

Pixy Erik Klon Anacının Mikro Çoğaltımında Destek Sistemli Sıvı Besin Ortamının Sürgün Çoğaltma Aşamasında Performansı

Alper ÖLMEZ¹, Hatice DUMANOĞLU^{2*}, Gülüstan POLAT¹

¹Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE

²Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara/TÜRKİYE

Alınış tarihi: 22 Şubat 2025, Kabul tarihi: 25 Mayıs 2025

Sorumlu yazar: Hatice DUMANOĞLU, e-posta: dmanoglu@agri.ankara.edu.tr

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Pixy erik klon anacının (*P. insititia* L.) mikro çoğaltımında sürgün çoğaltma aşamasında destek sistemli sıvı besin ortamının, farklı BAP (6-benzil amino pürin) dozları ile birlikte sürgün canlılığı, çoğaltımı ve kalitesi üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Yöntem: Bitkisel materyal olarak alt kültürlerden sağlanan mikro sürgünler kullanılmıştır. Modifiye edilmiş Murashige ve Skoog (MS) besin ortamına 0.01 mg L⁻¹ IBA (indol-3-bütirik asit) ve 0.1 mg L⁻¹ GA₃ (gibberellik asit) ile birlikte BAP'ın 0.5 mg L⁻¹ veya 1.0 mg L⁻¹ dozları, 30 g L⁻¹ sakaroz ilave edilmiştir. Yarı katı besin ortamı 0.65 g L⁻¹ agar ile katılaştırılmıştır. Sıvı besin ortamında destek sistemi olarak filtre kâğıdı kullanılmıştır. Kültürler 25±1 °C sıcaklık ve 16 saat aydınlık (35 µmol m⁻² s⁻¹) koşullarda tutulmuştur. Dördüncü haftanın sonunda sürgünlerde canlılık oranı, canlı kalan kültürlerde sürgün çoğalma oranı, sürgün sayısı, uzunluğu, kalınlık düzeyi (1-3) ve yaprak sayısı belirlenmiştir.

Araştırma Bulguları: Sürgünlerde canlılık oranı BAP dozlarının ortalaması olarak sıvı ortamda (%100.0), yarı katı ortama (%66.7) göre ve canlı kalan kültürlerde çoğalma oranı yarı katı ortamda (%91.7), sıvı ortama (%73.6) göre istatistiksel anlamda önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Tüm uygulamaların ortalaması olarak sürgün sayısı 2.8±0.3 ve yaprak sayısı ise 8.0±0.6 adet/eksplant, sürgün kalınlık düzeyi 2.0±0.1 olarak belirlenmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu, yarı katı ortamda (10.1±3.1 mm), sıvı ortamdan (8.0±2.5 mm) daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç: Sıvı ortamda eksplantların canlılık oranı yarı katı ortama göre %33.3 daha yüksek bulunmuştur. Bu

durum dikkate alınarak canlılık yüzdesine göre hesaplanan sürgün çoğalma oranı sıvı ortamda (%73.6), yarı katı ortamdan (%61.2) %12.4 daha yüksek gerçekleşmiştir. Her iki ortam tipinde de sürgünler genellikle benzer sayıda ve kalitede üretilmiştir. Ortam tiplerinin ortalaması olarak BAP'ın 0.5 mg L⁻¹ dozu (%88.5), 1.0 mg L⁻¹ dozuna (%72.9) göre sürgün çoğaltım oranını artırmıştır.

Anahtar kelimeler: *Prunus insititia*, *in vitro*, 6-benzil amino pürin, yarı katı ortam

Performance of Liquid Nutrient Medium with Support System in Micropropagation of Pixy Plum Clone Rootstock in Shoot Proliferation Stage

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the effects of liquid nutrient medium with support system, together with different BAP (6-benzylaminopurine) doses, on shoot survival, multiplication and quality during the shoot proliferation stage in micropropagation of Pixy plum clone rootstock (*P. insititia* L.).

Material and Methods: Micro shoots obtained from subcultures were used as plant material. Modified Murashige and Skoog (MS) nutrient medium containing 0.01 mg L⁻¹ IBA (indole-3-butyric acid) and 0.1 mg L⁻¹ GA₃ (gibberellic acid), 0.5 mg L⁻¹ or 1.0 mg L⁻¹ doses of BAP and 30 g L⁻¹ sucrose were added. Semi-solid nutrient medium was solidified with 0.65 g L⁻¹ agar. Filter paper was used as a support system in liquid nutrient medium. Cultures were kept at 25±1 °C and 16 h light (35 µmol m⁻² s⁻¹) conditions. At the end of the fourth week, shoot survival percentage and shoot proliferation percentage, shoot number, length,

thickness level (1-3) and leaf number in surviving cultures were determined.

Results: As an average of BAP doses, shoot survival percentage was found to be significantly higher in liquid medium (%100.0) than in semi-solid medium (%66.7), whereas the proliferation percentage in surviving cultures was statistically significantly higher in semi-solid medium (%91.7) than in liquid medium (%73.6). As an average of all treatments, shoot number and leaf number were determined as 2.8 ± 0.3 and 8.0 ± 0.6 per explant, respectively, and shoot thickness level was 2.0 ± 0.1 . The average shoot length was found to be higher in semi-solid medium (10.1 ± 3.1 mm) than in liquid medium (8.0 ± 2.5 mm).

Conclusion: The survival percentage of explants in liquid medium was found to be 33.3% higher than in semi-solid medium. In this case, the shoot proliferation percentage calculated according to the survival percentage was 12.4% higher in liquid medium (73.6%) than in semi-solid medium (61.2%). Shoots were generally produced in similar numbers and quality in both media types. As an average of media types, 0.5 mg/L dose of BAP (88.5%) increased the shoot proliferation percentage compared to 1.0 mg/L (72.9%).

