

**T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TOHUM BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**



**BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ SİSTEMLERİNDE
VİTRİFİKASYON SORUNUNUN ARONYA'DA (*ARONIA
MELANOCARPA*) MODELLEMESİ VE ÇÖZÜM
ÖNERİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİDA BAYHAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. B. Buhara YÜCESAN

BOLU, HAZİRAN - 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Nida BAYHAN tarafından hazırlanan “**Bitki Doku Kùltürü Sistemlerinde Vitrifikasyon Sorununun Aronya'da (*Aronia melanocarpa*) Modellemesi ve Çözüm Önerileri**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Tohum Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği/oy çokluğuyla kabul edilmiştir. 6/06/2023

Jüri Üyeleri

İmza

Tez Danışmanı
Prof. Dr. B. Buhara YÜCESAN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Muttalip GÜNDOĞDU
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Doç. Dr. İlker BÜYÜK
Ankara Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin 13/06/2023 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %13 olarak tespit edilmiştir.

.....

NİDA BAYHAN

ÖZET

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ SİSTEMLERİNDE VİTRİFİKASYON SORUNUNUN ARONYA'DA (*ARONIA MELANOCARPA*) MODELLEMESİ VE ÇÖZÜM ÖNERİLERİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NİDA BAYHAN
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TOHUM BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. B. BUHARA YÜCESAN)**

**BOLU, HAZİRAN - 2023
XIII + 64 sayfa**

Bu tez çalışmasıyla *in vitro* koşullarda klonal mikroçoğaltım yöntemi ile çoğaltılan ve birçok odunsu bitki türünde de görülen vitrifikasyon (camsılaşma) sorununu *Aronia melanocarpa*'da modelleyerek, uygun bir vitrifikasyondan kurtarma protokolü geliştirmek ve bu soruna yönelik çözüm önerileri getirmek amaçlanmıştır. Araştırmada, sağlıklı klonlar kullanılarak farklı sükroz ve farklı benzilaminpurin (BAP) konsantrasyonlarında vitrifikasyon oluşturma protokolü (VOP) ile vitröz eksplantlar elde edilmiş; ardından bu eksplantlar tek doz IBA, farklı sükroz ve farklı BAP konsantrasyonlarındaki vitrifikasyon sonlandırma protokolüne (VSP) alınıp iyileşme süreci takip edilmiştir. Aronya eksplantlarında vitrifikasyonun başlama ve sonlanma zamanları, oranları ve morfolojik gözlemlerine, stomaların mikroskobik incelemelerine ve iklimlendirme sürecindeki morfolojik gözlemlerine de bulgulara yer verilmiştir. Çalışmanın sonucunda, vitrifikasyon oluşturma protokolünün BAP içeren çoğu MS besin ortamındaki eksplantlarda %11 ila %77 oranında vitrifikasyon gözlenmiştir. Oluşan vitrifiye yapılar da ise; vitrifikasyon sonlandırma protokolünün BAP'sız MS besin ortamlarında 13. günde %95'in üzerinde iyileşme görülürken; BAP'lı MS besin ortamlarında bu oran %26—%66 arasında değişen yüzdelerde kalmıştır. VSP'nin 31. günde ise; BAP'lı MS besin ortamlarındaki iyileşme oranı yükselerek %66 — %94 arasında farklılık göstermiştir. Böylece bu tez çalışması ile *Aronia melanocarpa*'nın *in vitro* koşullardaki klonal çoğaltımında eksplantlarda görülen vitrifikasyonun, vitrifikasyon sonlandırma protokolüne alınarak kurtarılabileceği ortaya konmuştur. Bu çalışma aynı zamanda diğer odunsu meyve türlerinde de sıkça görülen söz konusu problemin çözülmesine yönelik fikir vereceği kanaatini oluşturmaktadır.

ANAHTAR KELİMELELER: Vitrifikasyon, Hiperhidrisite, BAP, Aronia melanocarpa

ABSTRACT

VITRIFICATION PROBLEM IN PLANT TISSUE CULTURE SYSTEMS AND ITS RECOVERY AS A MODEL STUDY ON ARONIA (*ARONIA MELANOCARPA*)

MSC THESIS

NİDA BAYHAN

**BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES
DEPARTMENT OF SEED SCIENCE AND TECHNOLOGY
(SUPERVISOR: PROF. DR. B. BUHARA YÜCESAN)**

BOLU, JUNE 2023

XIII + 64 pages

This thesis study was conducted to develop a recovery protocol for appropriate vitrification and to provide solutions to the vitrification problem seen in many woody plant species by modeling it in *Aronia melanocarpa* through clonal micropropagation method *in vitro* conditions. In the study, vitrified explants were obtained by creating vitrification with different sucrose and different benzylaminopurine (BAP) concentrations using healthy clones, and then these explants were subjected to a vitrification termination protocol with a single dose of IBA, different sucrose and BAP concentrations, and the recovery process was monitored accordingly. The starting and ending times, rates and morphological observations of vitrification in *Aronia* explants, microscopic examination of stomata and morphological observations during acclimatization process were also included in the findings. As a result of the study, it was observed that vitrification was observed in 11% to 77% of the explants in VOPs containing BAP in most MS nutrient media. In the vitrified explants, a recovery rate of over 95% was observed on the 13th day in BAP-free MS nutrient media, while this rate remained between 26% and 66% in BAP-containing MS nutrient media. On the 31st day of VSP, the recovery rate in BAP-containing MS nutrient media varied between 66% and 94%. Thus, it was revealed in this thesis study that the vitrification seen in the explants in the clonal propagation of *Aronia melanocarpa* under *in vitro* conditions can be recovered by taking it into the vitrification termination protocol. This study also suggests ideas for solving the problem frequently encountered in other woody fruit species.

KEYWORDS: Vitrification, Hyperhydricity, BAP, *Aronia melanocarpa*

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ	xi
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xii
TEŞEKKÜR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE ve LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	5
2.1 Genel Bilgiler.....	5
2.1.1 Aronyanın sınıflandırılması ve tarihçesi.....	5
2.1.2 Aronya türleri, özellikleri ve yayılış alanları.....	5
2.1.3 Bitki doku kültürü, mikroçoğaltım ve vitrifikasyon sorunu	6
2.2 Vitrifikasyon terimi ile ilgili literatür taraması.....	8
2.3 Bitki doku kültüründe görülen vitrifikasyona yönelik literatür taraması ..	9
2.4 Bitki doku kültürü yöntemiyle aronyanın mikroçoğaltımı ve vitrifikasyon bulgusuna yönelik literatür taraması	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1 Materyal	16
3.2 Yöntem	16
3.2.1 Vitrifikasyon Oluşturma Protokolü (VOP).....	16
3.2.2 Vitrifikasyon Sonlandırma Protokolü (VSP).....	19
3.2.3 Mikroskopik incelemeler	20
3.2.4 İklimlendirme	21
3.2.5 İstatistiksel veri analizi	22
4. BULGULAR	23
4.1 Vitrifikasyon Oluşturma Protokolü (VOP).....	23
4.1.1 Vitrifikasyon oluşturma protokolü (VOP) MS besin ortamlarındaki morfolojik gözlemler	23
4.1.2 Besin ortamlarına göre vitrifikasyon bulguları ve Tv süreleri	25
4.1.2.1 Vitrikiye sürgünlerin ortalama vitrifikasyon şiddeti.....	27
4.2 Vitrifikasyon Sonlandırma Protokolü (VSP).....	29
4.2.1 Vitrifikasyon sonlandırma protokolü (VSP) MS besin ortamlarındaki morfolojik gözlemler	31
4.2.2 Besin ortamlarına göre Ts süreleri, oranları ve VSP bulguları.....	32
4.3 Mikroskopik incelemeler	38

4.4 İklimlendirme aşaması.....	42
5. TARTIŞMA	47
5.1 Vitrifikasyon Oluşturma Protokolü (VOP) morfolojik gözlemler, T_v süresi ve vitrifikasyon oranları	47
5.2 Vitrifikasyon Sonlandırma Protokolü (VSP) morfolojik gözlemler, T_s süresi ve iyileşme oranları	51
5.3 Mikroskopik incelemeler	53
5.4 İklimlendirme	54
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	55
7. KAYNAKLAR.....	57



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 3.1.** Çalışmada kullanılan aronya klonları 16
- Şekil 3.2.** Eksplantların VOP ortamına alınma aşaması (a, b) ve kültüre alınan eksplantların florasan lamba altına yerleştirilmesi (c). Bar uzunluğu sırasıyla 5 mm ve 7 mm'dir..... 18
- Şekil 3.4.** Vitrifiye sürgünler (a) ve kallus bölgesi (b), eksplantların VSP besin ortamına alınma aşaması (c). Bar uzunluğu sırasıyla 7 mm, 5 mm ve 12 mm'dir.20
- Şekil 3.5.** Mikroskopik incelemeye alınan yapraklar; sağlıklı yapraklar (a) ve vitrifiye yapraklar (b). Bar uzunluğu 10 mm'dir.....21
- Şekil 4.1.** Vitrifikasyon şiddeti renk skalası, çalışmadaki gözlemlere dayanarak yazar tarafından hazırlanmıştır. Sükroz $g L^{-1}$, BAP $mg L^{-1}$ cinsindendir.28
- Şekil 4.2.** Yüksek (a, b, c) ve düşük (d, e, f) şiddetli vitrifiye sürgünlerin görselleri. Bar uzunluğu 10 mm'dir.28
- Şekil 4.3.** Yaprakların vitrifikasyon ve iyileşme döngüsü (Çalışmadaki gözlemlere dayanarak yazar tarafından oluşturulmuştur)..... 30
- Şekil 4.4.** Vitrifiye eksplantlarda (a, c) 13.gün başlayan nekroziz oluşumu (b, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.34
- Şekil 4.5.** Vitrifiye sürgünlerin BAP'sız ve IBA'lı $10 g L^{-1}$ sükroz içeren kültür ortamındaki iyileşme olarak tabir ettiğimiz vitrifikasyondan çıkma süreci. Yaprakların açılması ve köklenmenin başlaması (a, b) ve kök sayısı, sürgün uzunluğu ve kallus oluşumunun artması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.....35
- Şekil 4.6.** Vitrifiye sürgünlerin BAP'sız ve IBA'lı $20 g L^{-1}$ sükroz içeren kültür ortamındaki iyileşme süreci. Yaprakların açılması ve köklenmenin ve kallus oluşumunun başlaması (a, b), kök sayısı ve sürgün uzunluğunun artması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.35
- Şekil 4.7.** Vitrifiye sürgünlerin BAP'sız ve IBA'lı $30 g L^{-1}$ sükroz içeren kültür ortamındaki iyileşme süreci. Yaprakların açılması, köklenmenin ve kallus oluşumunun başlaması (a), renk geçişlerinin oluşması (b), kök sayısı ve sürgün uzunluğunun artması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.36
- Şekil 4.8.** Vitrifiye sürgünlerin BAP'lı ve IBA'lı $10 g L^{-1}$ sükroz içeren kültür ortamındaki iyileşme süreci. Bazı vitrifiye yaprakların açılması (a), renk geçişlerinin, kallus oluşumunun ve kardeşlemenin başlaması (b) ve sağlıklı yaprak sayısının, kallus çapının, kardeşleme sayısının ve sürgün uzunluğunun artması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.36

- Şekil 4.9.** Vitrifiye sürgünlerin BAP'lı ve IBA'lı 20 g L⁻¹ süktroz içeren kültür ortamındaki iyileşme süreci. Bazı vitrifiye yaprakların açılması (a), renk geçişlerinin, kallus oluşumunun ve kardeşlemenin başlaması (b) ve sağlıklı sürgün yaprak, kardeşleme sayısının, kallus çapının ve sürgün uzunluğunun artması, köklenmenin başlaması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.37
- Şekil 4.10.** Vitrifiye sürgünlerin BAP'lı ve IBA'lı 30 g L⁻¹ süktroz içeren kültür ortamındaki iyileşme süreci. Bazı vitrifiye yaprakların açılması, renk geçişlerinin, kallus oluşumunun ve kardeşlemenin başlaması (a, b) ve sağlıklı sürgün yaprak, kardeşleme sayısının, kallus çapının ve sürgün uzunluğunun artması, köklenmenin başlaması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.38
- Şekil 4.11.** Sağlıklı yaprakların üst epidermis mikroskop görüntüsü (a, b), Vitrifiye yaprakların üst epidermis mikroskop görüntüsü (c, d). Şekillerde stoma görülmemiştir.39
- Şekil 4.12.** Stomaların mikroskoptaki görüntüsü (20×); sağlıklı (a), yüksek vitrifiye (b, c) ve düşük vitrifiye yapraklardaki stomalar (d, e)41
- Şekil 4.13.** Sağlıklı aronya sürgünlerin paperpotlara aktarılma aşaması: sürgün yapraklarının üstten (a), köklerinin yandan (b), paperpotlara alınan sürgünlerin genel (c) ve sürgünlerin paperpottaki (d) görünümeleri. Bar uzunluğu 10 mm'dir.42
- Şekil 4.14.** Vitrifiye aronya sürgünlerinin paperpotlara aktarılma aşaması: sürgünlerin önden (a, b), vitrifiye yaprakların üstten (c) ve vitrifiye sürgünlerin paperpottaki (d) görünümü. Bar uzunluğu 10 mm'dir.43
- Şekil 4.15.** İklimlendirme aşamasının 10. gündeki sağlıklı (a, b) ve vitrifiye (c, d) sürgünler. Bar uzunluğu 10 mm'dir.44
- Şekil 4.16.** Kültür kaplarının kapaklarının köşelerden hava alacak biçimde yıldız biçiminde örtülmesi.....44
- Şekil 4.17.** İklimlendirme aşaması sonunda vitrifiye (a, b) ve sağlıklı sürgünler (c, d). Bar uzunluğu 5 mm'dir.45
- Şekil 4.18.** Saksıya aktarılan sağlıklı ve vitrifiye sürgünler (a), 20 gün sonra vitrifiye sürgünler kekila torfunda ölmüştür (b).46

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Vitrifikasyon oluşturma protokolü (VOP) kullanılan besin ortamı içerikleri	17
Tablo 3.2. Vitrifikasyon oluşturma protokolü sonunda vitrifiye olan yaprakların vitrifikasyon şiddetinin belirlenmesi	18
Tablo 3.3. Vitrifikasyon sonlandırma protokolü için kullanılan besin ortamı içerikleri	19
Tablo 4.1. Vitrifikasyon oluşturma protokolünde (VOP) MS besin ortamlarındaki eksplantların morfolojik gözlemleri	25
Tablo 4.2. Sürgünlerin vitrifiye oldukları MS besin ortamları, T_v süreleri ve vitrifikasyon oranları (%)	27
Tablo 4.3. Vitrifikasyon sonlandırma protokolü (VSP) MS besin ortamlarındaki morfolojik gözlemleri	32
Tablo 4.4. Vitrifikasyon sonlandırma protokolü (VSP) MS besin ortamlarına göre sürgünlerin vitrifikasyon sonlanma süresi (T_s) ve oranı (%)	33
Tablo 4.5. Mikroskopik incelemeye alınan yaprakların birim alandaki ($22,6 \mu m^2$ ($2 \times 10^{-5} mm^2$) stoma verileri	39
Tablo 4.6. Mikroskopik incelemeye alınan yaprakların stoma ölçüleri	40
Tablo 4.7. İklimlendirme sürecinin sonunda sürgünlerin morfolojik gözlemleri	45

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

BAP/BA	: Benzilaminopurin/Benziladenin
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
EBSS	: Eksplant başına sürgün sayısı
FeSO₄	: Demir sülfat
GA₃	: Giberellik asit
IAA	: İndol-3-asetik asit
IBA	: İndol bütirik asit
LF	: Lee ve Fossard besin ortamı
MS	: Murashige ve Skoog besin ortamı
NAA	: Naftelin asetik asit
ppm	: Milyonda bir birim
T_s	: Vitrifikasyon iyileşme süresi
T_v	: Vitrifikasyon süresi
VOP	: Vitrifikasyon oluşturma protokolü
VSP	: Vitrifikasyon sonlandırma protokolü
Y_Y	: Yaşam yüzdeliği
WPM	: Woody Plant Medium besin ortamı
$\bar{x}$	: Aritmetik ortalama
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksiasetik asit

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, fikirlerimi sınırlamadan özgür bırakan tez danışmanım Prof. Dr. Buhara YÜCESAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımı büyük bir özenle inceleyip, fikirlerini benimle paylaşan ve tez savunmasına katılarak bana yol gösteren değerli Jüri Üyesi Hocalarım Prof. Dr. Muttalip GÜNDOĞDU ve Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e; mikroskobik incelemeler için çalışmama destek veren Prof. Dr. Göksel ÖZER'e teşekkür ederim.

