



Kestane mikroçoğaltımında farklı besi ortamlarının eksplant beslenmesine etkisi

Burak AKYÜZ¹, İbrahim Halil HATİPOĞLU^{1*}, Salih DEMİRKAYA², Abdurrahman AY²

¹Bahçe Bitkileri Bölümü, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun

²Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun

*Sorumlu Yazar: ibrahimhhatipoglu@gmail.com

Burak AKYÜZ: <https://orcid.org/0000-0001-7356-776X>

İbrahim Halil HATİPOĞLU: <https://orcid.org/0000-0002-7236-4976>

Salih DEMİRKAYA: <https://orcid.org/0000-0002-7374-0160>

Abdurrahman AY: <https://orcid.org/0000-0001-5450-4106>

ESER BİLGİSİ / ARTICLE INFO

Araştırma Makalesi / Research Article

Geliş 21 Ekim 2025 / Received 21 October 2025

Düzeltilmelerin gelişi 13 Ocak 2026 / Received in revised form 13 January 2026

Kabul 27 Ocak 2026 / Accepted 27 January 2026

Yayınlanma 28 Mart 2026 / Published online 28 March 2026

ÖZET: Kestane (*Castanea* spp.) üretiminde karşılaşılan biyotik ve abiyotik stresler, özellikle kestane gal arısı (*Dryocosmus kuriphilus*) ve kestane kanseri gibi sorunlar, dayanıklı çeşitlerin hızlı çoğaltımını zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmada tescilli ve gal arısına dayanıklı ‘Akyüz’ çeşidinin *in vitro* koşullarda farklı besi ortamlarına verdiği beslenme yanıtları değerlendirilmiştir. Eksplant materyali radisil aşısı ile çoğaltılmış ana bitkilerden elde edilen nodal segmentlerden hazırlanmış, kültürler MS, WPM, GD ve DKW bazal ortamlarında yetiştirilmiştir. Yaprak ve gövde aksı dokuları ayrılarak makro (N, P, Ca, Mg) ve mikro element (Fe, Mn, Zn, Cu) içerikleri analiz edilmiştir. Veriler, yaprakta MS’in en yüksek N’i (%3.25), GD’nin en yüksek P’yi (2824 mg/kg) sağladığını; gövdede ise WPM’nin Ca (1886.9 mg/kg), Mg (2577.9 mg/kg), P (5718 mg/kg) ve tüm mikro elementlerde en yüksek birikimi göstererek ortamlar arasında açık şekilde üstün olduğunu ortaya koymaktadır. Sonuçlar, yaprak dokusunda MS ortamının daha yüksek N ve Mn birikimine yol açtığını, DKW ortamında Fe’nin öne çıktığını ve Zn–Cu antagonizmasının belirginleştiğini göstermiştir. Gövde dokusunda ise WPM ortamı özellikle Ca, Mg ve P ile birlikte Mn, Zn, Cu ve Fe birikimini artırmış; düşük toplam tuz konsantrasyonu ve dengeli iyonik yapısıyla besin taşınımını kolaylaştırdığı anlaşılmıştır. PCA analizi de WPM ortamının Ca–Mg–P vektörleriyle, MS ortamının ise N–Mn ile ilişkilendiğini doğrulamıştır. Bu bulgular, besi ortamı kompozisyonunun eksplant dokularında mineral dağılımını belirgin biçimde yönlendirdiğini göstermektedir. WPM ortamı özellikle gövde dokusunda dengeli beslenmeyi desteklemesiyle öne çıkarırken, MS ortamı yaprakta azot metabolizmasını teşvik etmiştir. Çalışma, kestane mikroçoğaltımında ortam seçiminin besin elementleri açısından kritik olduğunu ortaya koymakta ve dokuya özgü mineral dağılımının değerlendirilmesinin ileride yapılacak optimizasyon çalışmalarına ışık tutabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Castanea* spp., besin birikimi, *in vitro*, PCA, doku kültürü

Culture media effects on mineral nutrition of chestnut explants in micropropagation

ABSTRACT: In the context of chestnut (*Castanea* spp.) production, the challenges posed by biotic and abiotic stresses, most notably those resulting from chestnut gall wasp (*Dryocosmus kuriphilus*) and chestnut blight, underscore the imperative for the expeditious propagation of cultivars that exhibit resistance to these stresses. In this study, the nutritional responses of the registered and gall-wasp-resistant cultivar 'Akyüz' were evaluated under *in vitro* conditions using different culture media. The explants were prepared from nodal segments obtained from stock plants propagated via radisil grafting, and cultures were established on MS, WPM, GD, and DKW basal media. Tissues from the leaf and stem-axis were analysed separately for macro- (N, P, Ca, Mg) and micro-element (Fe, Mn, Zn, Cu) contents. The data demonstrate that MS provides the highest leaf nitrogen (3.25%), GD yields the highest leaf phosphorus (2824 mg/kg), while WPM clearly outperforms all media in stems by producing the highest Ca (1886.9 mg/kg), Mg (2577.9 mg/kg), P (5718 mg/kg), and all micro-element accumulations. The results demonstrated that MS medium resulted in increased N and Mn accumulation in leaf tissues, while Fe was predominant in DKW medium, accompanied by a pronounced Zn–Cu antagonism. In stem tissues, WPM medium enhanced the accumulation of Ca, Mg, P, Mn, Zn, Cu, and Fe indicating that its low total salt concentration and balanced ionic composition facilitated nutrient translocation. PCA analysis confirmed that WPM medium was associated with Ca–Mg–P vectors, whereas MS medium correlated with N–Mn. The findings demonstrate that the composition of the culture medium exerts a significant influence on the mineral distribution within explant tissues. It was demonstrated that WPM medium supported balanced nutrition, particularly in stem tissues, while MS medium promoted nitrogen metabolism in leaves. The study as a whole indicates that medium selection is critical for ensuring nutrient balance in chestnut rapid micropropagation, and that tissue-specific assessment of mineral distribution can provide valuable insights for future studies to optimise the process.

Keywords: *Castanea* spp., nutrient accumulation, *in vitro*, PCA, tissue culture

GİRİŞ

Kestane (*Castanea* spp.) hem ekonomik hem de kültürel açıdan önemli bir türdür. Ancak kestane yetiştiriciliği, özellikle kestane gal arısı (*Dryocosmus kuriphilus*) ve kestane kanseri (*Cryphonectria parasitica*) gibi biyotik stresler nedeniyle ciddi şekilde sınırlandırılmaktadır (Dini et al., 2012; Çetin et al., 2014; Sartor et al., 2015; Akyüz, 2025). Son yıllarda yapılan çalışmalar, gal arısına dayanıklı ve kanser hastalığına karşı daha toleranslı genotiplerin geliştirilmesine odaklanmış ve bu kapsamda 'Akyüz' çeşidi tescil edilmiştir (TTSM, 2022). Bu çeşit, hem gal arısına dayanıklılığı hem de kanser hastalığına karşı gösterdiği tolerans ile öne çıkmaktadır (Çil et al., 2022).