Key words: *Prunus insititia*, *in vitro*, 6-benzylaminopurine, semi-solid medium

Giriş

Birçok meyve türünde kültür çeşitlerinin vejetatif olarak en fazla aşıyla çoğaltılmasından dolayı anaçların önemi büyüktür. Anaçlar, köklenme yeteneği bulunmayan çeşitlere kök sistemi kazandırmasının ötesinde çeşidin gelişme kuvveti, gençlik kısırlığı süresi, verimliliği, meyve kalitesi, abiyotik ve biyotik stres unsurlarına dayanıklılık gibi birçok özelliğini etkileyebilmektedir (Hartmann ve ark., 2011). Gelişme kuvvetlerine göre bodur, orta kuvvette ya da kuvvetli olarak sınıflandırılabilen anaçlardan bodur olanlar, erken yaşlardan itibaren birim alandan yüksek miktarda kaliteli ürünün elde edilebilmesine ve başarılı bir bahçe yönetimine olanak sağlayabildiğinden modern meyvecilikte birçok türde tercih edilmektedir (Donadio ve ark., 2019). Sert çekirdekli meyve türlerinde kullanılmakta olan erik ve erik hibridi anaçlar genellikle zayıf büyüme karakterleri ve vejetatif olarak kolay çoğaltılabilmeleri nedeniyle özellikle su tutan ağır topraklarda erik, kayısı, şeftali ve nektarin çeşitlerine anaç olarak küresel anlamda sıklıkla

önerilmektedir (Uğur ve ark., 2023; Lang, 2024). Bu kapsamda *Prunus insititia* türüne dâhil bodur bir klon anaç olan Pixy de başta erikler olmak üzere kayısı, şeftali ve nektarin çeşitleri için kullanılabilen uyuşur bir erik anacıdır (U.S. Patent No. Plant 4,061, 1977; Dolgun ve ark. 2008). Bu anaç St. Julien d'Orleans tipi ağaçlardan 1947 yılında Fransa'da serbest tozlanma sonucu elde edilmiş tohumlardan üretilen 1500 çöğür arasından 1971 yılında İngiltere'de East Malling Araştırma İstasyonu'nda Beakbane tarafından seçilmiştir. Pixy anacı üzerinde erik ağaçları Saint Julien A (*P. insititia*) anacı üzerindeki yarısı veya üçte ikisi kadar gelişmekte, erken yaşta ve bol ürün vermektedir. Meyve iriliğinin artması için seyreltme yapılması gerekebilmektedir. Bakteriyel kansere dayanıklı olan Pixy anacı (U.S. Patent No. Plant 4,061, 1977) hemen hiç kök sürgünü oluşturmeyen, toprağa tutunması güçlü ağaçlar meydana getirmektedir. Bu anaç üzerinde meyvelerin renklenmesi iyi, suda çözünabilir şeker oranı yüksektir (Westwood, 1980). Pixy, vejetatif olarak çelikle çoğaltılabilmektedir (U.S. Patent No. Plant 4,061, 1977), ancak doku kültürleri ile mikro çoğaltımında, çelikle çoğaltıma göre üretim katsayısının daha yüksek olduğu ve bu yöntemle mikrobiyal etmenlerin yayılımının da olmadığı belirtilmektedir (Jones ve Hopgood, 1979; Dolgun ve ark., 2008; Geyik ve Canlı, 2015; Pakyürek ve Hepaksoy, 2020).

Bitkilerde mikro çoğaltım, köklenme zorluğu nedeniyle çelik ve daldırma gibi geleneksel yöntemlerle çoğaltılması mümkün olmayan ya da yeterli düzeyde çoğaltılamayan klon anaçların kısa sürede, mevsime bağlı kalmadan, kitlesel olarak fazla miktarda, hastalık ve zararlılardan arı olarak üretiminde söz sahibi bir çoğaltım tekniğidir (Lal ve ark., 2023). Bu çoğaltım yönteminde esas olarak 4 aşama bulunmaktadır. Bunlar; 1) eksplantların kültüre alındığı başlangıç aşaması, 2) sürgün çoğaltma (proliferasyon), 3) köklendirme ve 4) dış koşullara alıştırma aşamalarıdır (Hartmann ve ark., 2011; Lal ve ark., 2023). Mikro sürgünlerin alt kültürler ile çoğaltıldığı sürgün çoğaltma aşaması, bir genotipte mikro çoğaltım yönteminin ekonomik verimliliğini belirleyen önemli bir aşamadır. Bu aşamada iyi kalitede mikro sürgünlerin elde edilebilmesi ve yüksek çoğaltım oranına ulaşılabilmesi için öncelikle uygun çoğaltım protokolünün her genotip için geliştirilmesi gerekmektedir (Nowakowska ve ark., 2022). Besin ortamının tipi, içeriği, büyümeyi düzenleyici maddeler ve dozları sürgün çoğaltma aşamasında

başarıyı etkileyen önemli faktörler arasındadır (Hartmann ve ark., 2011). Bu aşamada ortam tipi olarak genellikle agar ile katılaştırılmış yarı katı besin ortamları kullanılmakta ise de mikro sürgünlerin besin içeriğinden daha verimli faydalanmasını sağlayan sıvı besin ortamları özellikle yüksek çoğaltım oranı ve sürgün gelişimi hedeflendiğinde tercih edilmektedir. Ayrıca, pahalı bir girdi olan agarın bertaraf edilmesiyle sıvı ortamlarda üretim maliyeti düşmekte ve bu ortamlar otomasyon süreçleri için önemli bir adım olarak kabul edilmektedir (Mehta ve ark., 2014). Bununla birlikte eksplantın sıvı ortamla doğrudan ve uzun süreli temas durumu daha az oksijen kullanımını ve dokularını hiperhidrik (camlaşma) hale gelmesine neden olabilmektedir. Camlaşma, *in vitro* sürgün ve bitkiciklerin dış koşullara uyumunu zorlaştırmaktadır. Sıvı kültür sistemlerindeki en ciddi bozukluk olan camlaşmanın önlenmesi amacıyla eksplantın bir kısmının sıvı ortam dışında kalmasına yardımcı olacak hindistan cevizi lifi, pamuk lifi, filtre kâğıdı, cam yünü, luffa süngeri, polistiren köpük, polyester yüzen raft, polipropilen membran raft, cam boncuk gibi steril edilebilen malzemelerden oluşturulan destek sistemleri sıvı ortamlarda kullanılabilir (Preil, 2005; Dutta Gupta ve Prasad, 2006; Nirmal ve ark., 2023).

