# GF 677 Anacının *In vitro* Koşullarda Kitlesel Üretimi

**Murat Güney, Songül Çömlekçioğlu, Sina Kefeyati, Ebru Kafkas, Salih Kafkas**
Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 01330, Balcalı, Adana
**e-posta:** muratguney.dna@gmail.com

**Özet**

Bu çalışmada badem x şeftali melez klon anacı olan GF-677'nin sürgün ucu ile *in vitro* koşullarda çoğaltılması hedeflenmiştir. Alınan sürgün uçlarının farklı bitki büyümeyi düzenleyicilerin sürgün oluşturma ve köklenme oranları üzerine etkileri incelenmiştir. MS temel besin ortamına ek olarak FeEDTA'nın kullanıldığı besin ortamlarında BAP (1, 1.5 ve 2 mg/l), IBA (0.2 mg/l), ve $GA_3$ (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 ve 0.5 mg/l)'in farklı konsantrasyonlarını içeren ortamlar kullanılmıştır. Söz konusu ortamların eksplant başına sürgün ve kardeş sayısı ile vitrifikasyon oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada farklı IBA (0, 0.25, 0.5 ve 1 mg/l) ve NAA (0, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 mg/l) kombinasyonlarının köklenme üzerine etkisi araştırılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** GF-677, mikroçoğaltma, doku kültürü

***In vitro* Mass Propagation of GF 677 Rootstock**

**Abstract**

In this study, it was aimed to propagate *in vitro* condition of GF-677 almond x peach hybrid clon rootstocks by means of shoot-tip culture. The received shoot-tips of different growth plant regulators and its effects on the shoot-tip formation and its rooting rates were investigated. In addition to MS basal nutrient medium FeEDTA was used as nutrient medium different, the containing concentrations of BAP (1, 1.5 and 2 mg/l), IBA (0.2 mg/l) and $GA_3$ (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, and 0.5, mg/l) were used in the maintanace medium. The effects of the various plant growth regulator combinations on vitrification, multiplication, the number of shoots per explant and rooting were compared. In addition, the effects of various IBA (0, 0.25, 0.5 and 1 mg/l) and NAA (0, 0.125, 0.25, 0.5 and 1 mg/l) concentrations on rooting were also studied.

**Keywords:** GF-677, micropropagation, tissue culture

## Giriş

Badem x şeftali melez klon anacı olan GF-677 şeftali ve nektarin fidanların üretiminde kullanılmaktadır. GF-677 anacı Fransa'da INRA Araştırma Enstitüsünde geliştirilmiştir. Vegetatif yolla çoğalan, kuraklığa toleransı yüksek, kireçli topraklara uyum sağlayan, *Phytopthora*'ya ve kök kanserine dayanaklı bir anaçtır (Yapıcı, 1992). Ülkemizde Marmara, Ege, Akdeniz ve GAP bölgesi için önerilebilen bir anaçtır (Küden, 2000). Gençlik kısırlığı döneminin daha kısa sürmesinden dolayı çöğür anaçlarına göre klonal anaçlar daha erken dönemde meyveye yatmaktadır. Bu nedenlerden dolayı klonal anaçlar genaratif olarak çoğaltılanlara göre daha avantajlıdır (Arıcı, 2008).

Sert çekirdekli meyve anaçlarının *in vitro* klonal çoğaltımında, besin ortamlarının mineral madde konsantrasyonlarındaki değişime bağlı olarak anaçların kök uzunluğu ve köklenme yüzdelerinde farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Nitekim, GF-677 anacının mineral madde konsantrasyonu düşük olan MS ortamında WPM ortamına göre daha iyi sonuç verdiğ bildirimiştir (Dimassi ve Theriou, 1995).