Meyve ağaçlarında anaçların (özellikle vejetatif olanların) kullanımı, ağaç büyümesinin kontrolü, gençlik döneminin kısaltılması, meyve kalitesinin ve veriminin iyileştirilmesi ve zararlılara ve hastalıklara karşı direncin artırılması gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır (Koşar, 2023; Ekinci & Ak, 2025). Kestanede klasik vejetatif çoğaltma yöntemleri genotip bağımlı olup başarı oranları düşük kalmaktadır (Vieitez et al., 1989). Bu bağlamda elit ve dayanıklı genotiplerin klonal çoğaltımı için mikroçoğaltım stratejileri büyük önem taşımaktadır (Aravanopoulos et al., 2014). Bununla birlikte, kestanenin *in vitro* üretiminde en önemli

kısıtlayıcı faktörlerden biri besi ortamlarının mineral bileşimi olup, uygun besi ortamının belirlenmemesi fizyolojik bozukluklara, yapraklarda kloroz ve nekroz gibi semptomlara hatta eksplantların kaybına neden olabilmektedir (Nas & Read, 2001; Teixeira da Silva et al., 2020).

Mullins (1987), nodal eksplantlarda BA destekli aksiller sürgün indüksiyonu ve ex vitro IBA uygulamasıyla köklenme başarısı elde ederek ilk etkili protokolleri tanımlamıştır. Vieitez et al. (1989) yetişkin materyalde bazal nod segmentlerini ve uygun kök indüksiyon-aklimatizasyon rejimlerini belirlemiştir; Troch et al. (2010) geçici daldırma biyoreaktörlerinin çoğaltma hızını artırabileceğini göstermiştir. Aravanopoulos et al. (2014) elit genotiplerde MS tuz düzeyi ve BAP konsantrasyonlarının çoğalma başarısını, Pavese et al. (2022) ise polifenol oksidasyonu ve kontaminasyon yönetimi üzerinden protokol verimliliğini iyileştirmiştir. Genel olarak bu çalışmalar, kestane mikroçoğaltımın genç ve yetişkin genotiplerde mümkün olduğunu, ancak genotip kaynaklı farklılıklar, fenolik oksidasyon gibi durumların kritik konular olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bilgiler ışığında, ‘Akyüz’ gibi dayanıklı çeşitlerde mikroçoğaltım için uygun besi ortamı ve mineral beslenme stratejilerinin belirlenmesi hem çoğaltma verimliliği hem de sağlıklı bitki elde edilmesi açısından kritik bir adım oluşturmaktadır.

Makro ve mikro besin elementlerinin miktarı, azot formları ($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ oranı), Ca/Mg dengesi ve toplam tuz konsantrasyonu, eksplant gelişimi ve fizyolojik yanıtları doğrudan etkilemektedir (George et al., 2008). Odunsu türlerde en çok kullanılan besi ortamları arasında Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd and McCown, 1980), Driver & Kuniyuki (DKW) (Driver & Kuniyuki, 1984) ve Gresshoff & Doy (GD) (Gresshoff & Doy, 1972) yer almaktadır. Bu ortamların başarı düzeyleri türler arasında değişiklik göstermekte olup, kestane çoğunlukla sürgün çoğaltımı, kallus indüksiyonu ve köklenme parametreleri belirlenmiştir (Vieitez et al., 2009). Ancak özellikle besi ortamlarının mineral beslenme profilleri üzerindeki etkileri sınırlı sayıda incelenmiştir.

Bu çalışmada, kestane ‘Akyüz’ çeşidinde kullanılan GD, DKW, WPM ve MS ortamları, yaprak ve gövdedeki makro ve mikro besin içerikleri açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen bulguların, kestane mikroçoğaltımında besi ortamı seçimine katkı sağlayabileceği ve gelecekte yapılacak protokol geliştirme çalışmalarına temel oluşturabileceği düşünülmektedir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bitki materyali ve kültür koşulları

Bu çalışmada ‘Akyüz’ çeşidi kullanılmıştır. ‘Akyüz’ çeşidi, ‘King Arthur’ (*C. mollissima* x *C. seguiné*) ve ‘Lockwood’ (*C. crenata* x *C. sativa* x *C. dentata*) melezleme çalışmasından elde edilmiştir (Macit et al., 2018). ‘Akyüz’, Asya kestane gal arısına dayanıklılığı ile bilinmektedir (Çil et al., 2022). ‘Akyüz’ çeşidinin eksplantları ilk olarak TÜBİTAK projesi (122O251) kapsamında kültüre alınmıştır.

Ön kültür sonucunda bitkilerden yaklaşık 1,5 cm uzunluğunda, her biri bir adet tomurcuk ve üst kısmında yarım yaprak içerecek şekilde eksplantlar hazırlanmıştır. Eksplantlar, 25 × 150 mm boyutlarında kültür tüplerine yerleştirilmiştir. Denemede dört ayrı besi ortamı [Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962), Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd and McCown, 1980), Driver & Kuniyuki (DKW) (Driver and Kuniyuki, 1984) ve Gresshoff & Doy (GD) (Gresshoff and Doy, 1972)] kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Besi Ortamlarının Basal Kompozisyonları

	MS	WPM	DKW	GD
Makroelementler (mg/L)				
NH ₄ NO ₃	1650	400	-	-
KNO ₃	1900	900	-	900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	96	240	166
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	180	370	370
KH ₂ PO ₄	170	85	170	85
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	556	-
K ₂ SO ₄	-	-	990	-
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	-	150	-
NH ₄ Cl	-	-	300	-
Mikroelementler (mg/L)				
H ₃ BO ₃	6.20	1.55	6.20	3.10
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.30	8.45	89.00	16.90
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	4.30	8.60	4.30
KI	0.83	0.41	0.83	0.41
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.12	0.25	0.12
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.02	0.01	0.02	0.01
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.02	0.01	0.02	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80	5.60	28.00	14.00
Na ₂ EDTA	37.30	7.45	37.30	18.65

Ortam; 2 mg/L Zeatin, ve karbon kaynağı olarak 30 g/L sakkaroz eklenmiştir. Ortamın pH'sı 5.5–5.7 aralığında 1 mol·L⁻¹ NaOH veya 1 mol·L⁻¹ HCl kullanılarak ayarlanmış, 7 g/L Bacto agar eklenmesinin ardından otoklavlanmıştır. Tüm kültürler 25 ± 2 °C sıcaklıkta, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyotta ve yaklaşık 40 µmol·m⁻²·s⁻¹ ışık şiddetinde tutulmuştur. Deneme süresince bitkiler 4 haftalık aralıklarla sararan yaprakları elemine edilerek toplam dört kez altkültüre alınmıştır. Her bir uygulama için 36 tekrür kullanılmıştır.