Mikro çoğaltımın sürgün oluşturma aşamasında ortam tipi kadar hücre bölünmesini uyuracak büyümeyi düzenleyici maddelerin kullanılması da önemlidir. Bu amaçla sitokininler doğrudan ya da dolaylı olarak sürgün oluşumunu uyarmada çok etkili büyümeyi düzenleyici maddelerdir. Sitokininlerin birçok tipi bulunmaktadır. Ucuz ve etkili sentetik bir sitokinin olan BAP doku kültürü çalışmalarında sürgün çoğaltımı amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Van Staden ve ark., 2008). Pixy anacında bu amaçla BAP'ın, TDZ'den (thidiazuron) daha etkili bir sitokinin olduğu belirlenmiştir (Geyik ve Canlı, 2015). Benzer olarak Arıcı (2008) ve Shabani ve ark. (2015) Myrobalan 29C erik anacının (*P. cerasifera*), Wolella (2017) Stanley erik çedinin (*P. domestica*), Thakur ve ark. (2021) da Frontier erik çeşidinin (*Prunus salicina* L.) mikro çoğaltımında sürgün çoğaltım aşamasında BAP'ı, kinetin ya da TDZ'den daha etkili bulmuşlardır.

Bu çalışmada, Pixy erik klon anacının mikro çoğaltımında sürgün çoğaltma aşamasında filtre kâğıdı destek sistemli sıvı besin ortamının ve BAP dozlarının (0.5 mg L⁻¹ ve 1.0 mg L⁻¹) sürgün canlılığı, çoğaltımı ve kalitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak Pixy erik klon anacının (*P. insititia* L.) *in vitro* alt kültürlerinden sağlanan mikro sürgünler kullanılmıştır.

Sürgün ucu kültürü ile eksplantların kültüre alınması ve denemeler öncesinde alt kültürlerin yapılışı

Eksplantların kültüre alındığı başlangıç aşamasında fidanlıkta saksıda dikili 2 yaşlı Pixy anacının aktif gelişme dönemindeki sürgün uçları 2 cm uzunlukta alınmış ve çeşme suyu altında 20 dakika süreyle yıkanmıştır. Fazla suyu kurulan sürgün uçları 1-2 damla Tween 20 damlatılmış %0.1'lik civa klorür çözeltisi içerisinde 2.5 dakika süre ile çalkalanarak sterilize edilmiştir. Aseptik koşullarda steril saf su ile 5'er dakika süreyle 4 kez yıkanan sürgün uçları laminar kabinde meristem ve 2-3 yaprak taslağını içerecek şekilde bisturi yardımı ile yaklaşık 1 cm uzunlukta kesilerek yarı katı besin ortamına dikilmiştir. Dördüncü haftanın sonunda yeni çoğalmış sağlıklı sürgünler aynı içerikteki taze yarı katı besin ortamına dikilerek 1. alt kültür oluşturulmuştur. Daha sonra 4'er hafta arayla sürgünlerin taze yarı katı besin ortamına dikilmesiyle alt kültürler tekrar edilmiştir. Başlangıç ve alt kültürlerde dikimler, içerisinde 10 ml besin ortamı bulunan 120 mm x 25 mm boyutlarındaki cam tüplere yapılmıştır. Bu aşamalarda Modifiye edilmiş MS temel besin ortamı esas alınmıştır (Çizelge 1) (Murashige ve Skoog, 1962; Dodds ve Roberts, 1993). Bu ortama, 0.5 mg L⁻¹ BAP, 0.01 mg L⁻¹ IBA, 0.1 mg L⁻¹ GA₃, 2 mg L⁻¹ PPM (Plant Preservative Mixture) ve 30 g L⁻¹ sakkaroz ilave edilmiştir. Ortamın pH'sı 5.6'ya ayarlanmış ve ortam %0.65 agar ile katılaştırılmıştır.

Denemelerin kurulması, sürgün çoğaltımı ve parametreler

Bu çalışma Pixy anacının sürgün çoğaltma aşamasını kapsamaktadır. Deneme konuları filtre kâğıdı destek sistemli sıvı besin ortamı ve yarı katı besin ortamı olarak iki farklı besin ortamı tipi ile 0.5 mg L⁻¹ ve 1.0 mg L⁻¹ olarak iki farklı BAP dozudur.

Çalışmanın tüm uygulamalarında modifiye edilmiş MS temel besin ortamına (Çizelge 1) 0.01 mg L⁻¹ IBA ve 0.1 mg L⁻¹ GA₃ ve 30 g L⁻¹ sakkaroz ilave edilmiştir. Deneme konularına göre bu ortama 0.5 mg L⁻¹ veya 1.0 mg L⁻¹ BAP katılmıştır. Ortamın pH'sı 5.6'ya ayarlanmıştır. Yarı katı besin ortamı denemeleri %0.65 agar ile katılaştırılırken sıvı besin ortamı denemelerinde destek sistemi kullanılmıştır.

Çizelge 1. Modifiye edilmiş Murashige ve Skoog (MS) temel besin ortamının içeriği

Madde Adı	g mol ⁻¹	mg L ⁻¹
(A) Makro elementler		
Amonyum nitrat (NH ₄ NO ₃)	80.04	1650
Potasyum nitrat (KNO ₃)	101.11	1900
Kalsiyum klorür dihidrat (CaCl ₂ .2H ₂ O)	147.02	440
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	136.09	170
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	246.48	370
(B) Demir		
Soydum-demir EDTA (C ₁₀ H ₁₂ N ₂ FeNa)	367.1	36.7
(C) Mikro elementler		
Mangan sülfat monohidrat (MnSO ₄ .H ₂ O)	169.02	16.9
Çinko sülfat heptahidrat (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	287.54	8.6
Borik asit (H ₃ BO ₃)	61.83	6.2
Potasyum iyodür (KI)	166.01	0.83
Sodyum molibdat dihidrat (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	241.95	0.25
Bakır sülfat pentahidrat (CuSO ₄ .5H ₂ O)	249.68	0.025
Kobalt klorür heksahidrat (CoCl ₂ . 6H ₂ O)	237.9	0.025
(D) Amino asit ve vitaminler		
Glisin (C ₂ H ₅ NO ₂)	75.07	2
Myo-Inositol (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180.16	100
Thiamin klorid hidroklorid (C ₁₂ H ₈ Cl ₂ N ₄ O ₅ .H ₂ O)	337.27	0.1
Nikotinik asit (C ₆ H ₅ NO ₂)	123.11	0.5
Pridoksol hidroklorid (C ₈ H ₁₂ ClNO ₃)	205.64	0.5