Klonal anaçların *in vitro* koşullar da kitlesel üretiminde, mineral madde konsantrasyonun yanı sıra bitki büyümeyi düzenleyicilerin konsantrasyonlarındaki farklılıklar da anaçların gelişimini, sürgün oluşturmasını ve sürgünlerin boyuna uzamasını etkilemektedir. Silveira ve ark. (2001), 4 farklı BAP konsantasyonu (0.1, 0.3, 0.5 ve 0.7 mg/l) ve 2 farklı MS tuzlarını içeren ortamlar ile GF-677 (*Peache amnedier*), Mr.S 2/5, G x N22, Marianna ve Myrobalan (*Prunus cerasifera*) erik anaçlarında *in vitro* çoğaltımı için araştırmalar yapmışlardır. Araştırıcılar, sadece GF-677 anacında farklı kullandıkları ortam ve horman konsantrasyonlarının iyi sonuç vermediğini rapor etmişlerdir. *In vitro* koşullarda besi ortamına Fe-EDDHA ilavesi GF-677 anacında köklendirmeyi teşvik ederken Fe-EDTA ilave edilen ortamlarda ise köklenme olmadığı gözlemlenmiştir (Molassiotis ve ark., 2003).

Bu çalışmada badem x şeftali melez klon anacı olan GF-677'nin sürgün ucu ile *in vitro* koşullarda kitlesel üretimi amaçlanmıştır. Sürgün ucu kültürü yöntemi ile üretimde farklı bitki büyümeyi düzenleyicilerin (BAP, IBA, $GA_3$ NAA) farklı konsantrasyon ve

kombinasyonlarının sürgün oluşturma ve köklenme oranları üzerine etkileri incelenmiştir.

**Materyal ve Yöntem**

Araştırmada *in vitro* koşullarda klonal çoğaltımı yapılan GF 677 anacına ait taze sürgünler laboratuvara getirilmiş, yüzey dezenfeksiyonunu sağlamak amacıyla sürgünler önce 10-15 dakika su altında yıkanmış, %70'lik etanol içerisinde 2 dakika bekletilmiş, daha sonra eksplantlar 1-2 damla Tween 20 içeren %15'lik sodyum hipoklorid çözeltisi içerisinde 10 dakika süre ile çalkalandıktan sonra steril saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Araştırmada GF-677 için; sürgün geliştirme, çoğaltma ve köklendirme aşamalarında MS (Murashige ve Skoog, 1962) makro ve mikro elementleri, vitaminler ve FeEDTA kompozisyonu kullanılmıştır. Sterilize edilen sürgünlerden bir bistüri yardımı ile bitki büyüme konisi ve 2-3 yaprak taslağı kalacak şekilde yaklaşık 0.5-1.0 mm büyüklüğündeki sürgün uçları alınarak, farklı kombinasyonlardaki BAP (1, 1.5 ve 2 mg/l), IBA (0.2 mg/l), ve GA3 (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 ve 0.5 mg/l) içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. MS ortamlarının tüm bileşenleri ve bitki büyüme düzenleyiciler eklendikten sonra, besin ortamının pH'sı otoklav ile steril edilmeden önce 5.8'e ayarlanmış ve otoklavda 121ºC'de 20 dakika steril edilmiştir. Çoğaltma ve köklendirme aşamalarında magenta kutucukları kullanılmıştır. Eksplantlar steril filtre kağıt üzerinde kurutulduktan sonra MS ortamı içeren magenta kutucukları içerisinde kültüre alınmıştır. Sürgün geliştirme ortamında gelişen ve çoğalan sürgünler 4 hafta da bir alt kültürlere alınmıştır. Köklendirme ortamları denemeleri yapılarak köklendirme ortamına alındıktan 2 hafta sonra köklenen bitkiciklerin dış ortama adaptasyonlarını sağlamak amacıyla, magentaların kapakları kademeli olarak açılmış daha sonra tamamen çıkarılmış ve bitkiciklerde kök sayımları yapılmıştır.

Doku kültürlerinin tüm aşamalarında besin ortamlarında kültüre alınan sürgün uçları sıcaklığı 25±1$^{o}$C, gün uzunluğu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık, ışık intensitesi 3000 luks olarak ayarlanmış kültür odalarında gelişmeye bırakılmıştır. Araştırmadan elde edilen verilerin Jump istatistiksel analiz programı kullanılarak uygulamalar arasındaki farklılıklar belirlenmiştir.