Beni bugünlere sabırla, sevgiyle ve büyük bir emekle getiren, desteklerini her zaman hissettiğim değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayat arkadaşım, kıymetli eşim Dr. Öğr. Üyesi İsa BAYHAN'a her daim ve koşulsuz şartsız yanımda olduğu için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Tez çalışmam için bitki materyalinin temini konusunda destek veren Xplant (İstanbul) ve Zerafet Çiçekçilik (Konya) firmalarına teşekkür ederim.

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde önemli bir payı olan ve 2022.10.04.1558 proje numarasıyla tez çalışmamı destekleyen Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Üzümsü meyvelere son yıllarda hem dünyada hem de ülkemizde yüksek oranda rağbet gösterilmektedir. Üzümsü meyveler taze olarak tüketilmeye uygun olduğu gibi farklı üretim alanlarında işlenerek de değerlendirilmeleri mümkün olmaktadır. Bu nedenle de endüstride önemi giderek artmaktadır.

Ülkemizin dünyadaki üzümsü meyve üretimindeki payı Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2018 yılı verilerine göre %8'dir. Bu payın %25'ini çilek, %75'ini diğer üzümsü meyve grubundaki meyve türleri oluşturmaktadır (Engin, 2020). Üzümsü meyve grubunda olan çilek, dut, ahududu, böğürtlen ve yaban mersini meyvelerinin ülkemizde 2017 – 2021 yılları arasındaki ortalama üretim miktarlarına (ton) bakıldığında dengesiz bir dağılım gösterdiği görülmektedir. Bu miktarlar sırasıyla; 508.712, 70.088, 5.475, 2.642 ve 965,2 ton olduğu görülmektedir (TÜİK, 2022).

Farklı iklim koşullarına sahip olan ülkemizin her bölgesinde üzümsü meyvelere rastlanmakta ve beğenilerek tüketilmektedir. İklim ve toprak adaptasyonunda fazla sorun yaşanmayan çilek, ahududu, aronya, yaban mersini gibi meyvelerin üretimi de giderek artmaktadır. Hem taze tüketime uygun olmaları hem de reçel, komposto, meyve suyu, çay, likör, pastacılık ürünlerinin yanında kozmetik alanında da kullanılması, aile işletmeciliğine uygun olması gibi birçok nedenler üretimin gerçekleştirilmesinde önemli paya sahiptir (Engin, 2020; Horzum, 2022). Üzümsü meyveler grubunda yer alan aronya meyvesi de antosiyanin renk pigmentlerinin doğal olarak bulunmasından dolayı siyah, koyu-mor ve kırmızı renkleri sayesinde doğal gıda renklendiricisi olarak kullanılabilir. Bununla birlikte eczacılık ve kozmetik sektöründe de tercih edilmektedir (Horzum, 2022).

Üzümsü meyve grubunda bulunan *Aronia melanocarpa*, Kuzey Amerika'nın kuzeydoğu bölgesi ve Büyük Göller alanından doğal yayılış göstererek, güneyde yüksek kesimlerdeki dağ bataklıklarında ve dağ eteklerinde bulunmaktadır (Rossell ve Kesgen, 2003). Bu bölgedeki kabileler tarafından aronyaya farklı isimler verilmiştir ve çayı yapılarak soğuk algınlığına karşı tedavide kullanılmıştır. Aronyaya ilave ettikleri hayvansal yağ ve kurutulmuş et tozu ile besleyiciliği artırılmıştır (Şahin ve Erdoğan, 2022). Aronya dünyada en çok Amerika, Kanada, Almanya, Rusya, Polonya, Japonya, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Ukrayna, Finlandiya gibi ülkelerde yetişmektedir (Yılmaz vd., 2021).

Ülkemizde ise aronyanın yetiştirilmesi ile ilgili faaliyetler ilk olarak 2012 yılında Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde deneme amaçlı plantasyon oluşturularak fidan üretimine başlanmıştır. Sonrasında 2017 yılında hasat şenliği ve tanıtım faaliyetleri ile birlikte ülke geneline yayılmaya başlamıştır (Poyraz Engin ve Boz, 2019). Kırklareli, Bursa, Manisa, Kırşehir,

Yalova, Çanakkale, Samsun, İzmir, Antalya, İstanbul, Ordu ve Ankara’da Aronya yetiştiriciliği yapılmaktadır (Şahin ve Erdoğan, 2022).

İnsan sağlığı bakımından büyük öneme sahip antosiyanin ve antioksidan açısından zengin meyvelere ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Çağlar ve Demirci, 2017). Aronya meyvesi içerdiği 56 g/kg’lık lif içeriği nedeniyle günlük olarak tüketimde fonksiyonel gıda ya da gıda takviyesi olarak tavsiye edilmektedir (Jurendic ve Scetar, 2021). Antioksidan değeri bakımından 16,06 gibi yüksek ORAC değerine sahip olmasından dolayı “Süper Meyve” olarak da bilinmektedir (Şahin ve Erdoğan, 2022). Mineral açısından değerlendirildiğinde aronya, makro elementlerden potasyum ve kalsiyum; mikro elementler bakımından da demir ve çinko gibi minerallerin yüksek oranda bulunduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte A, C, E, K ve B vitaminlerini bünyesinde barındırır ve β -karoten içeriği bakımından da zengindir (Kraujalyte vd., 2013).

Aronya çeşitlerine ait meyvelerin farklı olgunlaşma zamanları vardır. Örneğin; *Aronia melanocarpa* temmuz ayının ikinci haftasında olgunlaşmaya başlar, ağustos ayının üçüncü haftasının sonuna kadar devam eder. Bu nedenle *Aronia melanocarpa* tohumlarını elde etmek için meyveler olgunlaşmanın en yüksek olduğu zamanlarda toplanmalıdır. Toplanan meyvelerden tohum ekstraksiyonun yapılabilmesi için meyvelerin bir hafta boyunca suda bekletilmesi ve suyun günlük olarak değiştirilmesi gerekmektedir. Yumuşayan meyveler elekten geçirilerek tohumlar elde edilebilir (Brand, 2016). Aronyanın üretimi tohumla mümkündür ancak çeşitlerinin çoğunda çekirdekler azdır. Bu nedenle klasik yöntemle tohum elde etmek oldukça zordur (Pırlak ve Almokar, 2018). Aronya çeşitleri aynı zamanda çelikle de çoğaltılabilmektedir. Brand (2016), aronyanın çelikle çoğaltımı için 10 – 15 cm uzunluğunda çelikleri 3,000 ppm IBA’ya daldırarak 50:50 turba yosunu:perlite içeren kaplara yerleştirmiştir. Beş ila sekiz hafta içerisinde köklenmenin meydana geldiğini belirtmiştir. Çelikleri kış boyunca muhafaza etmek ve bitki kayıplarını en az seviyede tutmak için ısıtılmalı alanlarda tutulması tavsiye edilmiştir. Tohumdan çimlendirmenin sınırlı ve düşük performanslı olması, çelikle üretimde ana-bitkiden belli ölçüde çelik boyu ve köklenme için uygun koşulların ayarlanması göz önüne alındığında Aronyanın çoğaltılmasında mikroçoğaltım tekniği bir hayli ön plandadır. Aronya klonlarının sürgün eksplantları farklı aşamalarda *in vitro* koşullarda çoğaltılabilmektedir (Litwińczuk, 2012). Aronyanın *in vitro* çoğaltımı konusunda bulunan çok sayıda çalışma rapor edilmiştir (Litwinczuk, 2002; Şuğan vd., 2017; Çelebi-Toprak ve Alan, 2018; Rusea vd., 2018; Petrova vd., 2019). Fakat bu çalışmalar uzun periyotlarda örneğin 12 aydan fazla süren alt kültürlerde veya endüstriyel boyutta üretimlerde öne sürülen üretim protokollerinin sürdürülebilir olup olmadığına dair hiçbir veri sunmamaktadır. Özellikle fiyolojik bir problem olan vitrifikasyon sorunu bu bağlamda altı çizilmesi gereken bir konudur.

Odunsu ve otsu türlerde *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım sırasında vitrifikasyon problemi ile karşılaşılabilir (Zimmerman, Rogers ve Cobb, 1991). Vitrifikasyon; hiperhidrisite veya camsılaşma olarak da bilinen ve çok sayıda bitkiyi etkileyen fizyolojik bir bozukluktur (Kevers vd., 1984; Dillen ve Buysens, 1989). Vitrikiye bitkiler kalın, kırılkan, suya batırılmış gibi parlayan, uzun ve kıvrılmış yapraklara ve yarı saydam görünüme sahiptirler (Zimmerman vd., 1991). Vitrifikasyon, çeşitli şiddet seviyelerinde meydana gelebilir. Ciddi derecede vitrikiye edilmiş *Pinus radiata* sürgünleri yarı saydam iken, orta düzeyde vitrifikasyona sahip sürgünler "ıslak" bir görünüme sahiptir (Bongo vd., 1992). Vitrikiye sürgünler hem zayıf bir büyüme hem de mikroçoğaltım sırasında daha düşük oranda kardeşleme, köklenme ve toprakta daha az hayatta kalma eğilimi gösterirler (Vieitez vd., 1985). Bu olumsuz sonuçlarından dolayı vitrifikasyon problemi ticari uygulamaları ve üretimleri sınırlamaktadır (Kataeva vd., 1991). Mikroçoğaltım sırasında peşi sıra bitkilerin alt kültüre alınmasının vitrifikasyonu arttırdığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (Ziv et al. al. 1983; Leshem et al. 1988; Safrazbekyan et al. 1990). Vitrifikasyon nedenlerinin çok yönlü olduğu (Rodríguez vd., 2012) ve büyüme düzenleyicileri, agar konsantrasyonu (Debergh ve diğerleri, 1981; Bornman ve Vogelmann, 1984), etilen (Kevers ve Gaspar, 1985) ve yüksek amonyum düzeyi (Daguin ve Letouze, 1986), yüksek bağıl nem (Zimmerman vd., 1991) gibi faktörlerin vitrifikasyonu etkileyen etmenler olarak belirlendiği bilinmektedir. Soh ve Bhojwani (2013), yüksek sitokinin konsantrasyonlarının sıklıkla bitkilerde vitrifikasyon sorunlarına sebep olabileceğini belirtmişlerdir. Besin ortamının katılaştırılması amacıyla kullanılan agar konsantrasyonunun artırılması; sitokinin hormonu konsantrasyonunun ve amonyak nitrojen seviyelerinin düşürülmesi gibi müdahaleler ile bazı türlerde vitrikiye dokular normalleştirilmiştir (Gaspar ve diğerleri, 1987).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında odunsu bir bitki olan aronyada vitrifikasyon süreci (*Aronia melanocarpa*) 6-benzilaminopurin (BAP) ve sükrozun farklı konsantrasyonları ile birlikte "vitrifikasyon oluşturma protokolü (VOP)" tasarlanarak aronya eksplantlarının sürgünlerinde modellenmiş, ardından vitrikiye olan aronyaların vitrifikasyondan kurtarılması için farklı konsantrasyonlarda BAP, sükroz ve tek konsantrasyonda IBA ile birlikte "vitrifikasyon sonlandırma protokolü (VSP)" oluşturularak sürgünler kurtarılmaya çalışılmıştır. Aynı zamanda aronyanın farklı besin konsantrasyonlarında hangi zaman aralığında vitrikiye olduğunu ve vitrifikasyondan kurtarmanın hangi zaman aralığında mümkün olabileceğine yönelik çalışma yürütülerek vitrifikasyon problemine yönelik çözüm önerileri sunulmuştur.

Çalışma üç aşamada yürütülmüştür;

1. aşamada aronyanın vitrikiye edilmesine yönelik VOP sürecine ilişkin BAP içeren MS besin ortamı belirlenmiştir. Aronya eksplantında vitrifikasyonun başladığı besin ortamları ile birlikte "vitrifikasyon süresi (T_v)" gözlenmiştir.

2. aşamada vitrifiye olan aronya sürgünlerinin kurtarılması için VSP sürecine ilişkin BAP ve IBA içeren veya içermeyen MS besin ortamı belirlenmiştir. Vitrifikasyonu sonlandıran besin ortamları ile birlikte “iyileşme süresi (T_s)” gözlenmiştir.

3. aşamada VOP sürecinde vitrifiye olan aronya sürgünleri ile VSP besin ortamında vitrifikasyondan kurtularak sağlığına kavuşan normal aronya sürgünleri hazır topraklı kâğıt saksılara (Agripot - paperpot) aktarılarak iklimlendirme aşamasına alınmıştır. Bu süreçte hayatta kalma oranı olarak “yaşam yüzdeliği (Y_Y)” takip edilmiştir. Ardından kekila torfu bulunan saksılara alınarak dış koşullara adaptasyonu incelenmiştir.

Böylece bu tez çalışmasında endüstriyel boyutta *in vitro* koşullarda üretim yapan veya yapmayı düşünen üreticiler için Aronya üzerinden vitrifikasyon sorununun ortaya çıkarılması ve çözümüne dönük birtakım yaklaşımlar ortaya konulmuş, çözüm önerileri sergilenmiştir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1 Genel Bilgiler

2.1.1 Aronyanın sınıflandırılması ve tarihçesi

Aronya, *Rosaceae* familyasında bulunan *Aronia* cinsi içerisinde yer alan bir bitkidir. Siyah Aronya (black chokeberry) *Aronia melanocarpa* (Michx) Elliot, mor aronya (purple chokeberry) *Aronia prunifolia* (Marsh) ve kırmızı aronya (red chokeberry) *Aronia arbutifolia* (L.) Elliot olmak üzere *Aronia* cinsinin içerisinde üç tür bulunmaktadır (Šnebergrová vd., 2014). Fransız botanikçi Andre Michaux 1803 yılında siyah meyveli aronyayı *Mespilus arbutifolia* var. *melanocarpa* olarak tanımlamıştır (Walther ve Müller, 2012). Ivan V. Michurin, 1910 yılında Rusya’da Kuzey Amerika kökenli Aronya ile “Sorbus” ve “Mespilus” türlerini melezleyerek tatlı bir meyve türü geliştirilmeye çalışmıştır. Bu çalışma sonucunda “Likernaja” ve “Desertnaja” isimli iki çeşit elde edilmiştir (Walther ve Müller, 2012). Sonraki yıllarda bu çeşitler “*A. mitschurini*” isminde yeni bir hibrit tür olarak kabul edilmiştir (Poyraz Engin ve Boz, 2019). Günümüze kadar birçok kültür çalışması ile aronyanın farklı çeşitleri oluşturulmuştur. Bunlar; “Aron”, “Hugin”, “Nero”, “Viking” ve diğer çeşitleridir (Sidor ve Gramza-Michałowska, 2019).