Besin elementi analizi

Besi ortamı farklılıklarının bitkilerin mineral beslenme profilleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yaprak ve gövde dokuları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Örnekler, altıncı altkültür döneminin sonunda toplanmış, saf su ile yıkanarak 65 °C'de etüvde sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur. Kurutulan materyaller öğütülerek homojen hale getirilmiştir. Bitki örneklerinin toplam azot (N) içeriği Kjeldahl yöntemi ile belirlenmiştir (Bremner, 1965). Besin elementlerinin konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla, 0.5 gram kuru bitki örnekleri tartılarak 550 °C'de 4-8 saat kül fırınında yakılmıştır. Yakma işlemi sonrasında elde edilen kül, hidroklorik asit (HCl) ile çözülmüş ve analizlere hazır hale getirilmiştir (Jones et al., 1991). Bu çözeltiler kullanılarak, fosfor (P) içeriği vanadat-molibdat sarı renk yöntemine dayalı olarak spektrofotometrede ölçülmüştür (Olsen & Sommers, 1982). Aynı çözeltiler üzerinde kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), demir (Fe), mangan (Mn), çinko (Zn) ve bakır (Cu) konsantrasyonları ise atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak belirlenmiştir (Jones et al., 1991). Tüm bu analizler üç tekrar ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar mg/kg kuru ağırlık esasına göre hesaplanarak raporlanmıştır.

İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler Minitab istatistik yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve ortamlar (besi ortamları) arasındaki farklar LSD testi ($P \leq 0.05$) ile belirlenmiştir. Makro ve mikro besin elementlerine ait veri seti ise çok değişkenli örüntülerin görselleştirilmesi amacıyla PAST 4.03 yazılımında (Hammer et al., 2001) Temel Bileşen Analizi (PCA) yöntemiyle değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Yaprak ve gövde dokularında makro besin elementlerinin içerikleri

Tablo 2’de verilen sonuçlara göre yaprak dokusunda makro element içerikleri ortamlar arasında önemli farklılıklar göstermiştir ($p < 0.05$). MS ortamında azot değeri %3.25 ile en yüksek bulunmuş, bu değer istatistiksel olarak diğer ortamlardan farklı bir grup oluşturmuştur. Fosfor içeriği ise GD’de 2824.2 mg/kg ile öne çıkmış, bu ortam LSD testinde diğer ortamlardan ayrı bir istatistiksel grup içinde yer almıştır. Kalsiyum (1170.4 mg/kg) ve magnezyum (1288.7 mg/kg) içerikleri GD’de, benzer şekilde WPM’de ise nispeten yüksek bulunmuş, bu iki ortam Ca ve Mg açısından birbirine yakın gruplarda sınıflanmıştır.

Tablo 2. ‘Akyüz’ Kestane Çeşidi Yaprak Dokusunda Belirlenen Makro Element İçerikleri

Ortam	N (%)	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)
MS	3.25 a	1540 b	2100 a	1170.4 a	1288.7 a
GD	2.99 b	2824.2 a	2200 a	1170.4 a	1288.7 a
WPM	3.05 ab	1740.7 b	2150 a	1142.4 a	1103.9 a
DKW	2.97 b	553.3 c	2000 b	820.6 b	798.1 b

LSD %5 düzeyine göre farklı harfler istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

Tablo 3’te gövde dokusundaki makro element içerikleri gösterilmektedir. Gövdelerde makro element birikiminin yapraklara kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür. Özellikle WPM ortamında kalsiyum (1886.9 mg/kg), magnezyum (2577.9 mg/kg) ve fosfor (5718.1 mg/kg) içerikleri diğer tüm ortamlardan anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($p < 0.05$) ve LSD testinde tek başına ayrı bir grup oluşturmuştur. Buna karşın MS ortamında P değeri 1146.5 mg/kg ile daha düşük seviyede kalmıştır.

Tablo 3. ‘Akyüz’ Kestane Çeşidi Gövde Dokusunda Belirlenen Makro Element İçerikleri

Ortam	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)
MS	1146.5 b	2300 b	1551.3 b	1849.2 b
GD	1037.5 b	2100 b	841.0 c	964.2 c
WPM	5718.1 a	2400 a	1886.9 a	2577.9 a
DKW	1795.1 b	2200 b	1213.1 b	1437.6 b

LSD %5 düzeyine göre farklı harfler istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

Yaprak ve gövde dokularında mikro besin elementlerinin içerikleri

Tablo 4 yapraklardaki mikro element içeriklerini sunmaktadır. Mn içeriği en yüksek MS ortamında (74 mg/kg) ölçülmüş, LSD gruplarında bu ortam istatistiksel olarak diğerlerinden ayrılmıştır. Fe içeriği DKW’de (184 mg/kg) en yüksek değere ulaşmış, bu da demirin ortam

bazlı alımında farklılıkları ortaya koymuştur. Zn içeriği WPM’de 44 mg/kg ile öne çıkarken, Cu içeriği GD’de 7 mg/kg ile diğer ortamlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu veriler, yaprak dokusunda elementlerin ortamdan ortama değişken bir şekilde dağıldığını göstermektedir.

Tablo 4. ‘Akyüz’ Kestane Çeşidi Yaprak Dokusunda Belirlenen Mikro Element İçerikleri

Ortam	Fe (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)
MS	77 c	3 b	74 a	28 b
GD	117 b	7 a	64 ab	33 b
WPM	148 b	5 b	65 ab	44 a
DKW	184 a	3 b	52 b	21 c

LSD %5 düzeyine göre farklı harfler istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

Tablo 5 gövde dokusuna ait mikro element içeriklerini göstermektedir. Gövdede özellikle WPM ortamı tüm elementlerde yüksek değerler kaydetmiştir: Mn (487 mg/kg), Zn (126 mg/kg), Cu (17 mg/kg) ve Fe (425 mg/kg). Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı olup ($p < 0.05$), LSD testlerinde WPM’nin tek başına ayrı bir grup oluşturduğu görülmüştür. MS, Mn açısından (453 mg/kg) yüksek bir değere sahip olmuş, ancak Zn, Cu ve Fe bakımından WPM’nin gerisinde kalmıştır. Bu sonuçlar, gövde dokusunun özellikle WPM ortamında mikro element birikimi açısından avantajlı olduğunu ortaya koymaktadır.