**Bulgular ve Tartışma**

Bu çalışmada, GF-677 klon anacının *in vitro* koşullarda farklı BAP (1, 1.5 ve 2 mg/l), IBA (0.2 mg/l) ve $GA_3$ (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 ve 0.5 mg/l) kombinasyonlarını içeren ortamlardaki bitki başına ortalama kardeş sayısı Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge 1 incelendiğinde BAP 1 mg/l (20.89) konsatrasyonu 1.5 mg/l (13.11) ve 2 mg/l (12.33) konsatrasyonlarından bitki başına ortalama kardeş sayısı en yüksek olduğu görülmektedir. Buradan BAP'ın 1mg/l konsantrasyonu bitki başına ortalama kardeş oluşumunda en iyi sonuç verdiği saptanmıştır. $GA_3$'ün farklı dozları karşılaştırıldığında ortalama bitki başına kardeş bakımından en yüksek değerlerin 0.1 mg/l $GA_3$ uygulamasından elde edildiği saptanmıştır. BAP'ın 1mg/l ve $GA_3$'ün 0.25 mg/l konsantrasyonlarının kullanıldığı kombinasyonlarından bitki başına ortalama en yüksek kardeş sayısı elde edilirken, bu özellik bakımından da en düşük değerler 0.025 mg/l $GA_3$ ve 2 mg/l BAP kombinasyonlarında elde edilmiştir.

GF-677 klon anacının *in vitro* koşullarda farklı BAP (1, 1.5 ve 2 mg/l), IBA (0.2 mg/l), ve $GA_3$ (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 ve 0.5 mg/l) kombinasyonlarını içeren ortamlardaki bitki başına ortalama sürgün uzunluğu Çizelge 2'te verilmiştir. Çizelge 2 incelendiğinde BAP 2 mg/l (1.25) konsantrasyonu 1 mg/l (1.17) ve 1.5 mg/l (1.20) konsantrasyonlarında bitki başına ortalama sürgün uzunluğunun en yüksek olduğu görülmektedir. BAP'ın 1.5 mg/l konsantrasyonu bitki başına ortalama sürgün uzunluğu oluşumunda en iyi sonuç verdiği saptanmıştır. $GA_3$'ün farklı dozları karşılaştırıldığında ortalama bitki başına sürgün uzunluğu bakımından en yüksek değerler 0 mg/l $GA_3$ dozundan elde edilmiştir. BAP'ın 1.5 mg/l ve $GA_3$'ün 0 mg/l konsantrasyonlarının kullanıldığı kombinasyonlarından bitki başına ortalama en yüksek sürgün uzunluğu elde edilirken, bu özellik bakımından da en düşük değerler 0.025 mg/l $GA_3$ ve 1 mg/l BAP kombinasyonlarında elde edilmiştir. GF-677 klon anacının *in vitro* koşullarda farklı BAP (1, 1.5 ve 2 mg/l), IBA (0.2 mg/l), ve $GA_3$ (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 ve 0.5 mg/l) kombinasyonlarını içeren ortamlardaki vitrifikasyon değerleri Çizelge 3'te verilmiştir. Çizelge 3 incelendiğinde BAP 1 mg/l (2.50) konsatrasyonu 1.5 mg/l (2.00) ve 2 mg/l (2.17) konsatrasyonlarına göre virifikasyon değerinin

en yüksek olduğu görülmektedir. BAP'ın 1 mg/l ve $GA_3$'ün 0.1 mg/l ile BAP'ın 1.5 mg/l ve $GA_3$'ün 0.05 mg/l konsantrasyonlarının kullanıldığı kombinasyonlarında en yüksek vitrifikasyon (3.67) elde edilmiştir. $GA_3$'ün farklı dozları karşılaştırıldığında vitrifikasyon bakımından en yüksek değer 0.25 mg/l (2.78) uygulamasından elde edilmiştir.