2.1.2 Aronya türleri, özellikleri ve yayılış alanları

Aronia cinsinin doğal yayılış bölgesi Amerika Birleşik Devletleri’nin doğusunda kalan alanlardır. *A. arbutifolia*, *A. melanocarpa* ve *A. prunifolia* türleri *Aronia* cinsine aittirler (Poyraz Engin ve Boz, 2019). Aronya bitkilerinin türleri gövdelerine ve çiçek salkımlarının yapısına, yaprakların tüylülüklerine ve meyve renklerine bakılarak tespit edilebilmektedir (Brand, 2010; Poyraz Engin, 2020).

Aronia arbutifolia olarak bilinen kırmızı meyveli aronya, 1,8 ila 3 metreye kadar diğer iki türe göre daha dik ve uzayabilmektedir. Yaprakları ters yumurta şeklinde ve üst kısımları parlak yeşil renkte, alt kısımları ise gri renkte olup aynı zamanda tüylü yapraklara sahiptir. Sonbahar döneminde yapraklar kırmızı rengini almaktadır. *Aronia arbutifolia* türünün çiçeklenme dönemi Mayıs ayındadır ve çiçekler salkım şeklinde, beyaz renktedir. Meyvelerin olgunlaşma zamanı eylül ayının sonu ile ekim ayının başıdır. Aralık ayına kadar herhangi bir bozulmaya uğramadan meyveler bitki üzerinde kalabilmekte iken; çapları 0,60 – 0,65 cm’dir (Brand, 2010; Poyraz Engin, 2020). Bu türün doğal yayılış alanı; Newfoundland bölgesinden güneyde Florida’nın merkezine, batıda doğu Teksas’a kadar

uzanmaktadır (Hardin, 1973; Poyraz Engin, 2020). Bu türe ait bitkiler bataklıklarda, su kenarlarında, kayalık ve çok eğimi olan kısımlarda bulunmaktadır (Brand, 2010; Poyraz Engin, 2020).

Aronia prunifolia olan siyah-mor renkli aronyanın *Aronia arbutifolia* ve *Aronia melanocarpa* bitkilerinin melezi olduğu düşünülmektedir. *Aronia prunifolia* türünün yaprak ve gövdelerinin üzerindeki tüylülüğü diğer iki türün ortalaması olarak belirtilmiştir (Brand, 2010; Poyraz Engin, 2020).

Aronia melanocarpa siyah meyveli aronyanın uzunluğu 1,2 – 2,4 metreye kadar çıkabilmektedir. Gövde ve yapraklarında tüy çok az bulunmakta ya da hiç bulunmamaktadır. Sahip olduğu koyu yeşil yaprakları sonbaharda sarı, turuncu ve kırmızı rengini almaktadır. Mayıs ayında çiçeklenme dönemine girmektedir ve çiçekleri beyaz renktedir. Meyvelerinin çapı diğer iki türe göre daha iri olup; 0,8 – 1,3 cm'dir. Ağustos ayı itibarıyla meyvelerinin hepsi olgunlaşır ve yeterli sulama olmadığında kurumaya başlamaktadır (Brand 2010; Engin, 2020). Kuzey Amerika'ya ve Kanada'ya özgü olan *Aronia melanocarpa*'nın doğal yayılış gösterdiği bölge, Newfoundland'den güneydeki Georgia ve Alabama'nın kuzeyine, kuzeydeki Minnesota ve Ontario'nun güneyine doğru olduğu bilinmektedir (Hardin, 1973). *Aronia melanocarpa*'nın Viking ve Nero çeşitleri meyve üretiminde oldukça popüler olan çeşitleridir (McKay, 2001). Bu türün doğal alanları büyük göller bölgesi, apalaş dağlarının yüksek kesimleridir (Poyraz Engin, 2020).

2.1.3 Bitki doku kültürü, mikroçoğaltım ve vitrifikasyon sorunu

İnsanoğlu geçmişten günümüze kadar doğada bulunan bitkilerden daha fazla yararlanmak amacıyla pek çok metot geliştirmiştir. “Kültür” metotları olarak adlandırılan bu yöntemlerden bitki kültürleri de kendi içerisinde çeşitli sınıflandırmalara tabii tutulmuştur. Bitkilerin vejetatif ve jeneratif çoğaltılmasını içeren kültürler, su ve kum kültürleri ve bitki doku kültürleri bu kategoriler arasında yer almaktadır (Kocaçalışkan, 2017). Çeşitli besin elementleri, vitaminler, su, jel yapıcı maddeler ve çoğaltım protokolüne göre bitki büyüme düzenleyicileri içeren bitki doku kültürleri, genellikle ışık geçirimi olan şeffaf kapaklarla kapatılmakta, steril edilmekte ve steril olan bitki kısımlarının aseptik koşullarda kaplara aktarılması sürecini kapsamaktadır. Bitki doku kültürleri, büyük ölçekli bitki çoğaltımı için uygun bir teknolojidir ve hızlı çoğaltma süreci bitkinin küçük gövde kesimlerinden, çeşitli tomurcuklarından ve sınırlı bir ölçüde somatik embriyolardan, süspansiyon kültürlerindeki hücre kümelerinden ve biyoreaktörlerden elde edilen mikroçoğaltmaya dayanmaktadır. (Ahloowalia vd., 2004).

Bir bitkiden alınan çeşitli bitki kısımlarından tam bir bitki oluşturabilmek için aseptik koşullarda, yapay besin ortamlarında genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitki üretmek için kullanılan doku kültürü tekniğine “mikroçoğaltım” denir. Bu teknik ile kısa bir zaman diliminde, belirli bir alanda, mevsimden bağımsız ve hastalıklardan arı olarak çok sayıda bitki üretimi yapılabilir (Özkaynak ve Samancı, 2016). Bir bitki çoğaltımında herhangi bir *in vitro* üretim protokolü belirlemek için çoğaltılacak bitki materyaline uygun doku kültürü şartlarını belirlemek ve bu yönde mikroçoğaltımı gerçekleştirmek önem arz etmektedir (Bürün, 2021). Bitki doku kültürleri, bir bitkinin herhangi bir yerinden alınan eksplant adı verilen küçük parçalardan başlatılır. Pratik olarak bir bitkinin tüm parçaları başarılı bir şekilde eksplant kaynağı olarak kullanılabilir. Uygulama gerçekleştirilirken, "eksplant" cerrahi olarak çıkarılmakta, yüzeyi sterilize edilmekte ve alt kültürle birçok kez çoğaltılarak ana kültürü başlatmak için bir besin ortamına yerleştirilmektedir (Ahloowalia vd., 2004).

Bitki *in vitro* koşullarda büyüme ve gelişimine devam ederken birçok çevresel faktör bitkinin kök bölgesini ve bitkinin vejetatif kısımlarını geliştiren besin ortamının üst çevrelerini etkilemektedir (Jeong vd., 1995; Kozai ve Smith, 1995). Bitkinin vejetatif kısımlarını etkileyen çevresel faktörler; ışık, karbondioksit ve oksijen konsantrasyonu, sıcaklık, bağıl nem, kimyasal ve biyolojik etmenler ile bitkinin kök bölgesindeki gelişimi etkileyen çevresel faktörler; iyon bileşenleri, organik bileşenler, pH ve biyolojik etmenler vb. olarak belirtilmektedir (Özkaynak ve Samancı, 2016).

Doku kültürü için hazırlanan besin ortamlarının en önemli girdisi bitki büyüme düzenleyicileridir (BBD). Bitkinin vejetasyon sürecinde birçok gelişmeyi teşvik etmekte ya da gelişmeyi engellemektedir. Bitkideki büyüme ve gelişmeyi hızlandıran bitki büyüme düzenleyicilerine “stimülatör,” geciktirerek durduran düzenleyicilere ise “retardant” denilmektedir (Babaoğlu vd., 2001). Bitkiler hücrelerarası iletişimi sağlamak için bitki büyüme düzenleyicilerini kendileri üretmektedirler. Bu maddeler doğal olarak bitkide sentezlenen, büyüme ve gelişme ile birlikte fizyolojik olayları kontrol eden, taşındıkları bitki kısımlarında etkin olabilen, çok az oranlarda kullanıldığında dahi etkisini gösterebilen organik moleküllerdir (Öktüren ve Sönmez, 2005). Doğal ve sentetik olmak üzere iki şekildedirler. Doğal olan maddeler bitkiler tarafından sentezlenirken, sentetik olan düzenleyiciler kimya sanayi tarafından geliştirilmektedir (Çetin, 2014). Bitki doku kültüründe bitki büyüme düzenleyicileri kök, sürgün, yumru oluşumu ve bitki uzamasını teşvik etmek için kullanılmaktadır (Kumlay ve Eryiğit, 2011). Bitki büyüme düzenleyicileri büyümeyi teşvik ediciler; oksin, gibberellinler ve sitokininler, engelleyici; absisik asit ve olgunlaştırıcı olarak etilen şeklinde gruplandırılmıştır (Algül vd., 2016). Bu üretim pekçok açıdan avantajlı olsa da kontaminasyon ve vitrifikasyon gibi temelde dikkat edilmesi gereken hususları barındırmaktadır. *In vitro* koşullardaki bitki doku kültürü laboratuvarlarının en

ciddi sorunlarından biri mikrobiyal kaynaklı kontaminasyondur. Bu kontaminasyon oranları yeterince kontrol edilmezse özellikle ticari laboratuvarlarının başarısızlığı ile sonuçlanabilmektedir (Niedz ve Bausher, 2002). Vitrifikasyon ise doku kültürü ile üretim yapan laboratuvarların ya da üretim tesislerde ürün kaybı ile sonuçlanabilecek en ciddi diğer bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Yeterince teknik bilgi ve deneyime sahip olmayan kişiler vitrifikasyonu bir problem olarak tespit etmede zorluklarla karşılaşabilir ve bu durumda önemli ölçüde maliyet getirerek, kazanç kaybına neden olabilmektedir. Bu nedenle bitki doku kültürü üretim, teknik bilgi, deneyime sahip veya onların gözetiminde nitelikli araştırmacılara ihtiyaç duyan bir yöntemdir.

2.2 Vitrifikasyon terimi ile ilgili literatür taraması

Vitrifikasyon kelimesi incelendiğinde Latince “camdan” anlamına gelen “vitrum” kelimesinden türediği ve 1590’lı yıllarda “ısı ve füzyonla cama veya camsı bir maddeye dönüştürmek” anlamına gelen geçişli fiil olan “vitrify” kelimesinin kullanıldığı görülmektedir. Aynı zamanda sıfat olarak “vitrifiable – camlaştırılabilir” isim olarak ise “vitrifikasyon – camlaşma” manasında da kullanımı mevcuttur (Merriam-Webster Dictionary, 2023).

Vitrifikasyon terimi bitki ve hayvan dokularında yapılacak işleme ve gözlenen bulgulara bağlı olarak farklı süreçleri açıklamak için kullanılabilmektedir. Kriyobiyojide ya da kriyoprezervasyonda; vitrifikasyon teriminin kullanımı 1961 yılına kadar dayanmaktadır (Debergh vd., 1992). Bir sıvının donmadan ve buz kristallerinin oluşumunun önüne geçilerek, aşırı soğutulmasından dolayı camsı bir görünüm kazanması kriyoprezervasyonda “vitrifikasyon” olarak tanımlanmaktadır. (Chang vd. 2008; Şaylan, 2011). Bu terim; canlı organizmanın hücreleri, dokuları ve organları düşük sıcaklıklar uygulanarak hücre içerisinde tamamen camsı bir durum oluşturularak dondurulmasını ifade etmektedir. Bu işlem için çeşitli süreçlerin gerçekleştirilmesi ya da bazı solüsyonların kullanılması gerekmektedir (Bağış, 2003). Canlı organizmaların düşük sıcaklıklarda çeşitli özelliklerini inceleyen kriyobiyojide vitrifikasyona yönelik pekçok çalışma yapılmıştır. Bu doğrultuda vitrifikasyon tekniği fare embriyolarının dondurulmasında ilk kez kullanılmıştır (Çetin, 2004; Yaman ve Tırpan, 2019). Oosit kriyoprezervasyon yöntemine alternatif bir yöntem (Kumar, 2007; Güler, 2018) olarak kullanılan vitrifikasyon; fare (Lane ve Gardner, 2001; Güler, 2018), keçi (Begin vd., 2003; Güler, 2018), at (Güler, 2018) gibi hayvan hücrelerinde ve insan (Kuleshova vd., 1999; Liebermann ve Tucker, 2002; Yoon vd., 2000; Güler, 2018) oositlerin kriyoprezervasyonunda kullanılmıştır.

Bitki doku kültüründe ise, vitrifikasyon terimini ilk olarak Debergh ve ark. (1981) bitki materyallerinin suyla ıslatılmış, yarı saydam ve “camsı” olan

yaprakların morfolojik görünümü tanımlamak amacıyla kullanmışlardır. Bu durumla karşılaşan pek çok araştırmacı bu terimi benimsemiş ve çalışmalarında yer vermişlerdir. Ancak sonraki yıllarda Debergh vd., (1992) yaptıkları yeni bir çalışmada bitki doku kültüründe vitrifikasyon terimini tekrar ele almış, bu ifadenin kriyoprezervasyon ile karıştırıldığını, bitki doku kültüründe kullanılan bitkisel materyaller dondurularak saklanacaksa bu ifadenin tek uygun kullanımının kriyobiyolojideki kullanım olduğunu ifade etmişlerdir. Bu bağlamda bitki doku kültüründe görülen camsılaşma probleminde hücrelerde aşırı su içeriği olması sebebiyle “vitrifikasyon” terimi yerine “hiperhidrik” teriminin kullanılmasını tavsiye etmişlerdir.

Günümüzdeki çalışmalar incelendiğinde bitki doku kültürü ile üretimi ya da bilimsel çalışması yapılan bitkisel materyallerin özellikle yapraklarındaki camsılaşma şeklinde görülen fizyolojik bozuklukların tanımlanmasında hem “vitrifikasyon” hem de “hiperhidrik” terimlerinin kullanıldığı gözlenmiştir.

