak sağlayan önemli bir vegetatif çoğaltma tekniğidir. Meyve türlerinde özellikle klonal anaçların çoğaltılmasında yaygın olarak kullanılan bu teknik ile kültür çeşitlerinin kendi kökleri üzerinde yetiştirilmesi de mümkün olabilmektedir. Anaç kullanılmama zorunluluğunun bulunmadığı durumlarda ya da anaç genotipinin etkisi olmadan çeşitlerin farklı etmenlere karşı performanslarının *in vitro* ya da dış koşullarda belirlenmesini hedefleyen çalışmalarda çeşitlerin kendi kökleri üzerinde çoğaltılabilmesi önemlidir. Aşırı dışında çelik, daldırma gibi klasik yöntemler ile kendi kökleri üzerinde bitki elde edilmesinin genellikle güç olduğu türlerde tek seçeneğe olan *in vitro* çoğaltımında ise farklı

genotiplerde başarının artırılması için mevcut protokollerin iyileştirilmesi büyük değer taşımaktadır.

*In vitro* çalışmalarda temel besin ortam içeriğinin organogenesis üzerine etkisi bilinmektedir [1-3]. Bu kapsamda bir çok bitki türünde yaygın olarak kullanılmakta olan Murashige ve Skoog [4] temel besin ortamında yer alan inorganik maddeler, tam kuvvette kullanılabildiği gibi bu ortamın özellikle makro elementlerinin tümü ya da bir kısmı farklı kuvvetlerde kullanıldığında sürgün ve kök oluşumu, sürgün kalitesi [5-7] ve sağlıklı *in vitro* bitki üretimi için sınırlayıcı faktörler olan camlaşma [8, 9], oksidasyon, sürgün ucu nekrozu, kararma [10] gibi fizyolojik sorunlara karşı iyi sonuç verebilmektedir. Bu kapsamda bitki dokularının büyüme ve gelişmesinde oynadığı rol nedeniyle üzerinde en fazla durulan makro elementin azot olduğu görülmektedir.

Özellikle temel besin ortamındaki azot kaynaklarına karşı bitki dokularının farklı tepkilerine dikkat çekilmekte ve bu ortamlardaki amonyum nitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) ve potasyum nitrat ( $\text{KNO}_3$ ) düzeylerinin azaltılması ile sürgün ve kök oluşumunda artış sağlandığı bildirilmektedir [11, 12]. Bu çalışmada, elmanın sürgün ucu kültürü ile çoğaltımında MS [4] temel besin ortamına  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 'ün 1/4, 1/3, 1/2 ve 1/1 düzeylerinde katılmasının sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri "Golden Delicious" ve "Mondial Gala" elma çeşitlerinde araştırılmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada bitkisel materyal olarak "Golden Delicious" ve "Mondial Gala" elma çeşitleri ile köklendirme aşamasında bu genotiplere ilave olarak kolay köklenen "MM106" anacının (kontrol) mikro sürgünleri kullanılmıştır. Mikro sürgünler, elma çeşit ve anaç parselindeki bitkilerden sürgün ucu tekniğine göre *in vitro* koşullara alınan ve daha sonra 4'er hafta ara ile alt kültürleri yapılan eksplantlardan elde edilmiştir. Bu amaçla 2008 ilkbahar gelişme döneminde taze sürgünlerden yaklaşık 3 cm uzunlukta toplanan sürgün uçları önce çeşme suyu altında yıkanmış ve ardından sterilizasyon için %15 klor içeren ticari sodyum hipokloritin %20'lik solusyonunda 15 dakika süreyle çalkalanmıştır. Sodyum hipokloritin dokulardan uzaklaşması için sürgün uçları steril saf su içerisinde 5'er dakika süreyle 3 kez yıkanmıştır. Steril sürgün uçları laminar hava akışlı kabin içerisinde aseptik koşullarda meristem ve 2-3 yaprak taslağını içerecek şekilde bisturi yardımı ile yaklaşık 10 mm uzunlukta kesilerek dikime hazırlanmıştır. Dikim, içerisinde 10 ml besin ortamı bulunan 120 mm x 25 mm boyutlarındaki cam tüplere yapılmıştır. Kültürler  $25\pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklık ve 16 saat aydınlık ( $35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odasında 4 hafta süreyle gelişmeye bırakılmıştır. İlk dikim aşamasının sonunda gelişen sağlıklı sürgünlerin tamamı 4'er hafta ara ile 3 kez alt kültüre alınmıştır. Alt kültürler için yaklaşık 2 cm uzunluğunda hazırlanan mikro sürgünler, içerisinde 50 ml ortam bulunan 250 ml'lik cam erlenmayerlere dikilmiştir. Alt kültürlerde besin ortamı olarak 1.0 mg/l BA ve 0.5 mg/l  $\text{GA}_3$  içeren pH'sı 5.8'e ayarlanmış, %3 sakkaroz ve %0.6 agar katılmış MS temel besin ortamı kullanılmıştır [4, 13, 14]. Ortamların sterilizasyonu Hirayama marka dijital otoklav ile  $121^\circ\text{C}$  ve 1 atmosfer basınç altında 20 dakika süreyle yapılmıştır.