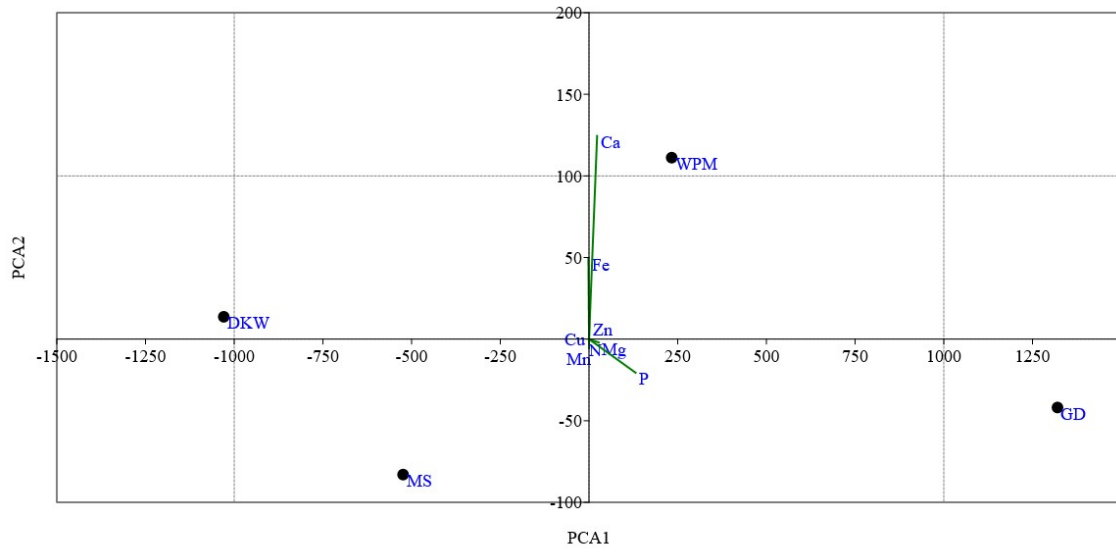
Tablo 5. ‘Akyüz’ Kestane Çeşidi Gövde Dokusunda Belirlenen Mikro Element İçerikleri

Ortam	Fe (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)
MS	371 b	10 b	453 a	55 b
GD	109 c	6 b	239 b	36 c
WPM	425 a	17 a	487 a	126 a
DKW	125 c	8 b	302 b	58 b

LSD %5 düzeyine göre farklı harfler istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

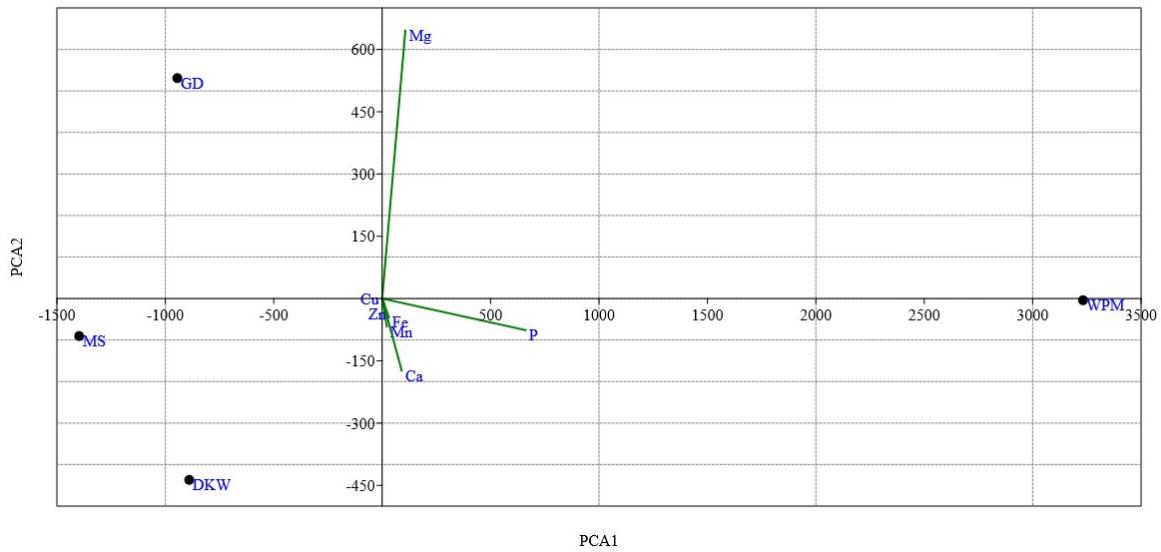
Temel Bileşen Analizi (PCA)

Yaprak örneklerine ait PCA biplotu, ilk iki bileşenin toplam varyansın büyük kısmını açıkladığını ve ortamlar arasında belirgin ayrışmalar olduğunu göstermiştir (Şekil 1). MS ortamı, N ve Mn vektörleri yönünde konumlanarak bu elementlerin yapraklarda baskın olduğunu ortaya koymuştur. GD ortamı fosfor (P) ekseninde ayrışmış, bu da P birikiminin özellikle GD yapraklarında yüksek olduğunu göstermektedir. WPM ortamı Ca (ve kısmen Mg) vektörleri yönünde yer almış, bu durum kalsiyum ve magnezyumun WPM’de daha etkin bir şekilde biriktiğini işaret etmektedir. DKW ortamı ise Fe vektörüne yakın konumlanmış, bu da demir alımının DKW’de öne çıktığını göstermektedir. Ayrıca Ca–Mg–P arasında pozitif korelasyon, N–Mn arasında ise benzer varyasyon gözlenmiştir. Bu bulgular, besi ortamı bileşiminin yaprak dokusundaki besin element dağılımını yönlendirdiğini açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 1. Farklı Besi Ortamlarında Yetiştirilen ‘Akyüz’ Kestane Çeşidi Yaprak Dokusunun Besin Element İçeriklerine Göre Oluşturulan Temel Bileşen Analizi (PCA)

Gövde örneklerine ait PCA biplotu (Şekil 2), besli ortamlarının element birikimi açısından belirgin şekilde ayrıştığını göstermektedir. WPM, PCA 1 ekseninde ileri konumlanmış ve özellikle Mg ile P vektörleri yönünde yer almıştır. Bu durum, WPM ortamında gövde dokularında yüksek magnezyum ve fosfor birikiminin baskın olduğunu ortaya koymaktadır. GD, PCA 2 ekseninde Mg’ye görece yakın yerleşmiş olup, gövdede magnezyum birikiminin bu ortamda da desteklendiğini göstermektedir. MS, Mn ve N vektörleri yönünde konumlanarak yaprakta olduğu gibi azot ve manganla ilişkisini sürdürmüştür. DKW ise Fe eksenine en yakın ortam olarak ayrışmış ve gövdede de demir alımında DKW’nin belirgin rol oynadığını göstermiştir.