2.3 Bitki doku kültüründe görülen vitrifikasyona yönelik literatür taraması

Vitrifikasyon (camsılaşma), doku kültürü uygulamalarında karşılaşılan en önemli sorundur. Vitrikiye bitkilerin yaprakları ve gövdeleri sulu ve yarısaydam bir görünümle karakterizedir. Camsılaşan bitkilerin yaprakları genellikle koyu yeşil, kalın, kıvrılmış ve uzundur. Bu tür sürgünlerin gövdeleri de kalın ve kırılmalıdır. Vitrikiye bitkilerin çoğaltılmaya devam edilmesi ve köklendirilmesi (Rodríguez vd., 2012), kültür kabından toprağa aktarılması oldukça zordur (Bonga vd., 1992). Ayrıca enfeksiyonlara karşı daha hassastırlar, çabuk solarlar. Dolayısıyla bu problem özellikle ticari üretimde verim kaybına yol açabilmektedir (Joyce vd., 2003). Vitrifikasyonun bitkilerin temel dokularında zayıf palizat parankimasi ve kutikula tabakası ile birlikte yaprak, sap ve kök fizyolojisinin anormal gelişimine neden olduğu belirtilmiştir (Özkaynak ve Samancı, 2016).

Vitrifikasyonun arkasındaki mekanizmalar çeşitli çalışmalar ile açıklanmaya devam etmektedir (Marques, 2021). Yapılan araştırmalar ile agar, gelrit ve sükroz oranlarının artırılması, makro element karışımlarının değiştirilmesi ve kültür kabının havalandırılarak bağıl nemin düşürülmesi bitkilerde camsılaşma oranını azalttığı belirtilmiştir (Jeong vd., 1995; Hatipoğlu, 2000). Ziv ve ark. (1983), karanfil bitkisinde vitrifikasyon problemini çözmek için bitkileri birkaç gün sıvı kültürde büyüttükten sonra katı ortamda alt kültüre aktarmıştır. Bu yöntemin camsılaşmanın azaltılmasında etkili olduğunu belirtmişlerdir. Huang ve ark. (1995), yaptıkları araştırmada hem gelrite hem de agar ortamlarında vitrifikasyon gözlemlediklerini, jel konsantrasyonlarını artırarak camsılaşmayı en aza indirdiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte kültür kaplarındaki bağıl nemin de

vitrikasyonun oluşmasında etkili olduğunu belirten bazı çalışmalar da vardır (Kataeva vd., 1991; Pierik, 1997; Gribble, 1999; Sangwan ve Sangwan-Norreel, 2012).

Vitrikasyonu teşvik eden etmenler arasında bitki büyüme düzenleyicilerinin aşırı fazlalığı da önem arz etmektedir. Sitokinin konsantrasyonlarındaki artışın vitrikasyona sebep olan faktör olduğu bilinmektedir (Hussey, 1986). Örneğin; elma filizlerinde yapılan bir çalışmada vitrikiye bitkilerin i sitokinin içeriğinin normal filizlerden daha fazla olduğu ve bu durumun yüksek nem ile birlikte camsılaşmaya neden olduğu bildirilmiştir (Kataeva vd., 1991).

Yapılan bir çalışmada farklı agar konsantrasyonlarının karanfilde camsılaşmaya olan etkisi incelenmiştir. 30 g L⁻¹ sükroz varlığında agarın 6 g L⁻¹'den 12 g L⁻¹'ye çıkarılmasının vitrikasyonu düşürdüğü ancak bitkilerin büyümesini azalttığı rapor edilmiştir (Hakkaart ve Versluijs, 1983).

Potasyum (K⁺), magnezyum (Mg⁺⁺) ve jelleştirici madde konsantrasyonlarının vitrikasyon üzerindeki etkisini test etmek için 'York' ve 'Vermont Spur Delicious' elmalarının (*Malus domestica Borkh.*) sürgün uçları *in vitro* olarak kltrlenlen bir çalışmada azalan dozlarda K⁺, (20,05, 14,05 ve 8,05 mM) ve artan Mg⁺⁺ (1,5 ve 3,0 mM), 7,0 g.L⁻¹ Difco Bacto agar ve 1,0, 1,5 ve 2,0 g.L⁻¹ gelrite kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda en düşük K⁺ seviyesinde daha yüksek vitrikiye sürgün yüzdesi gözlenmiştir. Ayrıca 1,5 g L⁻¹ gelrite ile jelleştirilmiş besiyeri vitrikasyonu tetiklemeyen 7 g L⁻¹ Difco Bacto agar ile aynı belirgin jel sertliğini sunmasına rağmen, Gelrite sürekli olarak vitrikiye yapraklar ve gövdeler üretmiştir. Aynı zamanda gelrite, 'York' eşidinde vitrikasyonla birlikte sürgün uzamasını sağlarken; 'Vermont Spur Delicious' eşidinin sürgünlerinin uzamasına katkı sağlamamıştır. Bu durumun çeşit farklılığından kaynaklandığı yorumu getirilmiştir (Pasqualetto vd., 1988).

Dillen ve Buysens (1989), yaptıkları çalışmada *Gypsophila paniculata* FeSO₄ ve Na₂EDTA içermeyen MS ortamında 9 g L⁻¹ agar, 1 mg L⁻¹ tiamin, 1 mg L⁻¹ kinetin, 0,3 mg L⁻¹ IAA, 30 g L⁻¹ sükroz, 100 mg L⁻¹ inositol ve 35 mg L⁻¹ NaFeEDTA içeren besi ortamında kültüre alınmıştır. Vitrikiye olan bitkinin yaprakları mikroskobik incelemeye tabii tutulmuştur. Vitrikiye bitkiler normal bitkilerle kıyaslandığında epidermis tabakasının daha ince olduğu ve daha az stoma içerdiği raporlanmıştır. Aynı zamanda vitrikiye bitkilerin yaprakları açık yeşil, aşırı ve kırılğan bir kallus gelişimi gözlenirken; normal bitkilerin yaprakları daha koyu yeşil ve daha az kallus gelişimi söz konusu olmuştur.

Gürel ve Gürel (1998)'in döllenmemiş şeker pancarı olan *Beta vulgaris L.* bitkisinin yumurtalıklarından bitki rejenerasyonu yaptıkları bir çalışmada 1,0 mg L⁻¹ BAP ve 0,2 mg L⁻¹ NAA içeren MS besin ortamında hem kallus oluşumunun arttığını hem de sürgünlerde vitrikasyon oluştuğu belirtilmiştir.

Farklı agar markaları kullanılarak *in vitro* koşullarda *Ranunculus asiaticus* L. bitkisinin çoğaltılması üzerine yapılan çalışmada, yaş ve kuru ağırlık, sürgün rejenerasyonu, yaprak uzunluğu ve vitrifikasyon faktörleri ele alınmıştır. Bitkilerin besin ortamındaki jelleştiricilerin markasının sürgünlerin su tutma kapasitesini ve su içeriğini etkilediği belirtilmiştir (Beruto vd., 1999).

Pothomorphe umbellata bitkisinde mikroçoğaltım protokolü belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada farklı oranlarda MS, sükroz, phytigel, BA, NAA ve GA₃ bitki büyüme düzenleyicileri ve bunların kombinasyonlarının bulunduğu besin ortamları hazırlanmıştır. Çalışmada tüm denemelerde sürgün boylarının 0,5 cm'den daha az olduğu ve sürgünlerin vitrifiye olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca 0,5 mg L⁻¹ NAA + 0,5 mg L⁻¹ BA kombinasyonunun vitrifikasyonu daha az indüklediği için *P. umbellata*'nın organogenezi için uygun bir besin ortamı olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda çalışmada sürgün uzamasını teşvik etmesinin yanı sıra 10 g L⁻¹ sükroz + 0,5 mg L⁻¹ BA + 0,1 mg L⁻¹ GA₃ içeren ¼MS besin ortamının vitrifikasyonu baskıladığı gözlenmiştir (Pereira vd., 2000).

Lisianthus bitkisinin *in vitro* koşullarda çoğaltımına yönelik yapılan bir çalışmada farklı sitokinin (BA ve kinetin) ve oksin (IAA, IBA, NAA) konsantrasyonlarının sürgün oluşumu ve köklenme üzerine etkileri incelenmiştir. BA'nın 13,32 – 22,22, kinetin 13,94 – 23,23 mM konsantrasyonu düşük konsantrasyonlara göre daha yüksek sürgün oluşumunu desteklemiştir ancak BA ve kinetin oranlarının artması yüksek oranlarda hiperhidrik sürgünlerin oluşmasıyla sonuçlanmıştır. Bununla birlikte BA ve kinetin kendi içerisindeki vitrifikasyon oranlarına bakıldığında kinetine göre BA'nın daha yüksek hiperhidrik sürgünler oluşturduğu gözlenmiştir (Peak ve Hahn, 2000).

Eucalyptus tereticornis Smith bitkisinin mikroçoğaltımı için protokol geliştirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada bitki büyüme düzenleyicilerin ve besin ortamı bileşiminin rejenerasyon ve büyüme üzerine etkileri incelenmiştir. Besin ortamında kullanılan phytagelin vitrifikasyonu indüklediği, kalsiyum klorür dihidratın ise vitrifikasyonu azalttığı, sürgün uzamasını indüklediği gözlenmiştir (Sharma vd., 2000).

Pyrus pyrifolia N. ('Hosui' ve 'Kosui')'nın *in vitro* çoğaltımında sitokinin türü ve konsantrasyonlarının sürgün proliferasyonu ve hiperhidrisite üzerindeki etkilerini incelemek için yapılan bir çalışmada, sürgünler 0,5 µM 3-indol-bütirik asit, %3 sorbitol, %0,8 agar, 0,44, 4,40, 11,0 and 44,0 µM konsantrasyonlarında BAP ve kinetin, N-(2-kloro-4-piridil)-N9-fenilüre (CPPU), 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-yl) üre (TDZ) içeren odunsu bitki ortamında kültüre alınmıştır. Her iki çeşitte de en yüksek sürgün sayısı, 11,0 µM ve 4,4 µM BAP'da gözlenmiştir. TDZ ve CPPU, kültür eksplantlarında BAP ve kinetinden daha fazla hiperhidrisiteye neden olduğu, 'Kosui', 'Hosui' ile karşılaştırıldığında hiperhidrisiteye daha duyarlı olduğu gözlenmiştir (Kadota ve Niimi, 2003).

Araştırmacıların *Origanum sipyleum* L. ile yapmış oldukları *in vitro* mikroçoğaltım çalışmasında, CaCl_2 içeren MS ortamına $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP ilave ederek apikal tip eksplantları kültür ortamına almışlardır. En iyi sürgün çoğaltımını ilk alt kültür olan beşinci hafta sonunda 3,7 adet/eksplant ile gözlemlemişlerdir. Eksplant başına sürgün sayısı en yüksek ikinci alt kültürde yani üç hafta sonrasında 7,8 adet olarak gözlemlemişlerdir. İkinci alt kültürün sonunda sürgünlerde bazı fizyolojik bozukluklar (hiperhidrisite gibi) da gözlemlediklerini belirtmişlerdir (Oluk ve Çakır, 2009; Doğan vd., 2022).

Kharrazi ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada bitki büyüme düzenleyicilerinin *in vitrodaki* iki karanfil çeşidinde sürgün çoğalması, vitrifikasyon ve köklenmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Karanfiller, farklı konsantrasyonlarda BAP ve kinetin, NAA, IBA ve 30 g L^{-1} sükroz ile 8 g L^{-1} agar içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Sürgün rejenerasyonu ve vitrifikasyonun karanfilin türünden, sitokinin çeşidinden ve konsantrasyonundan etkilendiği belirtilmiştir. BAP içeren ortamın kinetin içeren ortama göre daha fazla sürgün rejenerasyonuna ve vitrifikasyona neden olduğu gözlenmiştir. Karanfil çeşitlerinde normal sürgün sayısı elde etmek için daha düşük BAP konsantrasyonları (*Eskimo Mogr* için 1 mg L^{-1} ve *Innove Orange Bogr* için 2 mg L^{-1}) ve $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ NAA içeren MS besin ortamı kullanılması tavsiye edilmiştir.

2.4 Bitki doku kültürü yöntemiyle aronyanın mikroçoğaltımı ve vitrifikasyon bulgusuna yönelik literatür taraması

Aronia arbutifolia (kırmızı chokeberry) ve *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot (siyah chokeberry) mikroçoğaltım amacıyla; sürgün çoğaltımı için %3 sükroz, %0.65 sigma agar, 0.0, 0.4, 2.2, 4.4 ve $11.1 \mu\text{M}$ BA içeren MS ve WPM ortamlarına yerleştirilmiştir. Sürgün proliferasyonu, 8 haftalık büyümeden sonra değerlendirildi. Köklendirme deneyleri için, $4.9 \mu\text{M}$ indol-3-butirik asit içeren 15 ml yarı güçlü MS ortamına ayrı ayrı yerleştirildi. Her iki Aronya çeşidinin sürgün çoğaltımı ve köklendirmeleri başarıyla gerçekleştirilmiş olup, dış koşullara adaptasyonu kolaylıkla sağlandığı belirtilmiştir. Çalışmada vitrifikasyona yönelik herhangi bir bulgu rapor edilmemiştir (Brand ve Cullina, 1992).

Aronia melanocarpa'nın yedi farklı BAP ve NAA konsantrasyonlarında MS ortamında mikroçoğaltım yapılarak sürgün ve kallus kültürleri oluşturulmuştur. Bu kültürlerden elde edilen özlerin fenolik bileşikleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda sürgün ya da kalluslardaki bileşiklerin miktarlarının ve toplam miktarlarının sitokinin ve oksin konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Szopa ve Ekiert, 2014). Çalışmada vitrifikasyona yönelik herhangi bir bulgu rapor edilmemiştir.

Şuğan ve ark. (2017) *Melrom Chokeberry* çeşidinin *in vitro* koşullarda rejenerasyon ve çoğaltma kabiliyetini Nero çeşidine kıyaslamak amacıyla yürüttükleri çalışmada, klonal çoğaltma sürecini optimize ederek alt kültürdeki sürgünlerin sayısı ve uzunlukları üzerindeki etkisi incelemiştir. Bu çalışmada gentopin etkisinin *in vitro* çoğaltma son derece önemli olduğu gösterilmiştir. Nero çeşidi hücre proliferasyonu ve sürgün rejenerasyonunun daha yüksek potansiyelini ortaya koymuştur. Aynı zamanda oksin, sitokinin, giberellik asit oranı alt kültür sırasında uygun sürgün büyümesi için önemli olduğu belirtilmiştir. Çalışmada vitrifikasyona yönelik herhangi bir bulgu rapor edilmemiştir.

Aronyanın ticari önemi olan üç çeşidi (Eastland, Viking, Nero) için *in vitro* koşullarda klonal çoğaltma protokolü geliştirmek amacıyla yürütülen bir çalışmada; iki farklı çoğaltma ortamı kullanılmıştır. M1 olarak belirtilen MS ortamında bitki büyüme düzenleyicisi bulunmazken; M2 olarak kodlanan MS ortamına 0.7 mg L⁻¹ BAP ilave edilmiştir. Aynı zamanda R1 ve R2 olmak üzere iki farklı köklendirme ortamı hazırlanmıştır. R1 ortamında WPM + 1 mg L⁻¹ IBA; R2 ortamında ½ WPM + 3 mg L⁻¹ IBA kullanılmıştır. Çalışma sonucunda; tüm eksplantların sağlıklı sürgünler oluşturduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte en yüksek sürgün rejenerasyonunun Eastland çeşidinde ve M1 ortamında olduğu raporlanmıştır. Ayrıca tüm eksplantların R1 ve R2 köklendirme ortamlarında kök ürettiği de belirtilmiştir (Çelebi-Toprak ve Alan, 2018). Çalışmada vitrifikasyona yönelik herhangi bir bulgu rapor edilmemiştir.