"Golden Delicious" ve "Mondial Gala" elma çeşitlerinde sürgün oluşumu üzerine  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 'ün etkilerinin araştırıldığı denemede  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , MS temel besin ortamına 1/1 (1650 mg/l) (20.6 mM), 1/2 (825 mg/l) (10.3 mM), 1/3 (550 mg/l) (6.9 mM) ya da 1/4 (412.5 mg/l) (5.1 mM) düzeylerinde katılmıştır. Mikro sürgünlerin bu ortamlar üzerinde 4 hafta gelişmesinin ardından tüm kültürlerde eksplant (mikro sürgün) başına yeni oluşan sürgün sayısı, sürgünlerin ortalama uzunluk seviyesi (1-4) (1 = 5-10

mm, 2 = 11-20 mm, 3 = 21-30 mm, 4 = >30 mm), ortalama kalınlık seviyesi (1-3) (1 = <1 mm, 2 = 1-2 mm, 3 = >2 mm) ve kallus büyüklüğü (cm) kaydedilmiştir.

Köklendirme denemelerinde "Golden Delicious", "Mondial Gala" ve "MM106" elma genotiplerinde yaklaşık 2 cm uzunlukta hazırlanan mikro çeliklerin *in vitro* köklenmesi üzerine  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 'ün etkilerinin araştırıldığı denemede, farklı düzeylerde (1/1, 1/2, 1/3 ve 1/4)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  içeren MS ortamları ve ayrıca makro element düzeyi 1/2 olan MS ortamı kullanılmıştır. Bu ortamların tamamına Joshi ve ark. [14]'na göre 0.2 mg/l IBA+0.2 mg/l NAA ilave edilmiştir. Besin ortamlarına %2 sakkaroz ve %0.6 agar katılmış ve pH 5.8'e ayarlanmıştır. Köklenme oranının artırılması amacıyla zor (Golden Delicious) ve kolay (MM106) köklenen iki elma genotipinde kurulan diğer bir köklendirme denemesinde mikro çelikler farklı IBA (0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 ve 3.0 mg/l) veya IBA (0.5 mg/l) + NAA (0.5 mg/l) ilave edilmiş makro element düzeyi 1/2 olan MS besin ortamına doğrudan ya da IBA solusyonlarına (1000 ve 4000 ppm) 15 saniye süreyle hızlı daldırmanın ardından dikilmiştir. Köklendirme denemelerinde tüm kültürler ilk 1 hafta karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Daha sonra  $25\pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklık ve 16 saat aydınlık ( $35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odasında 7 hafta süreyle gelişmeye bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda tüm kültürlerde köklenme oranı (%), köklenen çeliklerde kök sayısı, en uzun kökün yanında ortalama kök uzunluğu (cm) ve köklenme düzeyi (1-4) (1=düşük, 2= orta, 3=iyi, 4= çok iyi) belirlenmiştir.