Şekil 2. Farklı Besi Ortamlarında Yetiştirilen ‘Akyüz’ Kestane Çeşidi Gövde Dokusunun Besin Element İçeriklerine Göre Oluşturulan Temel Bileşen Analizi (PCA)

Her iki dokuya ait PCA sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi, ortam × doku etkileşimlerini ortaya koymuştur. Yaprakta MS (N–Mn), GD (P), DKW (Fe) ve WPM (Ca–Mg) öne çıkarken, gövde dokusunda WPM'nin etkisi daha belirgin hale gelmiş ve Mg–P birikiminde baskın rol oynamıştır. MS, hem yaprakta hem de gövdede N–Mn ekseninde öne çıkmış, DKW ise her iki dokuda da Fe yönelimini korumuştur. GD ise yaprakta fosfor birikimi ile ilişkili iken gövdede daha çok magnezyumla bağlantılı bulunmuştur. Bu karşılaştırma, WPM ortamının özellikle gövde dokusunda mineral elementlerin birikimini güçlü biçimde artırdığını, MS'nin azot ve mangan ilişkisini her iki dokuda da koruduğunu ve DKW'nin demir alımındaki rolünü doğruladığını göstermektedir.

PCA, WPM'nin Ca–Mg–P ekseninde; MS'nin N ve Mn ekseninde, DKW'nin Fe ekseninde; GD'nin ise P ekseninde ayrıştığını görsel olarak doğrulamıştır. Yaprakta azot içeriğinin MS ortamında daha yüksek bulunması, MS'in yüksek toplam tuz konsantrasyonu ve çift azot kaynağı ($\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$) ile uyumludur. NH_4^+ 'un belirli düzeylerde bulunması, amino asit ve klorofil sentezi üzerinden sürgün dokusunda N birikimini destekleyebilir; aynı zamanda NO_3^- ile dengeli azot temini büyüme hızını artırabilir.

TARTIŞMA

Doku kültürü literatürü, NO_3^- ile NH_4^+ 'un birlikte verilmesinin tek başına kullanılan formlara göre çoğu türde büyüme ve organogenez için daha elverişli olduğunu göstermektedir (Ramage & Williams, 2002; Kothari et al., 2004). Song et al. (2021), kestane melezlerinde mikroçoğaltımı iyileştirmek amacıyla WPM ortamını azot formu ve miktarını değiştirerek modifiye etmiştir. Özellikle uygun düzeylerde NH_4^+ varlığı, amino asit ve klorofil sentezi üzerinden sürgün dokusunda N birikimini destekleyebilmekte; NO_3^- ile dengeli bir azot temini sağlanması ise fotosentetik performansı ve büyüme hızını artırabilmektedir (Römheld, 2012; Hachiya & Sakakibara, 2017). Ca ve Mg içerikleri bakımından yaprak dokusunda gözlenen farklar sınırlı olmuş, LSD grupları ortamlar arasında belirgin bir ayrışma göstermemiştir. Bu durum, yaprakta katyon taşınımının ksilem akışına ve yaprak yaşına bağlı redistribüsyon süreçlerine bağlı olarak daha dengeli seyredildiğini düşündürmektedir. Literatürde de Ca ve Mg'nin bitkilerde esas olarak ksilem üzerinden taşındığı, floem mobilitesinin sınırlı olması nedeniyle özellikle yaşlı yapraklarda yeniden dağılımın kısıtlı kaldığı bildirilmektedir (Marschner, 1995; White & Broadley, 2003). Bu nedenle, ortamlar arasında büyük farklılık gözlenmemesi, yaprak dokusunda bu iki elementin fizyolojik taşınım mekanizmalarının baskınlığı ile açıklanabilir. Benzer şekilde, bitkilerde Ca ve Mg genellikle daha stabil dağılım göstermekte, yalnızca ekstrem eksiklik koşullarında belirgin semptomlar ortaya çıkmaktadır (Rios et al., 2012).

Literatürde Ca ve Mg'nin bitki dokularında özellikle hücre duvarı pektatlarına bağlandığı ve doku sertliği ile ilişkili olduğu, bu nedenle de gövde dokusunun önemli bir depo/havuz görevi görebileceği belirtilmiştir (Marschner, 1995; White & Broadley, 2003). Bu doğrultuda WPM örneklerinin Ca–Mg–P değerlerinin yüksek bulunması neticesinde bu ortamın özellikle katyon ve fosfat taşınımını teşvik ettiğini göstermiştir.

Demir (Fe) içeriğinin DKW ortamında yüksek bulunması, bu ortamın Mn katkısının yüksek ve Ca/Mg profilinin daha etkin tutulabildiğine işaret etmektedir. Besi ortamlarında demirin biyoyararlılığı ve bitki dokularındaki tutulma kapasitesi önemlidir (Al-Mayahi, 2021). 'Marsol' kestane çeşidinde MS ortamı uygulamasında bitkiciklerde sağlıklı yaprak oluşumun

sınırlı kaldığı ve düşük klorofil değerleri aldığı belirtilmiştir (Hatipoğlu, 2025). Bu sonuca paralel olarak ‘Akyüz’ çeşidinde de yapraklarda MS ortamında düşük, WPM ve DKW ortamlarında yüksek oranda Fe alımı belirlenmiştir. Mn, çeşitli enzim aktiviteleri için kritik olduğundan bu elementin sürgün gelişimiyle paralellik göstermesi beklenmektedir (Marschner, 1995). Çinko’nun WPM’de, Cu’nun ise GD’de öne çıkması; ortamların toplam sülfat ve katyon dengeleri ile Zn/Cu antagonizması (Zn-Fe, Cu-Fe rekabetleri) üzerinden açıklanabilir (Broadley et al., 2012).

WPM’in düşük tuzluluğunun ve iyonik dengesinin ksilem taşınımını kolaylaştırdığına ve gövdenin “iletim ve geçici depolama” dokusu olarak mikro element birikimini artırdığına işaret etmektedir. MS besi ortamında elde edilen gövde dokuları Mn açısından yüksek görünse de Zn-Cu-Fe’de WPM-s’nin gerisinde kalmıştır. Bu farklılık, toplam iyon yükü ve $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ dengesinin mikro element alımı üzerindeki dolaylı etkileriyle açıklanabilir. Yaprak-gövde ayrımı belirgin olup, özellikle gövdede hem mineral (Ca-Mg-P) hem de birçok mikro elementin yaprağa kıyasla daha yüksek birikim gösterdiği saptanmıştır. Korelasyon analizinde Ca-Mg-P arasında güçlü pozitif ilişkiler bulunmuş, bu elementlerin birlikte taşınması ve hücre duvarı yapısı/enerji metabolizmasındaki ortak taleplerle uyumlu olduğu görülmüştür.