Hu ve Wang, (1983); Ahmad ve ark., (2003) araştırmalarında *in vitro* sürgün ucu ile yan sürgünlerin çoğaltılmasında, BAP konsantrasyonunun yüksek olmasının sürgünlerde nekrozlar oluşturduğunu, kallus oluşumunu artırdığını ve yan sürgün artışını azalttığını rapor etmişlerdir. Araştırıcıların aksine, yaptığımız bu çalışmada BAP'ın 1.5 mg/l (1.83) konsantrasyonunun kullanıldığı besin ortamında GF-677 anacının en fazla sürgün oluşturduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 2). Yapılan bir çalışmada 1 mg/l BAP içeren ortamda GF-677 anacında en fazla sürgün oluşumu elde edilmiştir (Arıcı, 2008). Bu ve benzeri sonuçlar kullanılan besin ortamı ile büyümeyi düzenleyicilerinin etkisinin değişebileceğini göstermektedir (McCown ve Sellmer, 1987). Silveira, (2000) *in vitro* koşullarda yaptığı köklenme çalışmaları sonucunda Prunus anaçlarının *in vitro* çoğaltımı için NAA'in uygun olmadığını rapor etmiştir. Molassiotis ve ark., (2003); Antonopoulou ve ark., (2007) besin ortamına Fe-EDDHA ilavesinin GF-677 anacında köklendirmeyi teşvik ettiğini, Fe-EDTA ilave edilen ortamlarda ise köklenme olmadığını bildirmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada GF-677'nin köklendirme aşamasında besin ortamlarına ek olarak farklı IBA, NAA kombinasyonları ve FeEDTA ilavesinin etkileri incelenmiştir. Çalışmalarımız sonucunda vitrifikasyona bağlı olarak bazı ortamlarda köklenme oluşmaz iken, GF-677 anacında en fazla köklenme oluşumu 1 mg/l IBA, 0.5 mg/l NAA ve 10 ml FeEDTA içeren ½ MS ortamında elde edilmiştir. FeEDTA'nın köklendirmede olumlu etkisini destekleyen çalışmamıza benzer bir çalışmada GF-677 anacında en iyi köklenme sonuçları Fe-EDTA ilaveli 3 mg/l IBA içeren ½ MS ortamında elde edilmiştir (Ahmad ve ark. 2003).

## Sonuç

Bu araştırmada, BAP'ın 1mg/l ve $GA_3$'ün 0.25 mg/l konsantrasyonlarının kullanıldığı kombinasyonlarda bitki başına en yüksek ortalama kardeş sayısı elde eldilirken, BAP'ın 1.5 mg/l ve $GA_3$'ün 0 mg/l konsantrasyonlarının kullanıldığı kombinasyonlarda bitki başına en yüksek ortalama sürgün uzunluğu ve BAP'ın 1 mg/l ve GA3'in 0.10 mg/l ile BAP'ın 1.5 mg/l ve GA3'in 0.050 mg/l konsantrasyonlarının kullanıldığı kombinasyonlarda ise en yüksek vitrifikasyon elde edilmiştir. Çalışmalarımız sonucunda GF-677 anacında en iyi köklenme ise; 1 mg/l IBA, 0.5 mg/l NAA ve 10 ml FeEDTA içeren ½ MS ortamından elde edilmiştir.

## Teşekkür

İstatistiksel analiz çalışmalarında değerli katkılar da bulunan Sayın Araş. Gör. Şenay Karabıyık'a teşekkürlerimizi sunarız.

## Kaynaklar

Ahmad, T., Rahman, H., Ahmed, CH. M.S., Laghari, M.H., 2003. Effect of culture media and growth regulators on micropropagation of peach rootstock GF-677. Pakistan Journal of Botany 35(3): 331- 338.

Antonopoulou, C., Dimassi, K., Therious, I., Chatzissavvidis, C., Papadakis, I., 2007. The effect of FE-EDDHA and of ascorbic acid on *in vitro* rooting of the peach rootstock GF-677 explants. Acta Physiol. Plant, 29: 559-561.

Arıcı, Ş.E., 2008. Bazı sert çekirdekli meyve anaçlarının doku kültürü ile çogaltılması. Süleyman Demirel Üniv. Zir. Fak. Dergisi 3(1):19-23.

Dimassi-Theriou, K., 1995. In vitro rooting of rootstock GF-677 (*P. amygdalus* x *P. persica*) as influenced by mineral concentration of the nutrient medium and type of culture-tube sealing material. J. Hort. Sci., 70(1):105-108.

Hu, Y.C., Wang, P.J., 1983. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamado (Eds.) Hand Book of Plant Cell Culture, Vol. I. Macmillan Publishing Company, NY., 177-227.

Küden, A.B., 2000. Şeftali Yetiştiriciliği. Tübitak-Tarp Yayınları, 20 s.

Murashige, T., Skoog, F.A., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Mccown, B.H., Sellmer, J.C., 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: Bonga, J.M., Durzan, D.J., Martinus (Eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry. Nijhoff Pub., Dordrecth, Netherlands. 4-16.