Rusea ve ark. (2018), aronyanın siyah chokeberry çeşidi olan Nero'nun BAP, 2,4-D ve IBA'nın farklı konsantrasyonlarının sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma kapsamında Murashige ve Skoog (MS) ve Lee ve Fossard (LF) temel besin ortamı olarak kullanılmıştır. Her iki besin ortamında da BAP (2,5, 5,0 ve 10 mg L⁻¹), 2,4-D (0,25, 0,5 ve 1,0 mg L⁻¹) ve IBA (0,25, 0,5 ve 1,0 mg L⁻¹) bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda en yüksek kallus yüzdesi MS ortamında 2.5 mg L⁻¹ BAP, 0.25 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.25 mg L⁻¹ IBA kombinasyonlarında hem MS hem de LF ortamlarında en yüksek kallus yüzdesi 5 mg L⁻¹ BAP, 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0.5 mg L⁻¹ IBA'da olduğu raporlanmıştır. En iyi adventif sürgün ve eksplant başına sürgün sayısının en yüksek olduğu çoğaltma protokolün, 5 mg L⁻¹ BAP, 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D ve 0,5 mg L⁻¹ IBA ile desteklenmiş MS ortamında olduğu belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada vitrifikasyon bulgusuna yönelik bir gözlem rapor edilmemiştir.

Aronyadan homojen bitkiler ve yüksek sürgün üretimini sağlamak ve elde edilen bitkilerin virus, mantar ve bakteri gibi enfeksiyonlardan arı elde edilmesi amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, düşük maliyetle büyük ölçekli üretim için en iyi besin ortamı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada kullanılan eksplantlar MS ortamında 1.0 mg L⁻¹ GA₃, %3 sükröz ve 8 g L⁻¹ agar ile kültür ortamına aktarılmıştır. Daha sonra farklı BAP (0,0, 1,0, 2,0 ve 3,0 mg L⁻¹) ve IAA (0,0, 0,01, 0,02 mg L⁻¹) konsantrasyonlarını içeren besiyerlerinde kültüre bırakılmıştır.

Çalışma sonucunda en yüksek sürgün uzunluğu $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ IAA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ GA₃ ile elde edilmiştir. Eksplant başına sürgün sayısı en yüksek $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ IAA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ GA₃ şeklinde rapor edilmiştir. Kök sayısı olarak değerlendirildiğinde en yüksek köklenmenin MSkontrol ortamında olduğu, bununla birlikte $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ve $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA konsantrasyonunda köklenme için uygun şartlar sağladığı bildirilmiştir (Pırlak ve Almokar, 2018). Bu çalışmada vitrifikasyon bulgusuna yönelik herhangi bir veri paylaşılmamıştır.

Petrova ve ark. (2019), aronyanın farklı çeşitlerinin klonal çoğaltılmasına yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışma kapsamında aronyanın “Amit”, “Nero”, “Viking” “Hugin” ve “Brilliant” çeşitleri değerlendirilmiştir. Temel besin ortamı olarak MS 100 mg L^{-1} mezoinositol, 7 g L^{-1} agar ve vitamin kompleksi kullanılmış olup, 30 g L^{-1} sükroz, bitki büyüme düzenleyicileri olarak BAP, IAA, IBA ve GA₃ farklı konsantrasyonları tercih edilmiştir. Çalışma sonucunda aronyanın tüm çeşitlerini çoğaltmak için farklı seviyelerde BAP’ın kullanılması önerilmiştir. Buna göre; Brilliant, Nero ve Viking çeşitleri için $1,5 \text{ mg L}^{-1}$; Amit için 1 mg L^{-1} ve Hugin için $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BAP kullanımı tavsiye edilmekle birlikte maksimum BAP kullanımının $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ şeklinde optimize edilebileceği belirtilmiştir. Aronyanın farklı çeşitlerinin rizogenezi için oksin ve sitokin farklı konsantrasyonlarının kullanılması gerektiği gösterilmiştir. Buna göre "Nero" için $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IAA; "Parlak" ve "Viking" için $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA veya $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IAA; "Hugin" için 1 mg L^{-1} IBA veya 1 mg L^{-1} IAA; “Amit” çeşidi için $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ veya 1 mg L^{-1} IBA modifikasyonları kullanılabilir. Bu çalışmada vitrifikasyona yönelik herhangi bir bulgu belirtilmemiştir.

Aronyanın mikroçoğaltımında farklı kombinasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerinin eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve boğum sayısına olan etkisi incelenmiştir. Çalışma neticesinde en iyi sonuçların 1 mg L^{-1} BAP + $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ IBA + 1 mg L^{-1} GA₃ içeren MS besin ortamı olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda kök sayısı, kök uzunluğu ve köklenme oranı bakımından da $\frac{1}{2}$ MS + 1 mg L^{-1} IBA besin ortamının önemli olduğu belirtilmiştir (Polat ve Eskimez, 2022). Bu çalışmada vitrifikasyon bulgusuna dair bir veri paylaşılmamıştır.

Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ile bitkilerin *in vitro* koşullardaki fizyolojik bozukluklar arasında bağlantı olduğu bilinmesine rağmen büyüme düzenleyicilerinin etki mekanizması çalışılması gereken bir alandır (Kataeva vd., 1991). Aronyanın mikroçoğaltımına ilişkin çok sayıda çalışma yer almasına karşın vitrifikasyona yönelik bulguların belirtilmesi sınırlı kalmıştır. Bu tez çalışması konusunun oluşmasında iletişimde bulunduğumuz çeşitli doku kültürü firmaları (Xplant Biotech, İstanbul, Zerafet Çiçekçilik, Konya ve Göker Fidancılık, Yalova) vitrifikasyon sorununun ciddi bir problem olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle Zerafet Çiçekçilik 80.000 adet aronya klon kaybını sırf bu sebeple yaşamış olduklarını bildirmişlerdir (Esat Soydemir, şirket sahibi, kişisel görüşme, 18 Mayıs 2021) Dolayısıyla bu çalışma ile ticari ve ekonomik değere sahip, sağlık açısından

son derece faydalı ve ülkemiz ekonomisine katkı sağlaması yönünden çeşitli projeler ve işbirlikleri oluşturularak geliştirilen aronyanın *in vitro* üretiminde, fizyolojik bir bozukluk olan vitrifikasyon sorununu modellemek ve çözüm önerileri getirmek hem bilimsel literatüre hem de ticari kuruluşlara fayda oluşturacağı kanaatini taşımaktadır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez çalışmasında kullanılan sağlıklı Nero çeşidi Aronya (*Aronia melanocarpa*) klonları *in vitro* olarak “Xplant (İstanbul)” ve “Zerafet Çiçekçilik (Konya)” firmalarından plastik şeffaf kapaklı 200 ml’lik cam kavanozlarda steril olarak temin edilmiştir. Aronya klonlarının sürgün uzunluğu ortalama 1,5 - 2 cm’dir. Kavanozlarda kontaminasyon ve vitrifikasyon bulunmamakla birlikte bitkilerin yaprakları çoğunlukla yeşil ve sağlıklıdır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan aronya klonları

Bu çalışmada *in vitro* koşullarda vitrifikasyon oluşturma ve vitrifikasyon sonlandırma protokollerinde kullanılan besin ortamı MS, sükroz, gelrite, sitokinin (BAP) ve oksin (IBA) modifikasyonlarından oluşmaktadır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Vitrifikasyon Oluşturma Protokolü (VOP)

Aronya klonları 1,0 – 1,5 cm uzunluğunda olacak şekilde yapraklı gövde eksplantları şeklinde farklı BAP ve farklı sükroz konsantrasyonları içeren MS ve gelrite bulunan besin ortamlarında “Vitrifikasyon Oluşturma Protokolü (VOP)”ne alınmıştır. Bu protokolde amaç; eksplantları vitrifiye ederek T_v süresini belirlemektir. T_v süresi; BAP ve sükrozun farklı konsantrasyonlarına maruz kalan eksplantların kaçınıcı günde vitrifikasyona başladığını belirtmektedir. Çalışmada besin ortamında bulunan bir adet eksplantta vitrifikasyonun başlaması T_v süresinin de başlangıcı olarak kabul edilmiştir.

VOP'un her bir deney tasarımımda dört farklı sükröz konsantrasyonu (0 g L^{-1} , 10 g L^{-1} , 20 g L^{-1} ve 30 g L^{-1}) ve beş farklı BAP konsantrasyonu belirlenmiştir (0 mg L^{-1} , $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 1 mg L^{-1} , $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ ve 5 mg L^{-1}). Her bir deney üç tekrarlı ve her birinde üç eksplant olacak şekilde dokuz adet eksplant kullanılmıştır. Toplamda 180 adet eksplant vitrifikasyon oluşturma protokolüne alınmıştır. Hazırlanan besin ortamındaki $4,4 \text{ g L}^{-1}$ MS ve $3,5 \text{ g L}^{-1}$ gelrite konsantrasyonlarına ek olarak Tablo 3.1'de verilen farklı sükröz ve BAP konsantrasyonları kullanılmıştır. Besin ortamı ve büyüme düzenleyicileri DUCHEFA firmasının ürünleridir.

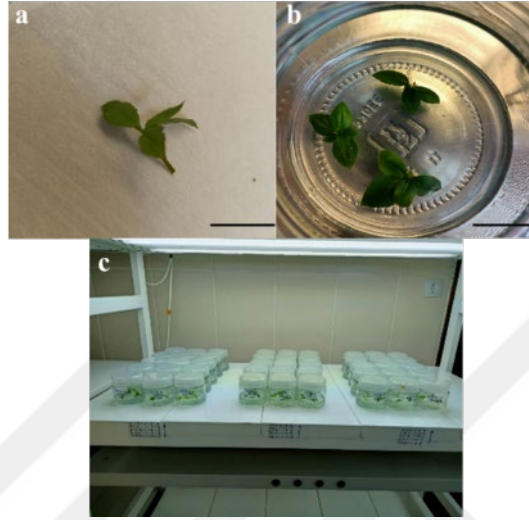
Tablo 3.1. Vitrifikasyon oluşturma protokolü (VOP) kullanılan besin ortamı içerikleri

VOP No.	Sükröz (g L^{-1})	BAP (mg L^{-1})	Gelrit (g L^{-1})	MS (g L^{-1})
Kontrol	0	0	3,5	4,4
TS10K	10	0	3,5	4,4
TS10A	10	0,5	3,5	4,4
TS10B	10	1	3,5	4,4
TS10C	10	2,5	3,5	4,4
TS10D	10	5	3,5	4,4
TS20K	20	0	3,5	4,4
TS20A	20	0,5	3,5	4,4
TS20B	20	1	3,5	4,4
TS20C	20	2,5	3,5	4,4
TS20D	20	5	3,5	4,4
TS30K	30	0	3,5	4,4
TS30A	30	0,5	3,5	4,4
TS30B	30	1	3,5	4,4
TS30C	30	2,5	3,5	4,4
TS30D	30	5	3,5	4,4

Doku kültürü sistemlerinde jel yapıcı madde olarak çoğunlukla agar kullanıldığı bilinmektedir. Ancak gelritin agara göre daha düşük konsantrasyonlarda jelleştiği (Bornman ve Vogelmann, 1984), agara göre daha üstün sürgün proliferasyonu ve köklenme sağladığı bununla birlikte de uygun kallus gelişimi ve ortam pH'sının daha stabil olma eğilimi gösterdiği çalışmalarda belirlenmiştir (Bonga vd., 1992; Huang, 1995). Bu nedenle bu tez çalışmasında jelleştirici madde olarak gelrite tercih edilmiştir.

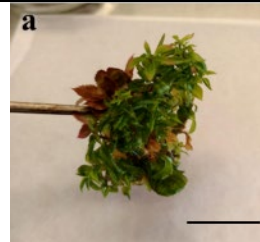
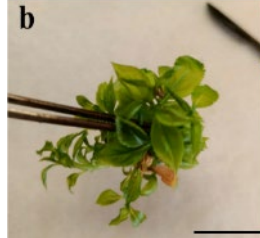
Hazırlanan besin ortamlarının pH değeri 5,6 – 5,8 olacak şekilde ayarlanarak çalışmada kullanılan tüm ekipmanlar ile birlikte $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ve 1,2 atm'de otoklavda 15 dakika steril edilmiştir (Marques, 2021). Eksplantlar, 40 ml steril besin ortamı içeren 330 ml'lik şeffaf plastik kapaklı cam kavanozlara (kavanoz başına üç eksplant) laminar flow kabin içerisinde aseptik olarak yerleştirilmiştir. Eksplantlar

yukarıda belirtilen VOP deney tasarımına göre yerleştirildikten sonra 3000 lüks florasan lamba altında 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot şartlarına alınmıştır (Şekil 3.2). Eksplantlar 65 gün boyunca VOP ortamında takip edilerek, vitrifikasyon başlama süresi (T_v), eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı (EBSS, adet), sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm), kök sayısı, kallus oluşturma yüzdesi ve ortalama kallus çapı (mm) ölçümleri kaydedilmiştir.



Şekil 3.2. Eksplantların VOP ortamına alınma aşaması (a, b) ve kültüre alınan eksplantların florasan lamba altına yerleştirilmesi (c). Bar uzunluğu sırasıyla 5 mm ve 7 mm'dir.

Tablo 3.2. Vitrifikasyon oluşturma protokolü sonunda vitrifiye olan yaprakların vitrifikasyon şiddetinin belirlenmesi

Vitrifikasyon Şiddeti	Vitrifikasyon Şiddet Tanımı	Örnek Fotoğraflar
Yüksek (çok)	Yapraklar tamamen içe doğru kıvrık, sulu/cam görünüm, rengi koyu yeşil ve sert (Fotoğraf a)	
Düşük (az)	Yapraklar içe doğru hafif kıvrık ya da kıvrık değil, saydam/ıslak görünümde, rengi açık yeşil (Fotoğraf b)	

Bar uzunluğu 7 mm'dir.

3.2.2 Vitrifikasyon Sonlandırma Protokolü (VSP)

Vitrifikasyon sonlandırma protokolü (VSP), VOP ortamında 65 gün boyunca takip edilen ve vitrifiye olan *in vitro* sürgünlerin T_v süresi sonunda vitrifikasyondan çıkarılması için oluşturulan bir protokoldür. Bu protokolde amaç; vitrifiye sürgünleri vitrifikasyondan kurtarmak ve sürgünlerin vitrifikasyondan kurtulma yani iyileşme zamanını (T_s süresini) belirlemektir.

VSP için dört farklı sükröz konsantrasyonu, sitokinin olarak iki farklı dozda BAP ve köklenmeyi sağlamak için oksin olarak IBA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır ve miktarları Tablo 3.3'te verilmiştir.