Denemeler "Tesadüf Parselleri Deneme Deseni"ne göre her birisinde 6 eksplant (mikro sürgün, mikro çelik) olmak üzere 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Tüm denemeler en az 2 kez tekrar edilmiştir. Veriler, varyans analizi yöntemi ile Minitab Paket Programı (MINITAB Inc.) ile *F* testine ( $P \leq 0.05$ ) göre kontrol edilmiş, ortaya çıkan önemli farklılıklar Duncan testi ile %5 hata sınırı esas alınarak saptanmış ve farklılıklar harfler yardımıyla belirlenmiştir. Analizlerde yüzde oranların açığı değeri karşılıkları kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çalışmada sürgün sayısı bakımından çeşit x uygulama arasındaki etkileşim istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ( $P = 0.033$ ). Çizelge 1'de de görülebileceği gibi farklı  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  düzeylerinde "Mondial Gala" çeşidinde elde edilen sürgün sayıları (5.6-8.7 adet/eksplant), "Golden Delicious" çeşidinde kaydedilenlerden (4.0-5.2 adet/eksplant) daha yüksek olmuştur. İstatistiksel anlamda eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 8.7 adet ile "Mondial Gala" çeşidinde 1/4  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  uygulamasında belirlenmiştir. "Golden Delicious" çeşidinde ise tam kuvvetteki MS ortamına göre  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  düzeyi 1/2, 1/3 ve 1/4 olan MS ortamlarının sürgün verimini artırdığı saptanmıştır. Özellikle 1/2 (5.2 adet/eksplant) ve 1/3 (4.6 adet/eksplant)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  uygulamaları diğer düzeyle-

**Çizelge 1.** MS ortamına farklı düzeylerde ilave edilen  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 'ün bazı elma çeşitlerinde *in vitro* sürgün oluşumu üzerine etkileri

Çeşit	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ Düzeyi	Sürgün Sayısı (adet/eksplant)	Sürgün Uzunluğu Seviyesi (1-4)*	Sürgün Kalınlığı Seviyesi (1-3)**	Kallus Büyüklüğü (cm)
Mondial Gala	1/4	8.7 A	2.3	2.3	0.4
	1/3	6.5 B	2.3	2.2	0.2
	1/2	5.6 BCD	2.6	2.1	0.3
	1/1	6.1 BC	2.6	2.1	0.4
Golden Delicious	1/4	4.2 D	2.5	2.3	0.3
	1/3	4.6 CD	2.6	2.2	0.3
	1/2	5.2 BCD	2.5	2.3	0.3
	1/1	4.0 D	2.5	2.6	0.4

\*Sürgün Uzunluğu Seviyesi (1-4); 1 = 5-10 mm, 2 = 11-20 mm, 3 = 21-30 mm, 4 = >30 mm.

\*\*Sürgün Kalınlığı Seviyesi (1-3); 1 = <1 mm, 2 = 1-2 mm, 3 = >2 mm.

re göre daha yüksek sürgün sayısına sahip olmuştur. Bununla birlikte bu çeşitte sürgün sayısı bakımından tüm uygulamalar aynı istatistik grup içerisinde yer almıştır (Çizelge 1). Sürgün uzunluğu ve kalınlığı seviyeleri ile kallus değerleri bakımlarından ise çeşit x uygulama arasındaki etkileşimler, çeşitler arası ve uygulamalar arası farklılıklar istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. Sürgün uzunluk düzeyi 2.3-2.6, sürgün kalınlık düzeyi 2.1-2.6 ve kallus değeri 0.2-0.4 cm arasında değişmiştir. Bir başka ifade ile tüm uygulamalarda sürgünler kaliteli olmuş ve büyük kallus gelişimleri belirlenmemiştir (Çizelge 1).