Destek sistem, sıvı besin ortamlarının konulduğu tüpler içerisine 2x20 cm boyutlarında şerit halinde filtre kâğıdının kedi merdiveni şeklinde katlanması ve sürgün dikiminin yapılabilmesi için ortasının

delinmesiyle hazırlanmıştır (Şekil 1). Kullanılmadan önce filtre kâğıdı destek sistemleri bir saat süreyle otoklavlanmıştır. Tüm besin ortamlarının sterilizasyonu otoklav ile 121 °C ve 1 atmosfer basınç altında 20 dakika süreyle yapılmıştır.



Şekil 1. Sıvı kültürlerde kullanılan filtre kâğıdı destek sistemi

Mikro sürgünler, başlangıç aşamasından sonraki 2. ve 3. alt kültürlerden sağlanmıştır. Aseptik koşullarda alt kültürlerden alınan sürgünlerin uç kısmı dışındaki tüm yaprakları kesilmiş ve yaklaşık 10 mm uzunluktaki mikro sürgünler içerisinde 10 ml besin

ortamı bulunan 120 mm x 25 mm boyutlarındaki cam tüplere dikilmiştir.

Bu çalışmadaki tüm kültürler 25±1 °C sıcaklık ve 16 saat aydınlık (35 µmol m⁻² s⁻¹), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odasında gelişmeye bırakılmıştır.

Kültürlerin 4. haftasının sonunda sürgünlerde canlılık oranı (%), canlı kalan sürgünlerde sürgün çoğalma oranı (%), çoğalan sürgünlerde ortalama sürgün sayısı (adet/eksplant), ortalama sürgün uzunluğu (cm), ortalama sürgün kalınlık düzeyi (1-3) (1=>1.0 mm (ince), 2=1.0 mm (orta), 3=1.0 mm <(kalın)) ve ortalama yaprak sayısı (adet/sürgün) belirlenmiştir.

Deneme deseni ve istatistiksel analiz

Denemeler, "Tesadüf Parselleri Deneme Deseni"'ne göre 18 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Bir tekerrür, içerisinde bir mikro sürgünün dikili olduğu bir tüptür. Veriler, varyans analizi yöntemi ile Minitab Paket Programı (MINITAB Inc.) ile *F* testine ($P \leq 0.05$, 0.01 ve 0.001) göre kontrol edilmiştir. Analizlerde yüzde oranların açığı değeri karşılıkları kullanılmıştır. Çalışma 2 kez tekrar edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada Pixy erik klon anacının mikro çoğaltımında sürgün çoğaltma aşamasında 0.01 mg L⁻¹ IBA ve 0.1 mg L⁻¹ GA₃ ile birlikte BAP'ın 0.5 mg L⁻¹ veya 1.0 mg L⁻¹ dozlarının ilave edildiği yarı katı ya da

filtre kâğıdı destek sistemli sıvı MS besin ortamı tiplerinin sürgün canlılığı, çoğaltımı ve kalitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Mikro çoğaltım yönteminin başarısında sürgün çoğaltma aşamasında *in vitro* kültürlerdeki yüksek canlılık ve sürgün çoğaltma oranları ile sürgün sayısı ve kalitesi önemli unsurlardır. Bu özellikler üretim katsayısını artırmanın yanında sürgün kalitesinin etkili bir faktör olduğu köklendirme ve köklendirilmiş mikro çeliklerin dış koşullara alıştırılması aşamaları için de önemlidir (Hartmann ve ark., 2011).

Bu çalışmada incelenen parametrelerde genel olarak ortam tipi x BAP dozu arasındaki etkileşim istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır (Çizelge 2). Mikro sürgünlerde canlılık oranı bakımından sadece ortam tipleri arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemli olmuş ve BAP dozlarının ortalaması olarak destek sistemli sıvı ortam tipinde (%100.0), yarı katı ortamdaki (%66.7) daha yüksek canlılık değerleri kaydedilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Pixy anacında farklı ortam tipleri ve BAP dozlarının sürgün proliferasyonu ve kalitesi üzerine etkileri

Ortam tipi	BAP ^a	Canlılık oranı (%)	Sürgün çoğalma oranı (%)	Sürgün sayısı (adet/eksplant)	Ortalama sürgün uzunluğu (mm)	Ortalama sürgün kalınlık düzeyi (1-3) ^b	Ortalama yaprak sayısı (adet/sürgün)
Filtre kâğıdı destekli sıvı besin ortamı	0.5 mg L ⁻¹	100.0±0.0	80.6±6.7	3.4±0.4	8.2±0.5	1.9±0.1	7.0±0.4
	1.0 mg L ⁻¹	100.0±0.0	66.7±8.0	2.9±0.3	7.7±0.5	2.0±0.1	7.8±0.7
	Ortalama	100.0±0.0 A ^c	73.6±5.2 B		8.0±2.5 B		
Yarı katı besin ortamı	0.5 mg L ⁻¹	69.4±7.8	100.0±0.0	2.8±0.4	9.8±1.3±	2.2±0.2	8.8±0.7
	1.0 mg L ⁻¹	63.9±8.1	82.6±8.1	2.3±0.3	10.4±0.9	2.1±0.2	8.4±0.6
	Ortalama	66.7±5.6 B	91.7±4.0 A		10.1±3.1 A		
Ortam tiplerinin ortalaması	0.5 mg L ⁻¹		88.5±4.1 A				
	1.0 mg L ⁻¹		72.9±5.8 B				
Ortalama				2.8±0.3		2.0±0.1	8.0±0.6
<i>P</i> (ortam tipi)		0.000*** ^d	0.014*	0.086 ^{ö.d.}	0.007**	0.362 ^{ö.d.}	0.139 ^{ö.d.}
<i>P</i> (BAP)		0.622 ^{ö.d.}	0.030*	0.187 ^{ö.d.}	0.960 ^{ö.d.}	0.881 ^{ö.d.}	0.812 ^{ö.d.}
<i>P</i> (ortam tipi x BAP)		0.622 ^{ö.d.}	0.806 ^{ö.d.}	0.964 ^{ö.d.}	0.448 ^{ö.d.}	0.482 ^{ö.d.}	0.420 ^{ö.d.}

^a BAP dozlarının yanı sıra besin ortamlarına 0.01 mg L⁻¹ IBA ve 0.1 mg L⁻¹ GA₃ ilave edilmiştir.