Fe-Mn birlikteliği de pozitif korelasyon göstermiş ve bu durum, oksidoredüktaz enzimleri ile kloroplast ve mitokondri fonksiyonlarındaki ortak rollerle örtüşmüştür. Ortam tuz yükünün yüksekliği bazı elementlerin alımını sınırladığı ve yapısal bozukluklara yol açtığı belirtilirken (De Block, 1990), bu çalışmada MS ortamında yaprakta N ve Mn’un öne çıkması, DKW ortamında Fe’nin yüksek bulunması ve WPM ortamından alınan gövde dokularında Ca-Mg-P değerlerinin baskın çıkması benzer şekilde ortam bileşiminin doğrudan mineral beslenmeyi yönlendirdiğini göstermektedir.

Stevia rebaudiana üzerine yapılan çalışmada, farklı kültür ortamları ve çeşitlerin yapraklardaki besin element içerikleri değerlendirilmiş, özellikle makro elementler (N, P, K, Ca, Mg) ve mikro elementler (Fe, Mn, Zn) bakımından ortam kompozisyonunun beslenme durumunu doğrudan etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca uygun ortam seçiminin mikroçoğaltım başarısında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Vilariño et al., 2021). Besi ortamlarındaki CaCl_2 düzeyi, Hint leylağı (*Azadirachta indica* A. Juss) kültürlerinde STN düzeyini etkileyen faktörlerden biridir (Arora et al., 2010). Mubina et al. (2018), *Cicer arietinum* L. sürgün rejenerasyon ortamında MS bazlı CaCl_2 ve KNO_3 seviyelerini iki katına çıkararak yaprak nekrozunu ortadan kaldırmıştır.

Eucalyptus dunnii bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltımında yapılan besin eksikliği çalışmaları, özellikle N, Mg, Fe ve Zn yetersizliklerinin sürgün gelişimi ve yaprak morfolojisi üzerinde doğrudan olumsuz etkiler yarattığını ortaya koymuştur (Oberschelp & Gonçalves, 2018). Benzer şekilde bu çalışmada ‘Akyüz’ kestanesinde kullanılan farklı bazal ortamların, yaprak ve gövde dokularında belirgin besin element profilleri oluşturduğu gözlenmiştir. MS ortamında N ve Mn birikimi, GD’de P artışı, DKW’de Fe alımı ve WPM’de Ca-Mg-P zenginleşmesi bu bulgular ile uyumlu olarak, ortam bileşiminin mineral beslenmeyi yönlendirdiğini göstermektedir.

Eugenia dysenterica DC. üzerine yapılan çalışmada büyüme parametreleri ile besin konsantrasyonları birlikte değerlendirilmiş ve PCA analizi kullanılarak çevresel ve besinsel faktörlere bağlı varyasyon ayrıştırılmıştır (Bessa et al., 2016). Çalışmada özellikle Ca, Mg ve P elementlerinin büyüme performansını belirleyici faktörler olduğu vurgulanmıştır. Benzer

şekilde bu araştırmada ‘Akyüz’ kestanesinde PCA sonuçları, gövde dokusunda WPM ortamının Ca–Mg–P ekseninde ayrıştığını, yaprak dokusunda ise MS’nin N–Mn, DKW’nin Fe ve GD’nin P yönünde öne çıktığını göstermiştir. Thirugnanasampandan et al. (2009), *Smilax zeylanica* Vent. sürgün rejenerasyon ortamında MgSO₄’ün uygun seviyeye getirilmesinin eksplantların daha sağlıklı yapraklara sahip olmasını sağladığını belirledi.

Picea abies türü için yapılan çalışmada, farklı genotiplerde büyüme parametreleri, besin alımı ve olgunlaşma kapasiteleri birlikte izlenmiş ve mineral beslenmenin embriyo gelişimiyle doğrudan bağlantılı olduğu belirlenmiştir. (Find et al., 1998). Benzer şekilde bu araştırmada kestane ‘Akyüz’ çeşidinde kullanılan farklı bazal ortamların yaprak ve gövde dokularında makro ve mikro besin birikimlerini yönlendirdiği ve PCA ile ortam × doku ilişkilerinin ayrıştırılabildiği ortaya konulmuştur. Öte yandan, medya bileşiminin türler arası farklılıklar ve genotipe bağlı adaptasyonlarla yakından ilişkili olduğunu belirtilmektedir (Sota et al., 2024). Böylece bu çalışma, kestane gibi odunsu türlerde *in vitro* çoğaltım sırasında mineral beslenmenin dokuya özgü yönelimlerini ortaya koyarak hem bireysel genotiplerin hem de farklı bazal ortamların besin dinamikleri üzerindeki etkilerini daha net biçimde göstermektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, ‘Akyüz’ kestane çeşidinin mikroçoğaltımında kullanılan dört farklı bazal besi ortamının (MS, WPM, GD ve DKW) yaprak ve gövde dokularındaki makro ve mikro besin element birikimlerine etkileri değerlendirilmiştir. ‘Akyüz’ kestane çeşidinin yaprak ve gövde dokularında belirlenen besin element içerikleri ortamlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir (LSD %5). Yaprak makro elementlerinde WPM ortamı N (3.05%) ve K (2150 mg/kg) bakımından yüksek değerler vermiş, ancak en yüksek P içeriği GD ortamında (2824.2 mg/kg) belirlenmiş olup MS (1540 mg/kg) ve WPM (1740.7 mg/kg) ortamlarından istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. Ca ve Mg bakımından MS ve GD ortamları benzer bir düzeyde (Ca ≈1170 mg/kg; Mg ≈1288 mg/kg) olup WPM ile fark göstermemiş, buna karşın DKW ortamı her iki elementte de belirgin düşük değerler vermiştir (Ca 820.6 mg/kg; Mg 798.1 mg/kg). Gövde dokusunda ise WPM ortamı P (5718.1 mg/kg), K (2400 mg/kg), Ca (1886.9 mg/kg) ve Mg (2577.9 mg/kg) bakımından diğer ortamlardan anlamlı derecede yüksek bulunmuş, MS, GD ve DKW ortamları bu elementlerde daha düşük gruplarda yer almıştır. Mikro elementlerde yaprak dokusunda Fe içeriği DKW ortamında en yüksek (184 mg/kg), Zn içeriği WPM’de en yüksek (44 mg/kg) ölçülmüş, Cu GD’de (7 mg/kg), Mn ise MS’de (74 mg/kg) maksimum seviyede tespit edilmiştir. Gövde dokusunda benzer şekilde WPM Fe (425 mg/kg), Cu (17 mg/kg), Mn (487 mg/kg) ve Zn (126 mg/kg) bakımından istatistiksel olarak üstün olmuş, GD ve DKW ortamları çoğunlukla daha düşük sınıflarda yer almıştır. Bu sonuçlar, WPM ortamının özellikle gövde dokusunda hem makro hem mikro element birikimini anlamlı düzeyde artırdığını, GD ortamının P ve bazı mikro elementlerde avantaj sağladığını, DKW ortamının ise genel olarak düşük mineral birikimi ile karakterize olduğunu göstermektedir.