Sürgün sayısı bakımından yüksek değerlerin elde edildiği  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  düzeyi düşük olan MS ortamları, benzer etkiyi köklendirme denemesinde gösterememiştir (Çizelge 2). Köklendirme oranı bakımından sadece çeşitler arasındaki farklılığın istatistiksel anlamda önemli bulunduğu ( $P = 0.000$ ) bu denemede en yüksek köklenme oranı %25.6 ile "MM106" anacından elde edilmiştir. "Mondial Gala" çeşidi %13.3 ile "MM106" anacını izlemiş ve en düşük değer %1.1 ile "Golden Delicious" çeşidinde kaydedilmiştir (Çizelge 2). Köklenme ile ilgili diğer parametreler bakımından çeşitler ve uygulamalar arasında istatistiksel farklılıkların bulunmadığı çalışmada köklenen mikro çeliklerde ortalama kök sayısı 1.0-4.0, ortalama kök uzunluğu 1.2-5.3 cm, en uzun kök uzunluğu 1.2-5.8 ve köklenme düzeyi 0.2-2.0 arasında değişmiştir (Çizelge 2). Bu denemede köklenme oranı, kök kalitesi ve köklenme düzeyleri çok düşük seviyelerde kalmıştır. Bu bulgular, mikro çeliklerde köklenmeyi uyarmak üzere 0.2 mg/l seviyesinde kullanılan IBA+NAA kombinasyonunun yetersiz kaldığını ve sonuçta farklı  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  uygulamalarının köklenme üzerine etkisinin tam olarak belirlenemediğini göstermektedir.

Elma çeşitlerinde *in vitro* köklenmenin iyileştirilmesi amacıyla gerçekleştirilen diğer denemede köklenme oranı bakımından çeşit x uygulama arasındaki etkileşimler istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ( $P = 0.000$ ). Bu denemede en yüksek köklenme oranlarının (%88.9-100.0) kaydedildiği "MM106" anacında tüm uygulamalar aynı istatistik grup içerisinde yer almıştır. "Golden

Delicious" çeşidinde ise köklenme oranı özellikle 1000 ppm hızlı daldırma uygulamasında %50 ile en üst seviyesine ulaşmıştır. Belirtilen değer bu çeşitte diğer uygulamalarda kaydedilen değerlerden istatistiksel anlamda daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 3).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, MS [4] temel besin ortamına normal seviyesinin 1/4 oranında  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ilave edilmesinin özellikle "Mondial Gala" çeşidinde sürgün sayısını önemli düzeyde artırdığı belirlenmiştir. Bilindiği üzere MS besin ortamı diğer bir çok bitkide olduğu gibi meyve türlerinin mikro çoğaltımında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu besin ortamında 60 mM düzeyinde bulunan azot için önemli kaynaklar olan  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  20.6 mM,  $\text{KNO}_3$  18.8 mM konsantrasyonlarında kullanılmakta ve  $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$  oranı 1 : 2 oranına sahip bulunmaktadır [4, 15]. Bu yapıdan farklı olarak  $\text{NH}_4^+$  besin ortamlarında tek başına N kaynağı olarak kullanıldığında bir çok bitkide morfogenez ve büyümenin engellendiği, bu olayın serbest  $\text{NH}_4^+$  iyonlarının toksik etkisine ve ortamın pH'sındaki değişimlere bağlandığı, nitekim amonyumun ortamın pH'sını düşürdüğü ve düşük pH değerlerinde mineral maddelerin yararlılığının etkilendiği bildirilmektedir [7, 16]. Çalışmamızda  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  tek başına N kaynağı olarak kullanılmadığı gibi en yüksek  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  konsantrasyonu MS ortamında bulunması gereken miktara eşittir ve bu değerlerin üzerine çıkılmadığı için her iki elma çeşidinde de  $\text{NH}_4^+$  iyonlarının büyüme ve gelişme üzerine olumsuz etkisi çok şiddetli düzeyde ortaya çıkmamıştır. Ancak  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  normal miktarın 1/4, 1/3 ya da 1/2 oranlarında kullanıldığında sürgün miktarında çoğu kez artışlar sağlanmıştır. Bu bulgumuz bir çok araştırmacının bulguları ile uyumludur. Önemli bir İngiliz elma çeşidi olan Queen Cox'da sürgün proliferasyonu MS ortamının  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ve  $\text{KNO}_3$  düzeylerinin yarıya indirilmesi ile artış göstermiştir [17]. Bir orman ağacı türü olan *Schizlobium amazonicum*'da 1/2  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  düzeyi nodal eksplantlarda oksidasyonu önemli düzeyde azaltmış ve sürgün proliferasyonunu sağlamıştır [18].