^b Sürgün kalınlık düzeyi (1-3) (1=>1.0mm (ince), 2=1.0mm (orta), 3=1.0mm < (kalın))

^c Harfler istatistiksel anlamda önemli farklılıkları göstermektedir.

^d *, **, *** sırasıyla $P < 0.05$, $P < 0.01$ ve $P < 0.001$ düzeyinde önemli

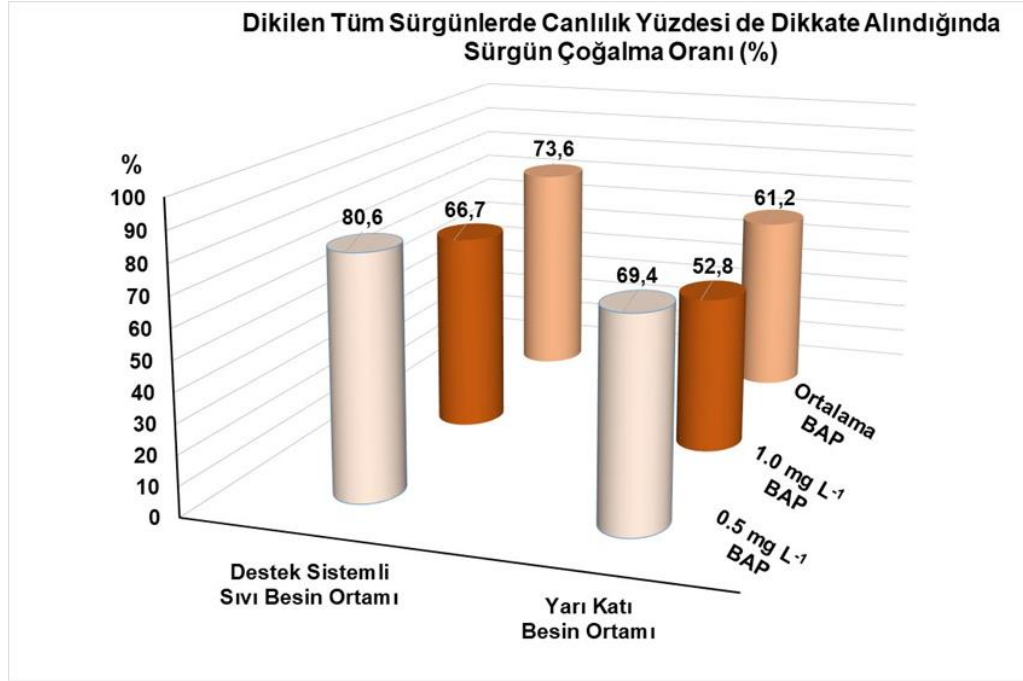
Çalışmamızda özellikle destek sistemli sıvı besin ortamında eksplantlarda kararma ve kuruma gibi nedenlerle ölümler yaşanmadan tüm mikro sürgünler canlılığını korumuştur. Yarı katı ortama göre sıvı besin ortamında besinlerin ve büyümeyi düzenleyici maddelerin dokular tarafından daha iyi alınabilmesi ve eksplantlar tarafından salgılanan fenolikler gibi inhibitörlerin sıvı ortamda seyrebilmesi potansiyel

avantajlar olarak bildirilmektedir (Metrotra ve ark., 2007; Nirmal ve ark., 2023). Sıvı kültürlerde önemli bir sorun olan camlaşmaya karşı eksplantın bir kısmının besin ortamının yüzeyinde kalmasını sağlayacak destek malzemenin kullanımı da önemlidir (Nirmal ve ark., 2023). Çalışmamızda bu amaçla filtre kâğıdından hazırlanmış destek sistemi ile sıvı kültürlerde sağlıklı sürgünler üretilmiştir (Şekil 1).

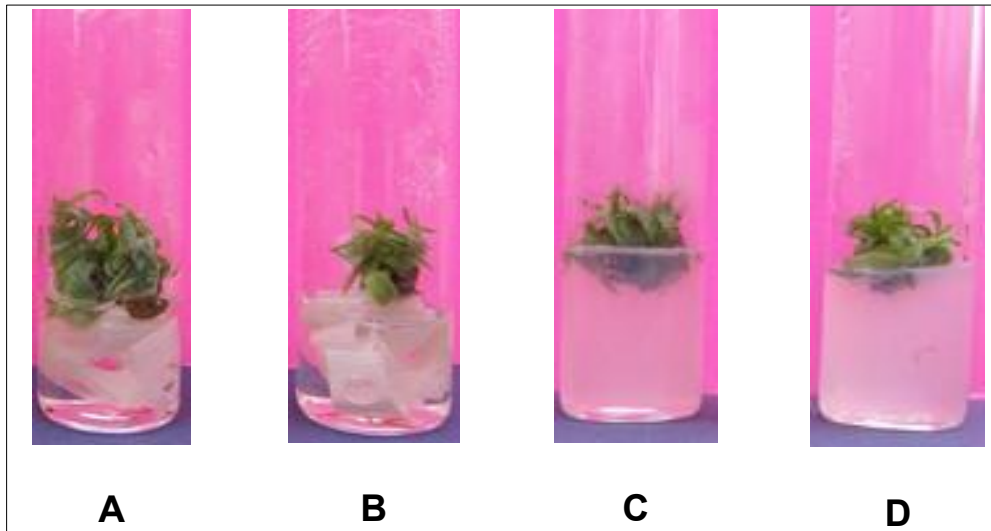
Ancak sürgünlerde çoğalma oranı destek sistemli sıvı besin ortamında, yarı katı ortama göre önemli bir farklılıkla daha düşük bulunmuştur. Bu oran BAP dozlarının ortalaması olarak yarı katı ortamda %91.7, sıvı ortamda ise %73.6 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 2). Bununla birlikte canlılık yüzdeleri de dikkate alınarak yapılan bir hesaplamada dikilen tüm eksplantlarda sürgünlerde çoğalma oranının sıvı

besin ortamında (%73.6), yarı katı ortamdaki (%61.2) %12.4 daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 2).