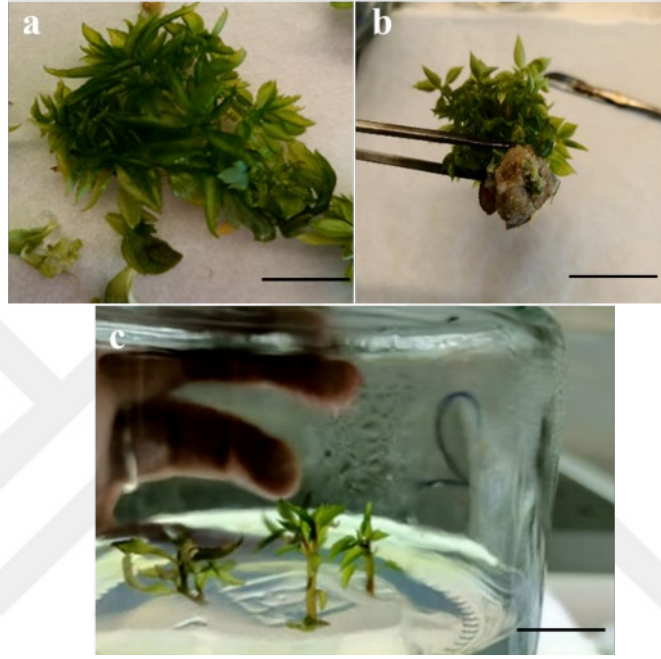
Tablo 3.3. Vitrifikasyon sonlandırma protokolü için kullanılan besin ortamı içerikleri

Sükröz (g L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	Gelrite (g L ⁻¹)	MS (g L ⁻¹)
10	0	0,1	3,5	4,4
20	0	0,1	3,5	4,4
30	0	0,1	3,5	4,4
10	0,5	0,1	3,5	4,4
20	0,5	0,1	3,5	4,4
30	0,5	0,1	3,5	4,4
0	0	0,1	3,5	4,4
0	0,5	0,1	3,5	4,4

Tablo 3.3'te görüldüğü gibi vitrifikasyon sonlandırma protokolünün her bir deney tasarımında dört farklı sükröz konsantrasyonu (0 g L⁻¹, 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ ve 30 g L⁻¹), iki farklı BAP konsantrasyonu (0 mg L⁻¹ ve 0,5 mg L⁻¹) ve bu protokolün tüm kültür ortamlarında 0,1 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonu belirlenerek gelrite içeren MS besin ortamı hazırlanmıştır. Hazırlanan besin ortamlarının pH'ı 5,6 – 5,8 olacak şekilde ayarlanarak çalışmada kullanılan tüm ekipmanlar ile birlikte VOP'da olduğu gibi 121 °C ve 1,2 atm basınç altında otoklavda 15 dakika steril edilmiştir (Marques, 2021). Ekipman ve besin ortamlarının sterilizasyon işleminden sonra malzemeler laminar flow kabin içeresine alınmıştır.

Vitrifiye olan sürgünlerin kallus bölgesi kesilmiştir ve bitki materyallerinin vitrifiye olan yapraklarına zarar vermeden gövdeler 1,0 - 1,5 cm uzunluğunda eksplantlar halinde kesilerek 40 ml steril besin ortamı içeren 330 ml'lik şeffaf plastik kapaklı cam kavanozlara her bir deney üç tekrarlı ve her birinde rastgele seçilmiş üç adet eksplant olacak şekilde dokuz adet eksplant laminar flow kabin içerisinde aseptik olarak yerleştirilmiştir (Şekil 3.4). Bu protokolün tüm besin ortamlarında 72 adet eksplant kullanılmıştır. Eksplantlar besin ortamlarına

yerleştirildikten sonra 3000 lüks florasan lamba altına 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot şartlarına alınmıştır. Eksplantlar 38 gün boyunca VSP ortamında takip edilerek, vitrifikasyondan kurtulma yani iyileşme süresi (T_s), vitrifikasyondan çıkma oranı (%), eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı (EBSS, adet), sürgünlerin ortalama uzunluğu (cm), kök sayısı, kallus oluşturma yüzdesi ve ortalama kallus çapı (mm) ölçümleri kaydedilmiştir.



Şekil 3.3. Vitrifiye sürgünler (a) ve kallus bölgesi (b), eksplantların VSP besin ortamına alınma aşaması (c). Bar uzunluğu sırasıyla 7 mm, 5 mm ve 12 mm'dir.

3.2.3 Mikroskobik incelemeler

Her iki protokolde sürgün durumuna gelen vitrifiye ve sağlıklı sürgünlerin yapraklarındaki stoma sayıları ve stomalarının en ve boy ölçümlerinin belirlenmesi amacıyla çalışmada mikroskobik incelemelere de yer verilmiştir. Bu aşamada *in vitro* koşullarındaki sürgünlerin yaprakları üç sınıflandırmaya tabi tutulmuştur. Bunlar; sağlıklı yapraklar (1), vitrifikasyon şiddeti yüksek yapraklar (2) ve düşük olan yapraklar (3) şeklindedir. Bu kısımda numuneler belirlenirken besin ortamlarına göre herhangi bir ayırım yapılmamış olup, yapraklar sınıflandırmadaki kriterlere göre rastgele, her sınıflandırmadan beş yaprak olacak şekilde seçilmiştir.

Çalışmadaki incelemeler için, LAS LEICA marka ICC50 HD model mikroskobun 20× objektifi kullanılmış ve LAS EZ v3.4 bilgisayar programında stoma sayımları ve stomaların en, boy ölçümleri yapılmıştır. Numuneler, yaprak

sapı sağ tarafta kalacak ve alt epidermis mikroskop objektifine bakacak şekilde ortadan enine kesilerek ikiye ayrılmıştır. Yaprak, mikroskop lamına yerleştirilmiş ve bir – iki damla su damlatılarak sabitlenmesi sağlanmış, ardından lamel ile üzeri kapatılmıştır. Daha sonra enine kesilerek ikiye ayrılan yaprakların alt epidermisinden inceleme yapılmıştır. Her bir yaprak çeşidinden beşer adet yaprak numunesi, her bir yaprağın orta damarının sağ ve sol tarafında kalan bölgeleri ve bu bölgelerin 40 farklı alanı incelenerek toplam 1200 adet veri elde edilmiştir. Mikroskopik incelemeye alınan yaprakların görselleri ve ölçümleri Şekil 3.5’te verilmiştir.



Şekil 3.4. Mikroskopik incelemeye alınan yapraklar; sağlıklı yapraklar (a) ve vitrifiye yapraklar (b). Bar uzunluğu 10 mm’dir.

3.2.4 İklimlendirme

Bu aşamada vitrifiye aronya sürgünleri ile sağlıklı aronya sürgünleri iklimlendirme aşamasına “yaşam yüzdeliği (Y_Y)” oranını belirlenmek amacıyla aktarılmıştır.

Rastgele seçilmiş köklü sağlıklı aronya sürgünlerinin kökleri suda titizlikle yıkanarak besin kalıntılarından arındırılmıştır. Daha sonra sürgünler önceden suda bekletilerek şişmesi sağlanan hazır gübresiz torflu kâğıt saksılara (Agripot marka *paperpot*) (70 mm × 90 mm) yerleştirilmiştir. Sürgünlerin yerleştirildiği paperpotlar şeffaf kapaklı plastik kültür kutularının içerisine konularak 5 ml su eklenmiştir ve kültür kutusunun kapağı tamamen kapatılmıştır. Paperpotlara alınan sürgünlerin uzunluğu ortalama 3 – 4 cm ve kök sayısı ortalama 6 – 7 adettir.

Benzer şekilde vitrifiye sürgünler ise, rastgele seçilerek *in vitro* ortamlarından çıkarılıp, kallus bölgesi kesilerek birbirlerinden ayrılmıştır. Sürgünler daha sonra 500 ppm olarak hazırlanan IBA’ya beş saniye daldırılmış ve önceden suda

bekletilerek şişmesi sağlanmış olan paperpotlara yerleştirilmiştir. Sürgün bulunan paperpotlar şeffaf kapaklı plastik kültür kutuların içerisine konularak 5 ml su eklenmiştir ve plastik kutunun kapağı sıkıca kapatılmıştır. Kültür kaplarına yerleştirilen sürgünlerin uzunluğu ortalama 3,5 – 4 cm'dir. Tüm kültür kapları 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyot şartlarında 3000 lüks ışık bulunan raflara yerleştirilmiştir. Kültür kaplarının iç sıcaklığı 26.7 °C ve kapların iç nemi ise %99 olarak ölçülmüştür.

Sürgünlerin bulunduğu plastik kültür kutuların kapakları 10 gün sonra köşelerden açılıp yıldız şeklinde üstlerine kapatılarak dış ortama alıştırma sürecine devam edilmiştir. Kültür kaplarının bulunduğu iklimlendirme odasının ortam sıcaklığı 26.2 °C ve odanın nemi %15 olarak ölçülmüştür.

Paperpot içerisindeki sağlıklı ve vitrifiye sürgünler dış koşullara adaptasyonlarının takip edilmesi için Kekila torfuna aktarılmıştır.

3.2.5 İstatistiksel veri analizi

Çalışmadaki veriler, PAS 4.03 (Hammer ve ark. 2001) İstatistik Programı, Tek yönlü ANOVA ile besin ortamlarının ölçülen parametrelere etkisi incelenmiştir. Ortalama değerleri *ad-hoc* test olarak Tukey's pairwise uygulanmıştır. Veriler Microsoft Excel üzerinden tutulmuş olup, Excel Tanımlayıcı İstatistik ve Excel Anova Tek Etken testleri de istatistiki olarak karşılaştırma maksadıyla incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Vitrifikasyon Oluşturma Protokolü (VOP)

Klonlardan elde edilen eksplantları vitrifiye etmek ve T_v süresini belirlemek amacıyla VOP besin ortamına alınan sağlıklı aronya eksplantları 65 gün boyunca rutin olarak takip edilerek sürgün sayısı/eksplant (adet), kallus oluşumu (%), kallus çapı (mm), sürgün uzunluğu (cm) ve kök sayısı parametreleri ile ilgili veriler elde edilmiştir. VOP uygulamasının sonunda 15 farklı besin ortamından yalnızca dokuz farklı besin ortamında vitrifikasyon meydana geldiği gözlenmiştir.

4.1.1 Vitrifikasyon oluşturma protokolü (VOP) MS besin ortamlarındaki morfolojik gözlemler

Vitrifikasyon oluşturma protokolüne alınan eksplantların farklı MS besin ortamlarındaki morfolojik gözlemleri; sürgün sayısı/eksplant, kallus oluşumu (%), kallus çapı (mm), sürgün uzunluğu (cm) ve kök sayısı verileri belirlenerek Tablo 4.1’de verilmiştir.

Sürgün sayısı/eksplant ($\bar{x}$):

Her bir besin ortamı için üç tekrarlı toplam dokuz eksplant ile yapılan çalışmada 65 günün sonunda elde edilen verilere göre; eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı 1 ile 10 adet aralığında olup, sükroz içermeyen MS besin kontrol ortamlarında sürgün artışı gözlenmemiştir. Bununla birlikte 10 g L⁻¹ sükroz ve BAP’sız MS besin ortamında sürgün sayısının 1 adet olduğu, eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısının ise en çok 10 adet ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında olduğu gözlenmiştir.

Kallus oluşumu (%) ve çapı (mm) ($\bar{x}$):

Vitrifikasyon oluşturma protokolündeki sürgünlerde sükrozsuz MS besin ortamları hariç tüm kültür ortamlarında kallus oluşumunun %100 olduğu gözlenmiştir. Vitrifikasyon oluşturma protokolündeki klonların farklı besin ortamlarındaki ortalama kallus çapları (mm) Tablo 4.1’de verilmiştir. Ortalama kallus çapı 2,8 – 12,7 mm aralığında olup, kallus çapının en düşük olduğu ortamın 2,8 mm ile 30 g L⁻¹ sükroz ve BAP’sız MS besin ortamı olduğu, ortalama kallus çapının en yüksek olduğu kültür ortamının ise 12,7 mm ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında olduğu gözlenmiştir. Sükroz içermeyen MS besin ortamlarında kallus oluşumu gözlenmediğinden kallus çapları 0 mm olarak belirtilmiştir.

Ortalama sürgün uzunluğu (cm) ($\bar{x}$) ve kök sayısı ($\bar{x}$):

Ortalama sürgün uzunluğu 1,3 – 3,8 cm aralığında olup, sürgün uzunluğunun en düşük olduğu ortamın 1,3 cm ile hem sükrozsuz ve BAP'sız hem de sükrozsuz ve 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamı olduğu, ortalama sürgün uzunluğunun en yüksek olduğu ortamın ise 3,8 cm ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 1 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında olduğu gözlenmiştir.

Ortalama kök sayıları 0 – 2,4 adet aralığında olup; kök sayısının en düşük olduğu ortam 1,3 adet ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 1 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında olduğu gözlenmiştir. Diğer ortamlarda ortalama kök sayıları sırasıyla; 1,8 adet ile 30 g L⁻¹ sükroz ve BAP'sız, 2 adet ile 20 g L⁻¹ sükroz ve BAP'sız MS ortamlarında gözlenmiştir. Ortalama kök sayısının en yüksek 2,4 adet ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS kültür ortamında olduğu gözlenmiştir. Diğer MS besin ortamlarında ise köklenme gözlenmemiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Vitrifikasyon oluşturma protokolünde (VOP) MS besin ortamlarındaki eksplantların morfolojik gözlemleri

MS Besin Ortamları (VOP)*	Sürgün sayısı/Eksplant ($\bar{x}$)	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Çapı (mm) ($\bar{x}$)	Sürgün uzunluğu (cm) ($\bar{x}$)	Kök sayısı ($\bar{x}$)
0 sükroz + 0 BAP	0±0,0	0	0±0,0	1,3±0,1 ^c	0±0,0
0 sükroz + 0,5 BAP	0±0,0	0	0±0,0	1,3±0,1 ^c	0±0,0
10 sükroz + 0 BAP	1,0±0,0 ^g	100	4,0±0,0 ^g	2,3±0,1 ^d	0±0,0
10 sükroz + 0,5 BAP	4,7±0,2 ^e	100	7,3±0,4 ^c	2,7±0,1 ^c	0±0,0
10 sükroz + 1 BAP	5,0±0,0 ^d	100	8,3±0,2 ^d	2,7±0,1 ^c	0±0,0
10 sükroz + 2,5 BAP	4,3±0,3 ^f	100	9,0±0,0 ^c	2,0±0,1 ^c	0±0,0
10 sükroz + 5 BAP	4,0±0,0 ^f	100	10,0±0,0 ^b	2,2±0,0 ^d	0±0,0
20 sükroz + 0 BAP	0,7±0,3 ^{gh}	100	3,4±0,4 ^g	2,5±0,1 ^c	2,0±1,2 ^a
20 sükroz + 0,5 BAP	5,0±0,0 ^d	100	6,3±0,9 ^f	3,3±0,2 ^b	0±0,0
20 sükroz + 1 BAP	8,2±2,1 ^{ab}	100	7,0±0,3 ^c	2,5±0,1 ^c	0±0,0
20 sükroz + 2,5 BAP	5,0±0,0 ^d	100	10,2±0,2 ^b	3,4±0,3 ^b	0±0,0
20 sükroz + 5 BAP	5,8±0,5 ^c	100	11,2±0,1 ^a	2,3±0,1 ^d	0±0,0
30 sükroz + 0 BAP	0,3±0,2 ^h	100	2,8±0,2 ^h	2,6±0,1 ^c	1,8±1,3 ^{ab}
30 sükroz + 0,5 BAP	6,7±0,3 ^b	100	8,3±0,6 ^d	3,7±0,2 ^a	2,4±1,7 ^a
30 sükroz + 1 BAP	6,4±0,83 ^{bc}	100	11,6±0,7 ^a	3,8±0,1 ^a	1,3±0,9 ^b
30 sükroz + 2,5 BAP	4,2±0,7 ^{ef}	100	11,0±0,7 ^a	2,8±0,2 ^c	0±0,0
30 sükroz + 5 BAP	10,0±0,0 ^a	100	12,7±1,0 ^a	2,8±0,2 ^c	0±0,0

*Besin ortamlarındaki sükroz g L⁻¹, BAP mg L⁻¹ cinsindendir. Her kolondaki ortalama değerlerin üzerindeki benzer harfler Tukey's pairwise test 0,05<P'de istatistiki açıdan fark yoktur.