**Çizelge 2.** MS ortamına farklı düzeylerde ilave edilen  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 'ün ve 1/2 düzeyinde katılan makro elementlerin bazı elma çeşitlerinde *in vitro* köklenme üzerine etkileri

Çeşit	Uygulama*	Köklenme Oranı (%)	Kök Sayısı	Ortalama Kök Uzunluğu (cm)	En Uzun Kök Uzunluğu (cm)	Köklenme Düzeyi (1-4)**
<b>Mondial Gala</b>	1/2 makro element	16.7	2.7	2.9	5.6	2.2
	1/4 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	22.2	2.3	1.2	2.5	1.5
	1/3 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.0	-	-	-	-
	1/2 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	5.6	4.0	3.1	4.1	2.0
	1/1 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	22.2	1.5	4.2	4.7	1.7
	<b>Ortalama</b>	<b>13.3 B</b>				
<b>Golden Delicious</b>	1/2 makro element	5.6	1.0	5.2	5.2	0.5
	1/4 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.0	-	-	-	-
	1/3 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.0	-	-	-	-
	1/2 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.0	-	-	-	-
	1/1 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	0.0	-	-	-	-
	<b>Ortalama</b>	<b>1.1 C</b>				
<b>MM106</b>	1/2 makro element	38.9	1.6	3.7	4.4	1.4
	1/4 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	22.2	1.5	3.3	4.2	0.7
	1/3 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	22.2	2.1	5.3	5.8	1.2
	1/2 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	33.4	1.3	4.0	4.1	0.5
	1/1 $\text{NH}_4\text{NO}_3$	11.1	1.0	1.2	1.2	0.2
	<b>Ortalama</b>	<b>25.6 A</b>				

\* Tüm ortamlara 0.2 mg/l IBA + 0.2 mg/l NAA ilave edilmiştir. Kültürler ilk 1 hafta karanlıkta tutulmuştur.

\*\*Köklenme düzeyi (1-4); 1=düşük, 2=orta, 3=iyi, 4=çok iyi

**Çizelge 3.** Farklı IBA dozları ve uygulamalarının bazı elma çeşitlerinde *in vitro* köklenme üzerine etkileri

Çeşit	Uygulama*	Köklenme Oranı (%)	Kök Sayısı	Ortalama Kök Uzunluğu (cm)	En Uzun Kök (cm)	Köklenme Düzeyi (1-4)**
<b>Golden Delicious</b>	0.25 mg/l IBA	8.3 CD	3.0	4.7	5.6	2.5
	0.50 mg/l IBA	0.0 D	-	-	-	-
	0.50 mg/l IBA+NAA	5.6 CD	1.0	2.5	2.5	0.5
	1.0 mg/l IBA	0.0 D	-	-	-	-
	1.5 mg/l IBA	0.0 D	-	-	-	-
	2.0 mg/l IBA	0.0 D	-	-	-	-
	3.0 mg/l IBA	15.0 CD	1.5	1.3	1.5	0.2
	1000 ppm IBA	50.0 B	3.1	1.5	3.1	0.9
	4000 ppm IBA	22.2 C	2.7	2.4	3.1	1.4
	<b>MM106</b>	0.25 mg/l IBA	100.0 A	4.7	2.5	4.3
0.50 mg/l IBA		100.0 A	6.9	3.2	5.2	1.4
0.50 mg/l IBA+NAA		100.0 A	9.1	1.9	4.0	1.5
1.0 mg/l IBA		100.0 A	9.6	2.2	4.2	1.8
1.5 mg/l IBA		100.0 A	9.8	2.2	3.8	1.2
2.0 mg/l IBA		100.0 A	7.6	1.8	2.9	0.8
3.0 mg/l IBA		88.9 A	8.1	1.3	2.4	0.8
1000 ppm IBA		100.0 A	2.6	2.4	3.5	0.8
4000 ppm IBA		88.9 A	5.7	2.0	3.4	1.1

\* Temel besin ortamı olarak makro element düzeyi ½ olan MS ortamı kullanılmıştır. Kültürler ilk 1 hafta karanlıkta tutulmuştur.