Çalışmamızda sürgün çoğalma oranı üzerine BAP dozlarının etkisi de istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Ortam tiplerinin ortalaması olarak 0.5 mg L⁻¹ BAP dozunda sürgün çoğalma oranı %88.5 ile 1.0 mg L⁻¹ BAP dozundan (%72.9) daha yüksek olmuştur (Çizelge 2, Şekil 3).



Şekil 2. Pixy klon anacının mikro çoğaltımında dikilen tüm sürgünlerde çoğalma oranının ortam tipleri ve BAP dozlarına göre değişimi



Şekil 3. Pixy klon anacının mikro çoğaltımında sürgün oluşturma aşamasında kültürlerin görünümü. A) 0.5 mg L⁻¹ BAP içeren destek sistemli sıvı besin ortamı, B) 1 mg L⁻¹ BAP içeren destek sistemli sıvı besin ortamı, C) 0.5 mg L⁻¹ BAP içeren yarı katı besin ortamı, D) 1 mg L⁻¹ BAP içeren yarı katı besin ortamı

Pixy anacının doku kültürü yöntemiyle çoğaltımı konusundaki araştırmalar yarı katı ortam üzerinde yoğunlaşmakta, sıvı besin ortamları ile yapılmış bir çalışma bulgusu bulunmamaktadır. Bu nedenle diğer araştırmacıların bulguları ile yapılacak karşılaştırmalar için çalışmamızda yarı katı besin ortamında elde ettiğimiz bulgular dikkate alınmıştır. Çalışmamızda yarı katı besin ortamında sürgün çoğaltım oranı BAP'ın 0.5 mg L^{-1} dozunda %100, 1.0 mg L^{-1} dozunda %82.6 olarak bulunmuştur. Bu iki değer arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık bulunmamaktadır ve ortalama sürgün oluşturma oranı %91.7'dir (Çizelge 2). Bu sonuç, Geyik ve Canlı'nın (2015) aynı anaçta yarı katı ortamda 0.5 mg L^{-1} ve 1.0 mg L^{-1} BAP dozlarında elde ettikleri sırasıyla %50.8 ve %33.3'lük sürgün oluşturma oranlarının bir hayli üzerindedir. Bulgularımız, araştırmacıların 0.25 mg L^{-1} BAP dozu ile ulaştıkları en yüksek sürgün çoğalma oranı olan %70'in de üzerindedir. Bu sonuçta, besin ortamına BAP ile birlikte ilave edilmiş oksin tipi ve dozundaki farklılıkların etkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda BAP ile birlikte besin ortamlarına 0.01 mg L^{-1} IBA ilave edilmişken Geyik ve Canlı'nın (2015) çalışmasında 0.1 mg L^{-1} NAA (naftalen asetik asit) ilavesi söz konusudur. Oksin tipi, dozu ve sitokinin/oksin düzeyinin *in vitro* sürgün çoğaltımında güçlü etkisi bulunmaktadır (Van Staden ve ark., 2008).

Çalışmamızda sürgün oluşumu sağlanmış kültürlerde eksplant başına sürgün sayısı bakımından ortam tipleri ve BAP dozları arasında istatistiksel anlamda önemli farklılıklar ortaya çıkmamıştır. Tüm uygulamaların ortalaması olarak sürgün sayısı 2.8 ± 0.3 adet/eksplant olarak belirlenmiştir. Bu bulgu, Geyik ve Canlı'nın (2015) Pixy anacında elde ettikleri en yüksek değer olan 2.8 adet sürgün sayısı ile örtüşmektedir. Pakyürek ve Hepaksoy (2020) ise çalışmalarında Pixy anacında sadece 0.88 mg L^{-1} BAP içeren yarı katı MS ortamında kültürlerin 20. gününde 0.47, 40. gününde 1.20 ve 60. gününde 1.73 adet/eksplant sürgün sayısına ulaşmış, diğer uygulamalarda ise sürgün çoğaltımı kaydedememişlerdir. Sürgün sayısı ile ilgili bulgularımız Pakyürek ve Hepaksoy'un (2020) bulgularının üzerindedir. Çalışmamızda ortalama sürgün uzunluğunda ise sadece ortam tipleri arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. BAP dozlarının ortalaması olarak $10.1 \pm 3.1 \text{ mm}$ sürgün uzunluğunun ölçüldüğü yarı katı ortam tipi, sıvı ortam tipinden (8.0 ± 2.5) daha yüksek bir değere

sahip olmuştur (Çizelge 2). Elde ettiğimiz bu sonuçlar, Pixy anacında Pakyürek ve Hepaksoy (2020) tarafından 1 mg L^{-1} veya 2 mg L^{-1} BAP ilave edilmiş yarı katı MS ortamında 12.47-16.33 mm aralığında ölçülen değerlerin gerisindedir. Çalışmamızda ortalama sürgün kalınlık düzeyi (1-3) ve yaprak sayısı bakımından uygulamalar arasında istatistiksel anlamda önemli farklılıklar ortaya çıkmamıştır. Tüm uygulamaların ortalaması olarak sürgün kalınlık düzeyi (1-3) 2.0 ± 0.1 , yaprak sayısı 8.0 ± 0.6 adet/eksplant olarak kaydedilmiştir (Çizelge 2). Yaprak sayısı ile ilgili yarı katı besin ortamında belirlediğimiz 8.8 ve 8.4 adet/sürgün sayıları, Pakyürek ve Hepaksoy (2020) tarafından 1 mg L^{-1} BAP içeren yarı katı MS ortamı üzerinde Pixy için en yüksek olarak bildirilen 8.73-13.2 adet/sürgün sayıları ile kısmen uyumludur.