4.1.2 Besin ortamlarına göre vitrifikasyon bulguları ve Tv süreleri

Sağlıklı eksplantların vitrifiye edilmesi amacıyla modellenen vitrifikasyon oluşturma protokolü (VOP) sonucunda 15 farklı MS besin ortamından dokuz farklı MS besin ortamında bulunan sürgünlerde camsılaşma sorunu gözlenmiştir. Bu besin ortamlarında yer alan sürgünlerde vitrifikasyon başlama zamanları (Tv) ve vitrifikasyon oranları (%) bakımından farklılıklar olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2'de görüldüğu gibi VOP ortamındaki sürgünlerde ilk 20 gün vitrifikasyona bağlı hiçbir fizyolojik bozukluk görülmemiştir. Ancak 23. günde 30 g L⁻¹ sükroz 1 mg L⁻¹ BAP veya 2,5 mg L⁻¹ BAP veya 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamlarında vitrifikasyon oranı %11 olarak gözlenmiş; 20 g L⁻¹ sükroz 1 mg L⁻¹ BAP veya 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında ise vitrifikasyon oranının %22 olduğu belirlenmiştir.

Gözlemlerimizin 30. gününde bir öncekinden farklı olarak 10 g L⁻¹ veya 20 g L⁻¹ sükrozda 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında sırasıyla %11 ve %22 oranlarında camsılaşma başladığu görülmüştür. Yine 23. günden farklı olarak 30. günde 30 g L⁻¹ sükrozda 1 mg L⁻¹ BAP veya 2,5 mg L⁻¹ BAP veya 5 mg L⁻¹ BAP

içeren MS besin ortamlarında vitrikasyon oranının arttığı; diğer MS besin ortamlarında ise bu oranının değişmediği gözlenmiştir.

Gözlemlerin 38. gününde önceki kontrollerden farklı olarak 20 g L⁻¹ sükroz ve 2,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında %22 vitrifikasyon oranı ile camsılaşmanın başladığı gözlenmiştir. Aynı zamanda 30 g L⁻¹ sükroz ve 1 mg L⁻¹ BAP ile 20 g L⁻¹ sükroz ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamlarında vitrifikasyon oranı artarken; diğer MS besin ortamlarında bu oranının 30.günle aynı kaldığı gözlenmiştir. Sonraki 44. günde ise yeni bir kültür ortamında herhangi bir vitrifikasyon bulgusuna rastlanmamış olup, üç MS besin ortamının vitrifikasyon oranlarında artış olduğu gözlenmiştir. Diğer MS besin ortamlarındaki vitrifikasyon oranı 38. gün ile aynı kalmıştır. Bunu takiben 65. günde 30 g L⁻¹ sükroz ve 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında vitrifikasyon oranının %11 ile başladığı gözlenmiştir. Bazı kültür ortamlarındaki sürgünlerde görülen vitrifikasyon oranı artarken; bazı MS besin ortamlarındaki vitrifikasyon oranı da 44.gün ile aynı kalmıştır.

Atmışbeş günün sonunda Tablo 4.2’de gösterildiği gibi en yüksek vitrifikasyon oranı %77 ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında; en düşük vitrifikasyon oranı ise, %11 ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 0,5 mg L⁻¹ BAP’da gözlenmiştir.

Vitrifikasyon bulguları T_V zamanı olarak değerlendirildiğinde Tablo 4.2’de belirtildiği gibi şu şekilde gerçekleşmiştir;

1. T_V zamanı (23. gün): Sürgünlerde vitrifikasyonun gözlemlendiği ilk zamandır. Vitrifikasyonun ilk başladığı MS besin ortamları; 30 g L⁻¹ sükroz ve 1 mg L⁻¹ BAP veya 2,5 mg L⁻¹ BAP veya 5 mg.L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamlarında ve 20 g L⁻¹ sükroz ve 1 mg L⁻¹ BAP veya 5 mg L⁻¹ BAP’da gözlenmiştir.

2. T_V zamanı (30. gün): 1. T_V’nin başladığı kültür ortamlarından farklı olarak diğer MS besin ortamlarında yeni vitrifikasyonun gözlemlendiği ikinci zaman dilimidir. 2. T_V’nin başladığı MS besin ortamı; 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren 10 g L⁻¹ ve 20 g L⁻¹ sükrozdur.

3. T_V zamanı (38. gün): İlk iki T_V zamanının başladığı kültür ortamlarından farklı olarak diğer MS besin ortamında yeni vitrifikasyonun gözlemlendiği üçüncü zaman dilimidir. 3. T_V’nin başladığı MS besin ortamı; 20 g L⁻¹ sükroz ve 2,5 mg L⁻¹ BAP’dır.

4. T_V zamanı (44. gün): Bu kontrol zamanında yeni bir vitrifikasyon bulgusu gözlenmemiştir. Önceki T_V zamanlarında başlayan vitrifikasyonların oranları artmış ya da aynı kalmıştır.

5. T_V zamanı (65. gün): İlk dört T_V zamanının başladığı kültür ortamlarından farklı olarak 30 g L⁻¹ süktroz ve 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında vitrifikasyonun başladığı beşinci zaman dilimidir.

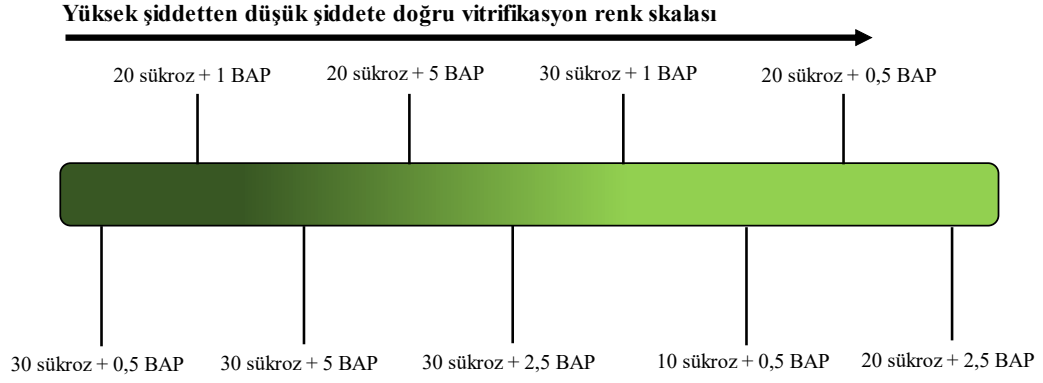
Tablo 4.2. Sürgünlerin vitrifiye oldukları MS besin ortamları, T_V süreleri ve vitrifikasyon oranları (%)

MS Besin Ortamları*	İlk 20 gün	23.gün 1.T _V	30.gün 2.T _V	38.gün 3.T _V	44.gün 4.T _V	65.gün 5.T _V
20 süktroz + 1 BAP	0	%22	%22	%22	%22	%22
30 süktroz + 1 BAP	0	%11	%33	%44	%55	%55
30 süktroz + 2,5 BAP	0	%11	%22	%22	%22	%33
30 süktroz + 5 BAP	0	%11	%22	%22	%44	%77
20 süktroz + 0,5 BAP	0	0	%22	%22	%22	%22
10 süktroz + 0,5 BAP	0	0	%11	%11	%11	%22
20 süktroz + 2,5 BAP	0	0	0	%22	%22	%22
20 süktroz + 5 BAP	0	%22	%22	%33	%55	%66
30 süktroz + 0,5 BAP	0	0	0	0	0	%11

*Besin ortamlarında kullanılan süktroz g L⁻¹, BAP mg L⁻¹ cinsindendir.

4.1.2.1 Vitrifiye sürgünlerin ortalama vitrifikasyon şiddeti

Vitrifikasyon görülen sürgünlerin 65 gün sonunda yapraklarındaki vitrifikasyonun şiddeti gözleme dayalı olarak ölçülmüştür. Tamamen içe doğru kıvrık, sulu ya da cam görünümüne sahip, genellikle rengi koyu yeşil ve dokunulduğunda sertlik hissiyatı veren yapraklar için yüksek vitrifikasyon şiddedi; içe doğru hafif kıvrık ya da kıvrık olmayan, saydam/ıslak görünümünde ve genellikle rengi açık yeşil olan yapraklar için düşük vitrifikasyon şiddedi tanımı yapılmıştır. Bu tanımlamalara göre vitrifiye sürgünlerin şiddet seviyesine göre renk skalası hazırlanmıştır (Şekil 4.1). Renk skalasına göre en yüksek vitrifikasyon şiddeti 30 g L⁻¹ süktroz ve 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında; en düşük vitrifikasyon şiddeti ise 20 g L⁻¹ süktroz ve 2,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamlarında gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Vitrifikasyon şiddeti renk skalası, çalışmadaki gözlemlere dayanarak yazar tarafından hazırlanmıştır. Süzkroz g L⁻¹, BAP mg L⁻¹ cinsindendir.

Şekil 4.2’de yüksek ve düşük şiddete sahip vitrifiye sürgünlerin görselleri verilmiştir. Bu şekil incelendiğinde yüksek şiddetli vitrifiye sürgün yapraklarının cam gibi parlak, kıvrık ve koyu yeşil olduğu; düşük şiddetli vitrifiye eksplant yaprakların daha çok sulu/saydam görünümde, hafif kıvrık ya da düz ve genellikle açık yeşil olduğu gözlenmiştir.

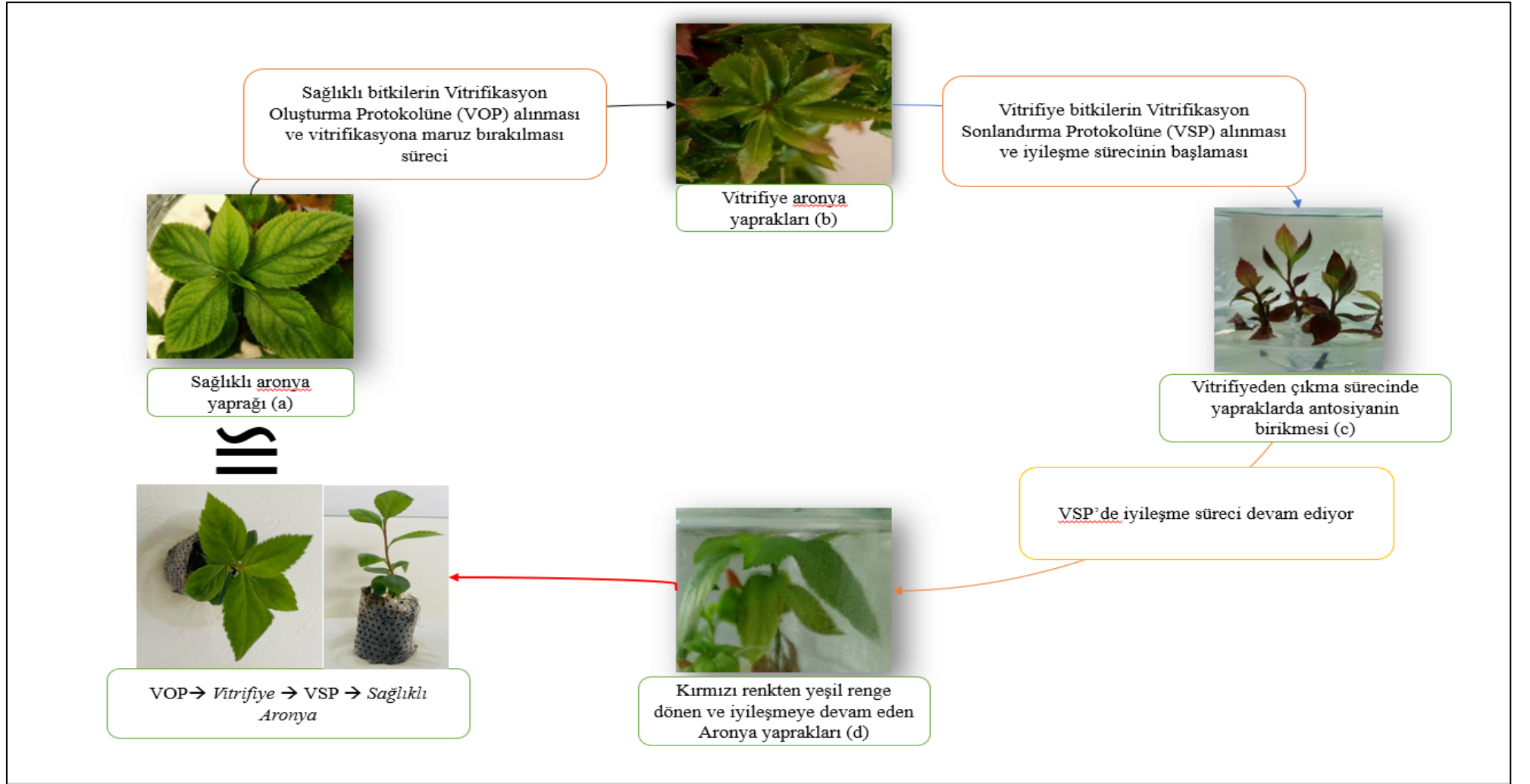


Şekil 4.2. Yüksek (a, b, c) ve düşük (d, e, f) şiddetli vitrifiye sürgünlerin görselleri. Bar uzunluğu 10 mm’dir.

4.2 Vitrifikasyon Sonlandırma Protokolü (VSP)

Vitrifikasyon sonlandırma protokolü (VSP), bir önceki protokol ile vitrifiye edilen sürgünleri vitrifikasyondan kurtararak iyileşme zamanını (T_s süresi) belirlemek amacıyla oluşturulmuştur. Bu protokolün T_s zamanları 31 gün boyunca takip edilerek ortalama sürgün sayısı/eksplant (adet), ortalama sürgün uzunluğu (cm), ortalama kallus oluşumu (%), ortalama kallus çapı (mm) ve ortalama kök sayısı verileri elde edilmiştir.

Şekil 4.3'de VOP ile vitrifikasyona maruz bırakılan eksplantların VSP ortamına aktarıldıktan sonraki iyileşme döngüsüne yer verilmiştir. Genel olarak vitrifiye olan yaprakların iyileşme sürecindeki ilk 20 gün antosiyanin birikmesi gözlenmiştir. Bu süreçte yaprakların özellikle uç kısımları kahverengi ve kırmızı rengini almıştır. 10 gün sonra T_s zamanı devam ederken yapraklardaki bu renk durumu giderek azalmıştır ve sürecin sonunda büyük oranda yeşil renge dönmüştür.