\*\*Köklenme düzeyi (1-4); 1=düşük, 2=orta, 3=iyi, 4=çok iyi

Hipokotil ve yaprak segmenti eksplantlarının kullanıldığı brokoli kültürlerinde proliferasyon oranı yine 1/2  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  düzeyinin esas alındığı MS besin ortamında en yüksek olmuştur [19]. Sato ve ark. [20] ise manyok bitkisinin mikro çoğaltımında kültür ortamının optimizasyonu için amonyum nitrat konsantrasyonunun normal miktarın yarısından daha fazla düşürülmesini önermiştir. Ogura-Tsujita ve Okubo [11]  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ve  $\text{KNO}_3$ 'ün %25 ve %50 oranlarında azaltılması ile Japon orkidesi rizomlarından sürgün oluşumunun uyarıldığını belirtmişlerdir. Ivanova ve Staden [9], zambakgiller familyasından *Aloe compressa*'nın *in vitro* rejenerasyonu için  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 'ü 10.3, 20.6 ve 61.8 mM seviyelerinde denemişler ve en yüksek seviyede sağlıklı sürgünü, düşük  $\text{NH}_4^+$  (10.3 mM) ve düşük sitokinin (1 mg/l BA ya da zeatin) miktarları ile sağlamışlardır. Çalışmamızda elma çeşitlerinde köklenme üzerine MS besin ortamına farklı seviyelerde  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ilave edilmesinin etkileri de araştırılmıştır. Ancak, bu ortamda kullanılan oksin kombinasyonunun (IBA+NAA) dozunun (0.2+0.2 mg/l) kök oluşumunu uyarmada yetersiz kalması nedeniyle bu denemede sağlıklı veriler elde edilememiş ve farklı  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  uygulamaları arasındaki farklılıklar da önemli bulunmuştur. *In vitro* koşullarda köklenme yeteneği yüksek olan MM106 anacında dahi v%25.6 oranında bir köklenme elde edilirken "Golden Delicious" ve "Mondial Gala" çeşitlerinde bu oran sırasıyla %1.1 ve %13.3 olarak belirlenmiştir. Buna karşın bir kültür elma çeşidi olan "Green Sweet"'in mikro çeliklerinin köklenmesi için aynı dozda IBA+NAA kombinasyonunun %55.6 oranında köklenme sağladığı bildirilmektedir [14]. Diğer vegetatif çoğaltma tekniklerinde olduğu gibi mikro çeliklerin köklenmesinde de genotipin etkisi büyüktür. Çalışmamızda köklenmesi zor olan elma genotiplerinde mikro çeliklerin *in vitro* köklenme oranını artırmak üzere farklı uygulamalar denenmiştir. Bu kapsamda farklı IBA (0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 ve 3.0 mg/l), IBA+NAA (0.5+0.5 mg/l) ilave edilmiş makro element düzeyi 1/2 olan MS besin ortamlarına mikro çelikler doğrudan ya da IBA solusyonlarına (1000 ve 4000 ppm) hızlı daldırma yapıldıktan sonra dikilmiştir. Köklenmesi kolay olan "MM106" anacında tüm uygulamalar iyi sonuç verirken (%88.9 ve %100), köklenmesi zor olan "Golden Delicious" çeşidinde en iyi sonuç (%50) sadece 1000 ppm IBA solusyonuna hızlı daldırma uygulamasından elde edilmiştir. Bununla birlikte Yepes ve Aldwinckle [13] 6 farklı elma genotipinde mikro sürgünlerde en iyi köklenmeyi genotiplere bağlı olarak %67-%100 arasında değişen oranlarda 0.1-1.0 mg/l IBA ile sağlamışlardır. Laszloffy ve ark. [21] ise "Julyred" elma çeşidinde 1/2 MS temel besin ortamında mikro sürgünlerde köklenme oranını kontrolde %40, 0.5 ve 1.0 mg/l IBA uygulamalarında sırasıyla %80 ve %90 olarak bildirmişlerdir. Ma ve ark. [22] "Royal Gala" elma çeşidinde 0.5 mg/l IBA uygulaması ile %57.8 oranında köklenme elde etmişlerdir. ZhongWu ve ark. [23] "Red General Fuji" elma çeşidinde 0.5 mg/l IBA+0.5 mg/l