Bitkilerin mikro çoğaltımında sıvı kültürler *in vitro* koşullarda düşük üretim maliyetiyle çok sayıda bitki üretmek için etkili bir yaklaşım olarak tanımlanmaktadır. Agar ile katılaştırılmış besin ortamı ile karşılaştırıldığında filtre kâğıdı gibi malzemelerin destek sistemi olarak kullanıldığı sıvı kültürlerin maliyeti 100 kat daha düşük olabilmektedir (Nirmal ve ark., 2023). Destek sistemli sıvı kültürlerde sağlıklı sürgünlerle mikro çoğaltım başarısının yüksek olduğunu belirten Kaushalya ve ark. (2023) *Gyrinops walla* ağaç türünde 1 mg L^{-1} BAP ve 0.1 mg L^{-1} IBA ile desteklenmiş yarı katı MS ortamında sürgün sayısını 6-7 adet oysa filtre kâğıdı ile desteklenmiş aynı içerikteki sıvı kültürde 11 adet olarak bildirmektedir. Çalışmada destek sistemli sıvı kültürlerde bu sayı 13'e ulaşmış olsa da camlaşma nedeniyle sıvı kültürlerde destek sistemi kullanımının önemli bir tedbir olduğunu vurgulamışlardır. Daha önce Pixy anacı ve diğer *Prunus* türlerinin mikro çoğaltımında destek sistemli sıvı besin ortamlarının araştırıldığı bilimsel bir çalışma bulunmamaktadır. Her ne kadar Pixy erik anacında henüz yapılmamış ise de biyoreaktörler ile sıvı besin ortamlarının diğer erik türlerinde araştırıldığı ve yarı katı ortamlara göre başarılı bulguların alındığı görülmektedir. Bu kapsamda iki erik çeşidinin (*Prunus domestica* L.) RITA© geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak sıvı ortamda mikro çoğaltımı konusunda araştırma yapan Gago ve ark. (2022), 0.5 mg L^{-1} BAP ve 0.5 mg L^{-1} IBA ilave edilmiş MS ortamında sürgün sayısını 7.7 ve 8.7 adet olarak saptamışlardır. Yarı katı ortam üzerinde bu değer 5.3 adet olduğu bildirilen çalışmada sürgün uzunluğunun da sıvı ortamda (21.5-23.8 mm),

yarı katı ortamdan (15.3 mm) daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Cantabella ve ark. (2022) ve Dolcet-Sanjuan ve ark. (2024) da çalışmalarında bazı erik ve erik hibriti klon anaçların (Rootpac® 20, Rootpac® ve Adara) mikroçoğaltımında 1 mg L⁻¹ BAP ilave edilmiş MS ortamını yarı katı veya GreenTray® geçici daldırma sistemli biyoreaktörde sıvı besin ortamı olarak kullanmışlar, GreenTray® geçici daldırma sistemli biyoreaktörün diğer biyoreaktörlere göre mikro çoğaltım sürecindeki maliyetleri azalttığını ve gelişme üzerine etkili olarak anaçları yüksek çoğalma oranlarına ulaştırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda farklı tipteki geçici daldırma sistemli bioreaktörlerde sıvı besin ortamlarında elde edilmiş bulgular, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulardan genellikle daha yüksektir. Geçici daldırma biyoreaktörleri veya geçici daldırma sistemleri, eksplantların sıvı ortama periyodik olarak daldırılması, ardından besin ortamının boşaltılması ve steril koşullarda havalandırılması için tasarlanmıştır. Böylece bu sistemler ile dokuların besin ortamıyla temasında ideal koşullar oluşturulmakta ve havalandırma, sıcaklık, pH ve aydınlatma gibi kültür koşulları en uygun düzeylerde korunarak sürgünlerin büyüme ve gelişmesi başarıyla sağlanmaktadır (Murthy ve ark. 2023). İlerideki çalışmalarda Pixy anacının mikro çoğaltımında sürgün çoğaltım aşamasında sıvı besin ortamının etkinliğinin geçici daldırma biyoreaktörleri ile araştırılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

Sonuç

Bu çalışmada, Pixy anacının mikro çoğaltımında sürgün çoğalma aşamasında filtre kâğıdı destek sistemli sıvı besin ortamında eksplantların tamamı canlılığını korumuştur. Böylece sürgünlerde canlılık oranı yarı katı besin ortamına göre %33.3 daha yüksek belirlenmiştir. Her ne kadar canlı kalan eksplantlarda sürgün çoğalma oranı yarı katı besin ortamında, sıvı ortama göre %18.1 daha yüksek bulunmuş ise de dikilen tüm eksplantlar dikkate alındığında sürgün oluşturma oranının sıvı ortamda, yarı katı ortama göre %12.4 daha yüksek olduğu hesaplanmıştır. Her iki ortam tipinde de sürgünler genellikle benzer sayıda ve kalitede üretilmiştir. Modifiye edilmiş MS temel besin ortamına 0.01 mg L⁻¹ IBA ile birlikte ilave edilen BAP'ın 0.5 mg L⁻¹ dozu, 1.0 mg L⁻¹ dozuna göre özellikle sürgün çoğalma oranını artırmıştır. Pixy anacının mikro çoğaltımı konusunda planlanacak çalışmalarda sürgün oluşturma oranını ve eksplant başına sürgün sayısını

artıracak farklı sıvı kültür sistemlerinin kullanım potansiyelinin araştırılması önerilmiştir.

Çıkar çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Yazarların katkı beyanı

AÖ: Denemelerin kurulması, yürütülmesi, verilerin toplanması ve makalenin yazımına katkı.

HD: Araştırmanın planlanması, denemelerin kurulması, verilerin istatistiği ve makalenin yazımı.

GP: Denemelerin kurulması ve makalenin yazımına katkı.