Bulgular, ortam bileşimlerinin mineral beslenmeyi yönlendirdiğini ve dokuya özgü farklılıklar oluşturduğunu göstermiştir. Yaprak dokusunda MS ortamı N ve Mn birikimini, GD ortamı P artışını, DKW ortamı Fe alımını, WPM ortamı ise Ca ve Mg zenginleşmesini öne çıkarmıştır. Gövde dokusunda ise özellikle WPM ortamı Ca–Mg–P ve mikro element birikimini belirgin biçimde teşvik ederek diğer ortamlardan ayrılmıştır. Korelasyon analizleri Ca–Mg–P arasında

güçlü pozitif ilişkiler bulunduğunu; PCA sonuçları ise ortamların besin elementleri yönünden açık bir şekilde ayrıştığını ortaya koymuştur.

Bu sonuçlar, kestane gibi odunsu türlerde *in vitro* çoğaltımın başarısında besi ortamı mineral dengesinin kritik rolünü vurgulamaktadır. Özellikle WPM ortamı, mineral zenginleşmesini artırarak klonal çoğaltım sürecinde önemli bir avantaj sağlamaktadır. MS ortamı, yapraklarda N ve Mn birikimiyle güçlü bir beslenme profili sunarken, DKW ortamı Fe alımı için öne çıkmaktadır. Çalışmamızın bulguları WPM ortamının ‘Akyüz’ çeşidinin mikroçoğaltımında özellikle gövde dokusunda besin alımını destekleyen daha dengeli bir iyonik ortam sağladığını ve bu nedenle odunsu türler için uygun bir ortam olarak önerilebileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, farklı ortamların dokulara özgü besin birikim profilleri dikkate alınarak kombine ya da modifiye edilmiş besi ortamlarının geliştirilmesi, kestane mikroçoğaltımında başarıyı artırabilecek stratejilerden biri olarak önerilmektedir. ‘Akyüz’ çeşidinin gal arısına dayanıklılığı göz önünde bulundurulduğunda, bu çeşit için optimize edilecek mikroçoğaltım protokolleri yalnızca sağlıklı ve homojen fidan üretimini hızlandırmakla kalmayacak, aynı zamanda zararlılara ve hastalıklara karşı dayanıklı genotiplerin yaygınlaştırılmasına katkı sağlayacaktır. Bu bulgular, sadece kestane için değil, diğer odunsu türlerde de dokuya özgü besin element dinamiklerini anlamak ve uygun ortam seçimini yapmak açısından yol gösterici niteliktedir.

YAZAR KATKILARI

Burak Akyüz: Çalışmanın tasarımı, veri analizi ve makale yazımı. **İbrahim Halil Hatipoğlu:** Laboratuvar çalışmaları, veri analizi, makale yazımı. **Salih Demirkaya:** Laboratuvar çalışmaları. **Abdurrahman Ay:** Laboratuvar çalışmaları

TEŞEKKÜR

Yazarlar, ‘Akyüz’ kestane çeşidine ait klonal olarak çoğaltılmış bitki materyalinin temini için sağlanan mali destekten dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu’na (TÜBİTAK, Proje No: 122O251) içtenlikle teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

- Akyüz, B. (2025). Morphological and phenological characterization of the bdb-1 chestnut genotype: A promising candidate for nut production and pollination. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 40(2), 367–380. <https://doi.org/10.7161/omuanajas.1625709>
- Al-Mayahi, A. M. W. (2021). *In vitro* plant regeneration system for date palm (Phoenix dactylifera L.): Effect of chelated iron sources, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 83. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00177-4>
- Aravanopoulos, F. A., Tchatchoua, D. T., & Barbas, E. (2014). Micropropagation of elite genotypes of *Castanea sativa* (Mill.). *Journal of Advances in Biotechnology*, 3(2), 200–209. <https://doi.org/10.24297/jbt.v3i2.1679>
- Arora, K., Sharma, M., Srivastava, J., Ranade, S. A., & Sharma, A. K. (2010). Rapid *in vitro* cloning of a 40-year-old tree of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) employing nodal stem segments, *Agroforestry Systems*, 78, 53–63. <https://doi.org/10.1007/s10457-009-9230-1>

- Bessa, L. A., Moreira, M. A., Silva, F. G., Mota, C. S., & Vitorino, L. C. (2016). Growth, nutrient concentration and principal component analysis of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) seedlings grown in nutrient solution, *Australian Journal of Crop Science*, 10(3), 425. <https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.03.p7477>
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2012). Function of nutrients: Micronutrients. In P. Marschner (Ed.), *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (3rd ed., pp. 191–248). Academic Press, San Diego.
- Çetin, G., Orman, E., & Polat, Z. (2014). First record of the Oriental chestnut gall wasp (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu) in Turkey, *Plant Protection Bulletin*, 54(4).
- Çil, Y., Serdar, Ü., & Akyüz, B. (2022). Susceptibility levels of some chestnut cultivars and genotypes to the chestnut gall wasp in Turkey, *Genetika*, 54(3), 1205–1216.
- De Block, M. (1990). Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones, *Plant Physiology*, 93, 1110–1116. <https://doi.org/10.1104/pp.93.3.1110>
- Dini, F., Sartor, C., & Botta, R. (2012). Detection of a hypersensitive reaction in the chestnut hybrid 'Bouche de Bétizac' infested by *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.023>
- Driver, J. A., & Kuniyuki, A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock, *HortScience*, 19, 507–509.
- Ekinci, H., & Ak, B.E. (2025). *In vitro* regeneration potential of *Pistacia integerrima* and *Pistacia khinjuk* rootstocks: a modeling approach for optimal medium formulation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 49 (3), 624-636. <https://doi.org/10.55730/1300-011X.3291>
- Find, J. I., Nørgaard, J. V., & Krogstrup, P. (1998). Growth parameters, nutrient uptake and maturation capability of two cell lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture, *Journal of Plant Physiology*, 152, 510–517.
- George, E. F., & de Klerk, G. J. M. (2007). The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In E. F. George & G. J. de Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture Vol. 1: The Background* (pp. 65–113). Springer.
- George, E. F., Hall, M. A., & de Klerk, G. J. (2008). The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In E. F. George, M. A. Hall, & G. J. de Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* (Vol. 1, pp. 65–113). Dordrecht, Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_3
- Gresshoff, P. M., & Doy, C. H. (1972). Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture, *Australian Journal of Biological Sciences*, 25, 259–264. <https://doi.org/10.1071/BI9720259>
- Hachiya, T., & Sakakibara, H. (2017). Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants, *Journal of Experimental Botany*, 68(10), 2501–2512. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw449>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*.
- Hatipoğlu, İ. H. (2025). Effects of different culture media and Fe-EDDHA applications on the *in vitro* propagation of chestnut and its biochemical profiles. *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-025-10563-z>
- Jones, J. B., Wolf, J. B., & Mills, H. A. (1991). *Plant Analysis Handbook*. Micro-Macro Publishing, Athens, GA.
- Kothari, S. L., Agarwal, K., & Kumar, S. (2004). Inorganic nutrient manipulation for highly improved *in vitro* plant regeneration in finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.), *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40, 515–519.