NAA içeren 1/2 MS besin ortamı üzerinde 15 gün karanlık uygulaması sonrasında %86 oranında köklenme sağlamışlardır. Bulgularımız elmada *in vitro* köklenme üzerine 1000 ppm IBA solusyonuna hızlı daldırma uygulamasının zor köklenen genotiplerde dahi başarılı olabileceğini göstermektedir. Bundan sonraki aşamada *in vitro* köklenmede başarılı sonuç veren bu uygulama kullanılarak özellikle zor köklenen genotipler için köklenme oranı ve kök kalitesini arttırmak üzerine MS ortamına farklı düzeylerde  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ilave edilmesinin etkileri araştırılacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Niedz RP, Evens TJ, 2007. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 43:370-381.
- [2] Kovalchuk I, Lyudvikova Y, Volgina M, Reed BM, 2009. Medium, container and genotype all influence *in vitro* cold storage of apple germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96:127-136.
- [3] Shin SL, Lee CH, 2009. *In vitro* medium composition and culture method affecting masspropagation of *Omsunda japonica* Thunb. Prothalli. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 27:299-304.
- [4] Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- [5] Sriskandarajah S, Skirvin RM, Abu-Qaoud H, 1990. The effect of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21:185-189.
- [6] Orlikowska T. 1992. Effects of mineral composition and acidity of media, saccharose level, brand and quantity of agar on rooting of fruit rootstocks *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 34:45-52.
- [7] Bennett IJ, McDavid DAJ, McComb JA, 2003. The influence of ammonium nitrate, pH and indole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulus*. *Biologia Plantarum*, 47:355-360.
- [8] Brand MH, 1993. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35:203-209.
- [9] Ivanova M, Staden JV, 2008. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92:227-231.
- [10] Sha L, McCrown BH, Peterson LA, 1985. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 110:631-634.

- [11] Ogura-Tsujita Y, Okubo H, 2006. Effects of low nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxins, and cytokinins in *in vitro* shoot formation from rhizomes of *Cymbidium kanran*. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42:614–616.
- [12] Wang YT, 2008. High  $\text{NO}_3\text{-N}$  to  $\text{NH}_4\text{-N}$  ratios promote growth and flowering of a hybrid *Phalaenopsis* grown in two root substrates. *HortScience*, 43:350–353.
- [13] Yepes LM, Aldwinckle HS, 1994. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Regulation*, 15:55–67.
- [14] Joshi SK, Bisht V, Dhar U, Joshi M, Bisht AK, 2008. *In vitro* regeneration of ‘Green Sweet’ apple via nucellus-raised callus. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83:447–452.
- [15] Avila AL, Pereyra SM, Argüello JA, 1998. Nitrogen concentration and proportion of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  affect potato cultivar response in solid and liquid media. *HortScience*, 33:336–338.
- [16] Ivanova M, Staden JV, 2009. Nitrogen source, concentration, and  $\text{NH}_4^+\text{:NO}_3^-$  ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99:167–174.
- [17] Wilson FM, James DJ, 2003. Regeneration and transformation of the premier UK apple (*Malus x pumila* Mill.) cultivar Queen Cox. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78:656–662.
- [18] Cordeiro IMCC, Lameira OA, Menezes ICC, Reis LRS, 2004. Effect of different ammonium nitrate concentrations in the control of *in vitro* stem segments oxidation of parica (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). *Revista de Ciencias Agrarias*, 41:97–104.
- [19] Suri SS, Saini ARK, Ramawat KG, 2005. High-frequency regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *European Journal of Horticultural Science*, 70:71–78.
- [20] Sato AY, Maria J, Sedyama T, Borem A, Cecon PR, Junqueira CS, 2001. Cassava micropropagation: effect of ammonium nitrate concentrations with and without BAP. *Revista Ceres*, 48:405–413.
- [21] Laszloffy K, Abdulkader AM, Mathe A, 1991. *In vitro* propagation of ‘Julyred’ apple. *Acta Horticulturae*, 300:149–154.
- [22] Ma JH, Yao JL, Cohen D, Morris B, 1998. Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation from apple shoot cultures. *Plant Cell Reports*, 17:211–214.
- [23] ZhongWu J, JiaMing S, XiaoNa D, YuFen S, Qiang Y, LaiQing S, HuaiRui S, 2008. Establishment of adventitious shoot regeneration system from leaves of Red General Fuji apple cultivar (*Malus domestica*) *in vitro*. *Journal of Fruit Science*, 25:797–800.