Kaynaklar

- Arıcı, S. E. (2008). Bazı sert çekirdekli meyve anaçlarının doku kültürü ile çoğaltılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 3(1), 19-23.
- Beakbane, A. B. (1977). Plum rootstock-Pixy variety. U.S. Patent No. Plant 4,061.
- Cantabella, D., Mendoza, C.R., Teixidó, N., Vilaró, F., Torres, R., & Dolcet-Sanjuan, R. (2022). GreenTray® TIS bioreactor as an effective *in vitro* culture system for the micropropagation of Prunus spp. rootstocks and analysis of the plant-PGPMs interactions, *Scientia Horticulturae*, 291, 110622. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110622>
- Dodds, J. H. & Roberts, L. W. (1993). *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press. New York, 231 p.
- Dolcet-Sanjuan, R., Casanovas, M., Franquesa, S., Alsina, E., Carrasco-Cuello, F., Torres, E., Rufat, J., Solsona, C., & Teixido, N. (2024). GreenTray®, a TIS bioreactor for plant micropropagation and abiotic or biotic stress bioassays. *Applied Sciences*, 14(10), 4051. <https://doi.org/10.3390/app14104051>
- Dolgun, O., Tekintas, F. E., & Ertan, E. (2008). A histological investigation on graft formation of some nectarine cultivars grafted on Pixy rootstock. *World Journal of Agricultural Sciences* 4(5), 565-568.
- Donadio, L. C., Lederman, I. E., Roberto, S. R., & Stucchi, E. S. (2019). Dwarfing-canopy and rootstock cultivars for fruit trees. *Revista Brasileira De Fruticultura*, 41(3), 1-12. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019997>
- Gago, D., Sánchez, C., Aldrey, A., Christie, C. B., Bernal, M. Á., & Vidal, N. (2022). Micropropagation of plum (*Prunus domestica* L.) in bioreactors using photomixotrophic and photoautotrophic

- conditions. *Horticulturae*, 8(4), 286. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8040286>
- Geyik, D., & Canlı, F. A. (2015). Micropropagation of 'Pixy' (*Prunus institia* L.) rootstock. *Plant Molecular Biology & Biotechnology*, 5, 1-6.
- Dutta Gupta, S., & Prasad, V. S. S. (2006). Matrix-supported liquid culture systems for efficient micropropagation of floricultural plants. J. A. Teixeira da Silva (Ed.), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues* içinde (487-495. ss.). London: Global Science Books, Ltd.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, Jr. F. T., & Geneve, R. L. (2011). *Plant Propagation: Principles and Practices* (8th Edition). Prentice-Hall, Boston, 915 p.
- Jones, O. P., & Hopgood, M. E. (1979). The successful propagation *in vitro* of two rootstocks of *Prunus*: the plum rootstock Pixy (*P. insititia*) and the cherry rootstock F12/1 (*P. avium*). *Journal of Horticultural Science*, 54(1), 63-66. <https://doi.org/10.1080/00221589.1979.11514849>
- Kaushalya, D. B. R., Eeswara, J. P., & Jayasinghe, L. (2023). Development of liquid culture system for rapid multiplication of *Gyrinops walla*. *Tropical Agricultural Research*, 34(1), 43-51. <http://doi.org/10.4038/tar.v34i1.8603>
- Lal, M, Jamwal, M, Sood Y, Bakshi, P, Sharma, N, Sharma, S, & Kumar, S. (2023). Micropropagation of fruit crops: A review. *Plant Science Today*, 10(1), 108-117. <https://doi.org/10.14719/pst.1891>
- Lang, G. A. (2024). Guidelines for the choice of stone fruit rootstocks. *Italus Hortus*, 31, 18-26. <https://doi.org/10.26353/j.itahort/2024.1.1826>
- Mehta, M., Ram, R., & Bhattacharya, A. (2014). A simple and cost effective liquid culture system fort he micropropagation of two comeercially important apple rootstocks. *Indian Journal of Exprimental Biology*, 52, 748-754. <https://doi.org/10.4314/AJB.V6113.57591>
- Mehrotra, S., Goel, M. K., Kukreja, A. K., & Mishra, B. N. (2007). Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*, 6, 1484-1492.
- Murthy, H. N., Joseph, K. S., Paek, K. Y., & Park, S. Y. (2023). Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1159588. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1159588>
- Nirmal, D., Teraiya, S., & Joshi, P. (2023). Liquid culture system: an efficient approach for sustainable micropropagation. *Current Agriculture Research Journal*, 11(1), 28-42. <https://doi.org/10.12944/CARJ.11.1.03>
- Nowakowska, K., Pińkowska, A., Siedlecka, E., & Pacholczak, A. (2022). The effect of cytokinins on shoot proliferation, biochemical changes and genetic stability of rhododendron 'Kazimierz Odnowiciel' in the *in vitro* cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 149, 675-684. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02206-z>
- Pakyürek, M., & Hepaksoy, S. (2020). A research on micropropagation of Pixy rootstock. *Euroasia Journal of Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences*, 7(8), 146-159. <https://doi.org/10.38065/euroasiaorg.31>
- Preil W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. A. K. Hvoslef-Eide, & W. Preil (Ed.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* içinde (1-18. ss.). Dordrecht, The Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_1
- Shabani, Z., Moghadam, E. G., Abedi, B., & Tehranifar, A. (2015). The effect of plant growth regulators and their concentration *in vitro* on mass propagation of Myrobalan 29C rootstock. *Journal of Horticulture and Forestry* 7(3), 73-83.
- Thakur, M., Sharma, V., & Luharch, R. (2021). Propagation of plum (*Prunus salicina* L.) cultivar Frontier *in vitro* through control of shoot tip necrosis (STN) and validation of genetic integrity using ISSR markers. *Plant Physiology Reports* 26, 238-246. <https://doi.org/10.1007/s40502-021-00580-6>
- Uğur, R., Paydaş, S., & Saridas, M. A. (2023). Rootstock breeding and rootstock-scion interaction in *Prunus* species. *Journal of Erciyes Agriculture and Animal Science*, 6(2), 7-10.
- Van Staden, J., Zazimalova E., & George, E. F. (2008). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. E. F. George, M. A. Hall, & G. J. De Clark (Ed.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd*

Edition Volume 1. The Background içinde (205-226 ss.).
Dordrecht, The Netherlands: Springer.

<https://doi.org/10.1080/00221589.1980.11514954>

Westwood, A. D. (1980). Pixy, a new dwarfing rootstock for
plums, *Prunus domestica* L. *Journal of Horticultural
Science*, 55(4), 425-431.

Wolella, E. K. (2017). Surface sterilization and in vitro
propagation of *Prunus domestica* L. cv. Stanley using
axillary buds as explants. *Journal of Biotech Research*
8, 18-26.