Molassiotis, A.N. Dimassi, K., Diamantidis, G., Therios, I., 2003. Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*P. amygdalus* x *P. persica*) explants in vitro. Biologia Plantarum 47(1):141-144.

Silveira, C.A.P., 2000. In vitro multiplication of prunus rootstock. Adviser: Jose Carlos Fachinello.

Silveira, C.A.P., Fachinello, J.C., Fortes, G.R. Del., 2001. In vitro multiplication of prunus rootstocks in different BAP concentrations in two culture media. Rev. Bras. Frutic. 23(3): 488-492.

Yapıcı, M., 1992. Meyve fidanı üretim tekniği (Kışın Yaprağını Döken Türler). T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Ankara. 119s.

**Şekil 1.** *In vitro* koşullarda kitlesel çoğaltımı yapılan GF-677 klonal anaçlarından bir görünüm

**Çizelge 1.** GF-677 anacının farklı BAP ve $GA_3$ kombinasyonlarinda explant başına ortalama kardeş sayısı

| **$GA_3$ Konsantrasyonu (mg/l)** | BAP Konsantrasyonu | | | $GA_3$ Ortalama |
|---|---|---|---|---|
| | 1.0 (mg/l) | 1.5 (mg/l) | 2.0 (mg/l) | |
| **0** | 21.33 | 6.33 | 15.67 | 14.44 |
| **0.025** | 17.33 | 22 | 2.67 | 14 |
| **0.05** | 18 | 8 | 15.33 | 13.78 |
| **0.1** | 24.33 | 10 | 21.33 | 18.56 |
| **0.25** | 30.67 | 12 | 10.67 | 17.78 |
| **0.5** | 13.67 | 15.67 | 13 | 14.11 |
| **BAP Ortalama** | 20.89A | 13.11 B | 12.33B | |
| $^{LSD}$ BAP | 5.616** | | | |
| $^{LSD}$ $GA_3$ | ÖD | | | |
| $^{LSD}$ BAP * $GA_3$ | ÖD | | | |

**Çizelge 2.** GF-677 anacının farklı BAP ve $GA_3$ kombinasyonlarının sürgün uzunluğuna etkisi (cm)

| **$GA_3$ Konsantrasyonu (mg/l)** | BAP Konsantrasyonu | | | $GA_3$ Ortalama |
|---|---|---|---|---|
| | 1.0 (mg/l) | 1.5 (mg/l) | 2.0 (mg/l) | |
| **0** | 1.17 | 1.83 | 1.5 | 1.5 |
| **0.025** | 0.83 | 1.17 | 1.17 | 1.06 |
| **0.05** | 1 | 1 | 1.17 | 1.06 |
| **0.1** | 1.33 | 1 | 1.5 | 1.28 |
| **0.25** | 1.5 | 1.17 | 1.17 | 1.28 |
| **0.5** | 1.17 | 1 | 1 | 1.06 |
| **BAP Ortalama** | 1.17 | 1.2 | 1.25 | |
| $^{LSD}$ BAP | ÖD | | | |
| $^{LSD}$ $GA_3$ | ÖD | | | |
| $^{LSD}$ BAP * $GA_3$ | ÖD | | | |

**Çizelge 3.** GF-677 anacının farklı BAP ve $GA_3$ kombinasyonlarında vitrifikasyon durumları

| **$GA_3$ Konsantrasyonu (mg/l)** | BAP Konsantrasyonu | | | $GA_3$ Ortalama |
|---|---|---|---|---|
| | 1.0 (mg/l) | 1.5 (mg/l) | 2.0 (mg/l) | |
| **0** | 2.33 | 1 | 2.67 | 2 |
| **0.025** | 1.67 | 1 | 2.33 | 1.67 |
| **0.05** | 2.67 | 3.67 | 1.67 | 2.67 |
| **0.1** | 3.67 | 1 | 1 | 1.89 |
| **0.25** | 2.67 | 2.67 | 3 | 2.78 |
| **0.5** | 2 | 2.67 | 2.33 | 2.33 |
| **BAP Ortalama** | 2.5 | 2 | 2.17 | |
| $^{LSD}$ BAP | ÖD | | | |
| $^{LSD}$ $GA_3$ | ÖD | | | |
| $^{LSD}$ BAP * $GA_3$ | ÖD | | | |