- Koşar, M.B., Koşar, D.A., & Ertürk, Ü. (2023). The effects of rootstocks on growth and development of sour cherry (*Prunus cerasus* L. cv. “Kütahya”) in the growing conditions of Bursa. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 47 (1), 1-10. <https://doi.org/10.55730/1300-011X.3059>
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants (2nd ed.). Academic Press, San Diego.
- McCown, B. H., & Sellmer, J. C. (1987). General media and vessels suitable for woody plant culture. In J. M. Bonga & D. J. Durzan (Eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry* (pp. 24–26). Dordrecht: Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-0994-1_2
- Mubina, N., Hoque, M., & Sarker, R. (2018). *In vitro* regeneration and overexpression of pea DNA helicase 45 (PDH45) gene into local cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) through Agrobacterium-mediated genetic transformation, *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 28, 125–140. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v28i1.37204>
- Mullins, M.G. (1987). Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) by shoot culture. *Scientia Horticulturae*, 31, 211–218.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Nas, M. N., & Read, P. E. (2001). Micropropagation of hybrid hazelnut: Medium composition, physical state and iron source affect shoot morphogenesis, multiplication and explant vitality, *Acta Horticulturae*, 556, 251–258.
- Oberschelp, G. P. J., & Gonçalves, A. N. (2018). Analysis of nutrient deficiencies affecting *in vitro* growth and development of *Eucalyptus dunnii* Maiden., *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24, 693–702. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0560-1>
- Pavese, V., Ruffa, P., Abbà, S., Costa, R.L., Corredoira, E., Silvestri, C., Torello Marinoni, D., & Botta, R. (2022). An *in vitro* protocol for propagating *Castanea sativa* Italian cultivars. *Plants*, 11, 3308. <https://doi.org/10.3390/plants11233308>
- Ramage, C. M., & Williams, R. R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis, *In vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, 38, 116–124. <https://doi.org/10.1079/IVP2001269>
- Rios, J. J., O’Lochlainn, S., Devonshire, J., Graham, N. S., Hammond, J. P., King, G. J., et al. (2012). Distribution of calcium (Ca) and magnesium (Mg) in the leaves of *Brassica rapa* under varying exogenous Ca and Mg supply, *Annals of Botany*, 109, 1081–1089. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs029>
- Römheld, V. (2012). Diagnosis of deficiency and toxicity of nutrients. In P. Marschner (Ed.), *Marschner’s Mineral Nutrition of Higher Plants* (3rd ed., pp. 299–312). Academic Press, San Diego.
- Sartor, S., Dini, F., Torello Marinoni, D., Melano, M. G., Beccaro, G. L., Alma, A., Quacchia, A., & Botta, R. (2015). Impact of the Asian wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Yasumatsu) on cultivated chestnut: Yield loss and cultivar susceptibility, *Scientia Horticulturae*, 197, 454–460.
- Song, G., Chen, Q., Callow, P., Mandujano, M., Han, X., Cuenca, B., Bonito, G., Medina-Mora, C., Fulbright, D. W., & Guyer, D. E. (2021). Efficient micropropagation of chestnut hybrids (*Castanea* spp.) using modified woody plant medium and zeatin riboside., *Horticultural Plant Journal*, 7, 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.09.006>
- Sota, V., Nacheva, L., Bošnjak, D., Abraham, E., Jevremović, S., Cvjetković, B., Galović, V., Jevremović, D., Marković, Z., Kongjika, E., Bogunović, S., Zeljković, S., Andonovski, V., Daničić, V., & Vujović, T. (2025). Unveiling the Balkans' advances: *In vitro* biotechnology of woody plants in the early 21st century, *Frontiers in Plant Science*, 16, 1586013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1586013>

- Teixeira da Silva, J. A., Nezami-Alanagh, E., Barreal, M. E., Kher, M. M., Wicaksono, A., Gulyás, A., Hidvégi, N., Magyar-Tábori, K., Mendler-Drienyovszki, N., & Márton, L. (2020). Shoot tip necrosis of *in vitro* plant cultures: A reappraisal of possible causes and solutions, *Planta*, 252, 47. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03449-4>
- Thirugnanasampandan, R., Mutharaian, V. N., & Bai, V. N. (2009). *In vitro* propagation and free radical studies of *Smilax zeylanica* Vent., *African Journal of Biotechnology*, 8, 395–400.
- Troch, V., Sapeta, H., Werbrouck, S., Geelen, D. and Van Labeke, M.C. (2010). *In vitro* culture of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Using temporary immersion bioreactors. *Acta Horticulturae*, 885, 383-390. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.885.54>
- Vieitez, A. M., Corredoira, E., Ballester, A., Muñoz, F., Durán, J., Ibarra, M. (2009). *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Q. bicolor* and *Q. rubra*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98, 135–145. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9546-6>
- Vieitez, A. M., Sánchez, C., & San-José, C. (1989). Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak., *Scientia Horticulturae*, 41, 151–159. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90059-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90059-9)
- Vilariño, S., Florido, M. C., García, J. L., & Cantos, M. (2021). Nutritional status of micropropagated plantlets of two varieties of *Stevia rebaudiana* Bert. under different culture conditions., *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources*, 29(3), 556263. <https://doi.org/10.19080/IJESNR.2021.29.556263>
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2003). Calcium in plants, *Annals of Botany*, 92(4), 487–511. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg164>