Şekil 4.3. Yaprakların vitrifikasyon ve iyileşme döngüsü (Çalışmadaki gözlemlere dayanarak yazar tarafından oluşturulmuştur).

4.2.1 Vitrifikasyon sonlandırma protokolü (VSP) MS besin ortamlarındaki morfolojik gözlemler

VSP deneyine alınan eksplantların farklı MS besin ortamlarındaki morfolojik gözlemleri; sürgün sayısı/eksplant, kallus oluşumu (%), kallus çapı (mm), sürgün uzunluğu (cm) ve kök sayısı verileri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Sürgün sayısı/eksplant ($\bar{x}$):

Her bir besin ortamı için üç tekrarlı toplam dokuz eksplant ile yapılan çalışmada 31 gün sonunda elde edilen verilere göre; eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı 1,3 – 5,0 adet aralığında olup, sükrozsuz MS besin kontrol ortamlarında sürgün sayısında artış gözlenmemiştir. Ortalama sürgün sayısı 1,3 adet ile en düşük 20 g L⁻¹ sükroz, BAP'sız ve IBA'lı MS besin ortamında iken; 10 g L⁻¹ sükroz, 0,5 mg L⁻¹ BAP ve IBA içeren MS besin ortamında en yüksek eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı 5,0 adettir.

Kallus oluşumu (%) ve çapı (mm) ($\bar{x}$):

Vitrifikasyon sonlandırma protokolündeki sürgünlerden sükroz içermeyen MS besin ortamları hariç tüm kültür ortamlarında kallus yüzdesinin %100 olduğu gözlenmiştir. Sürgünlerin farklı besin ortamlarındaki ortalama kallus çapları 5,0 – 10,0 mm aralığında olup, sükroz içermeyen MS besin ortamlarında kallus oluşumu gözlenmediğinden çap 0 mm olarak belirtilmiştir. Ortalama kallus çapı 5,0 mm ile en düşük BAP'sız ve IBA'lı 20 g L⁻¹ sükroz ve 30 g L⁻¹ sükroz içeren MS besin ortamlarında; 10,0 mm ile en yüksek 10 g L⁻¹ sükroz, 0,5 mg L⁻¹ BAP ve IBA içeren MS besin ortamında olduğu gözlenmiştir.

Sürgün uzunluğu (cm) ($\bar{x}$):

Bu protokoldeki bitkilerin ortalama sürgün uzunluğu 2,9 – 5,5 cm aralığında olup, sükroz içermeyen MS besin ortamlarındaki eksplantlarda nekrozize bağlı olarak herhangi bir iyileşme görülmediğinden uzunlukları 0 cm olarak belirtilmiştir. Ortalama sürgün uzunluğu en kısa 2,9 cm ile BAP'sız ve IBA'lı 20 g L⁻¹ sükroz içeren MS besin ortamında; 5,5 cm ile en uzun 30 g L⁻¹ sükroz, 0,5 mg L⁻¹ BAP ve IBA'da olduğu gözlenmiştir.

Kök sayısı ($\bar{x}$):

Bu protokoldeki sürgünlerin ortalama kök sayısı 2,0 – 10,2 adet aralığında olup, sükroz içermeyen MS besin ortamlarındaki eksplantlarda nekrozize bağlı olarak herhangi bir iyileşme ve köklenme görülmediğinden kök sayıları 0 adet olarak belirtilmiştir. Ortalama kök sayısının en düşük 2,0 adet ile 20 g L⁻¹ sükroz, 0,5 mg L⁻¹ BAP ve IBA içeren MS besin ortamında; 10,2 adet ile en yüksek 30 g L⁻¹ sükroz BAP'sız ve IBA'lı MS besin ortamında olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.3. Vitrifikasyon sonlandırma protokolü (VSP) MS besin ortamlarındaki morfolojik gözlemleri

MS Besin Ortamları*	Sürgün sayısı/Eksplant ($\bar{x}$)	Kallus Oluşumu (%)	Kallus Çapı ($\bar{x}$) (mm)	Sürgün uzunluğu ($\bar{x}$) (cm)	Kök sayısı ($\bar{x}$)
0 süktroz + 0 BAP + 0,1 IBA	0	0	0	0	0
0 süktroz + 0,5 BAP + 0,1 IBA	0	0	0	0	0
10 süktroz + 0 BAP + 0,1 IBA	1,8±0,1 ^d	%100	6,0±0,0 ^c	3,8±0,4 ^c	5,7±1,2 ^b
20 süktroz + 0 BAP + 0,1 IBA	1,3±0,2 ^c	%100	5,0±0, ^d	2,8±0,3 ^d	3,8±0,8 ^c
30 süktroz + 0 BAP + 0,1 IBA	1,5±0,2 ^{de}	%100	5,0±0, ^d	4,2±0,6 ^{bc}	10,2±0,7 ^a
10 süktroz + 0,5 BAP + 0,1 IBA	5,0±0,0 ^a	%100	10,0±0,0 ^a	4,1±0,5 ^{bc}	0,0±0,0
20 süktroz + 0,5 BAP + 0,1 IBA	4,1±0,3 ^b	%100	7,6±0,2 ^b	4,6±0,5 ^b	2,0±0,7 ^d
30 süktroz + 0,5 BAP + 0,1 IBA	3,1±0,1 ^c	%100	7,9±0,1 ^b	5,5±0,6 ^a	3,3±1,2 ^c

* Besin ortamlarındaki süktroz g L⁻¹, BAP ve IBA mg L⁻¹ cinsindendir. Her kolondaki ortalama değerlerin üzerindeki benzer harfler Tukey's pairwise test 0,05<P'de istatistiki açıdan fark yoktur.

4.2.2 Besin ortamlarına göre Ts süreleri, oranları ve VSP bulguları

Ts süreleri ve iyileşme oranları:

Vitrifikasyon sonlandırma protokolüne alınan eksplantların iyileşme oranları (Ts) aşağıda yer alan formül ile belirlenmiştir.

$$T_s \text{ oranı} = \frac{\text{vitriyeden çıkan sağlıklı yaprak sayısı}}{\text{kültür ortamındaki toplam yaprak sayısı}}$$

Bu protokol ile belirlenen sekiz farklı MS besin ortamının altısında bulunan vitriyeye sürgünlerin iyileşme sürecinin başladığı gözlenmiştir (Tablo 4.4). VSP ortamına alınan vitriyeye sürgünlerin iyileşme sürecine dair bulgular 13. gün başlamıştır. Burada (1.Ts) sürgünlerdeki yapraklar %96 ve %100 oranında BAP'sız ve IBA'lı 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ ve 30 g L⁻¹ süktroz içeren MS besin ortamlarında iyileşme göstermiştir. Bununla birlikte 13. günde BAP'lı ve IBA'lı 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ ve 30 g L⁻¹ süktroz içeren MS besin ortamlarında iyileşme oranları %26 ila %66 arasında farklılık göstermiştir. İkinci Ts zamanı olan 31. günde bir önceki incelemelere göre sürgünlerin iyileşme oranlarında artış olduğu gözlenmiştir. Buna göre; BAP'sız ve IBA'lı 10 g L⁻¹ ve 20 g L⁻¹ süktroz içeren MS besin ortamlarında düzelme oranı %98'e yükselmiştir. Bununla birlikte 31. günde BAP'lı ve IBA'lı 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ ve 30 g L⁻¹ süktroz içeren MS besin ortamlarında Ts oranları yükselerek %65 ila %94 arasında farklılık göstermiştir. Süktroz içermeyen, BAP'lı veya BAP'sız ve IBA'lı MS besin ortamlarındaki eksplantlarda nekroziz

gözleendiğinden iyileşme süreci başlamamış ve “nekroziz” olarak belirtilmiştir (Tablo 4.4).

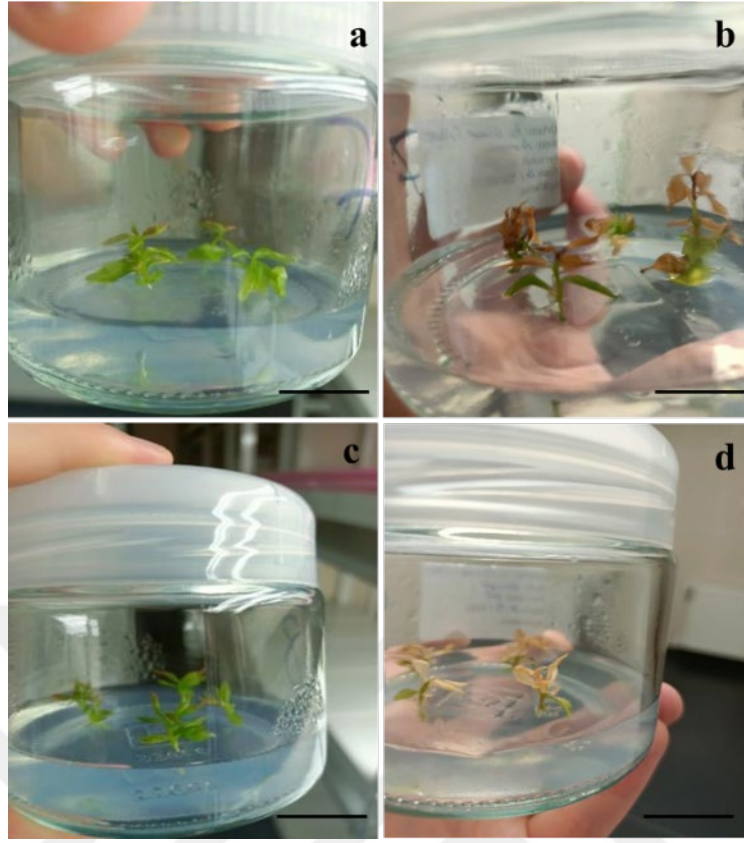
Tablo 4.4. Vitrifikasyon sonlandırma protokolü (VSP) MS besin ortamlarına göre sürgünlerin vitrifikasyon sonlanma süresi (Ts) ve oranı (%).

Besin Ortamları*	1.Ts Zamanı (Gün)	1.Ts Oranı (%)	2.Ts Zamanı (Gün)	2.Ts Oranı (%)
0 süktroz + 0 BAP + 0,1 IBA	Nekroziz	Nekroziz	Nekroziz	Nekroziz
0 süktroz + 0,5 BAP + 0,1 IBA	Nekroziz	Nekroziz	Nekroziz	Nekroziz
10 süktroz + 0 BAP + 0,1 IBA	13.gün	%96	31.gün	%98
20 süktroz + 0 BAP + 0,1 IBA	13.gün	%96	31.gün	%98
30 süktroz + 0 BAP + 0,1 IBA	13.gün	%100	31.gün	%100
10 süktroz + 0,5 BAP + 0,1 IBA	13.gün	%26,1	31.gün	%94,3
20 süktroz + 0,5 BAP + 0,1 IBA	13.gün	%48,4	31.gün	%65,8
30 süktroz + 0,5 BAP + 0,1 IBA	13.gün	%66,3	31.gün	%83,9

*Besin ortamlarındaki süktroz g L⁻¹, BAP ve IBA mg L⁻¹ cinsindendir.

Besin ortamlarına göre Vitrifikasyon Sonlandırma Protokolü (VSP) bulguları:

Tek başına 0,1 mg L⁻¹ IBA (Şekil 4.4a, b) ve süktrozsuz 0,5 mg L⁻¹ BAP ve IBA (Şekil 4.4c, d) içeren MS besin ortamlarındaki vitrifiye eksplantlarda nekroziz başladığı görülmüştür. Herhangi bir iyileşme bulgusu mevcut olmamakla birlikte, köklenme ve kallus oluşumu da gözlenmemiştir.



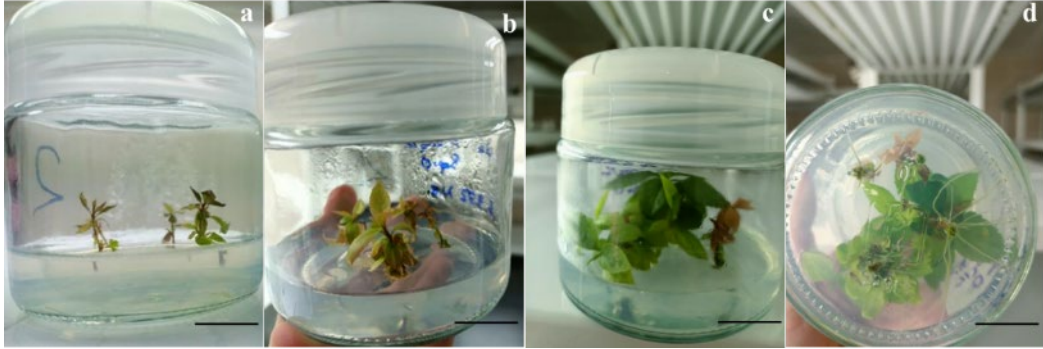
Şekil 4.4. Vitrifiye eksplantlarda (a, c) 13.gün başlayan nekroziz oluşumu (b, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.

Vitrifikasyon sonlandırma protokolünün 13. gününde 10 g L^{-1} süktroz BAP'sız ve IBA'lı MS besin ortamına alınan vitrifiye sürgünlerin (Şekil 4.5a) yapraklarının açılarak iyileşme sürecine başladığı ve köklenmenin gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.5b). Sürgünlerin bazı yapraklarında nekroziz olmakla birlikte tamamında nekroziz gözlenmemiştir. VSP'nin 31. gününde ise; sürgünlerin yapraklarının büyük oranda sağlıklı yaprak görünümüne kavuştuğu, kök sayısının ve sürgün uzunluğunun arttığı, kallus oluşumunun da olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.5c, d).



Şekil 4.5. Vitrikiye sürgünlerin BAP'sız ve IBA'lı 10 g L⁻¹ süktroz içeren kültür ortamındaki iyileşme olarak tabir ettiğimiz vitrifikasyondan çıkma süreci. Yaprakların açılması ve köklenmenin başlaması (a, b) ve kök sayısı, sürgün uzunluğu ve kallus oluşumunun artması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.

Benzer şekilde BAP'sız ve IBA'lı 20 g L⁻¹ süktroz içeren MS besin ortamına alınan vitrikiye sürgünlerin eksplantların yapraklarının yapısal form özelliğini geri kazandığı (Şekil 4.6a), köklenmenin ve kallus oluşumunun ise akabinde başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.6b). Bazı sürgünlerin birkaç yaprağında nekroziz olmakla birlikte sürgünün tamamında gözlenmemiştir. Nekroziz görülen sürgünlerin dip kısımlarından yeni sürgün oluşumu başlamıştır. 31. günde ise; bazı sürgünlerin tamamen sağlıklı yaprak görünümüne kavuştuğu, kök sayısının ve sürgün uzunluğunun arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.6c, d).



Şekil 4.6. Vitrikiye sürgünlerin BAP'sız ve IBA'lı 20 g L⁻¹ süktroz içeren kültür ortamındaki iyileşme süreci. Yaprakların açılması ve köklenmenin ve kallus oluşumunun başlaması (a, b), kök sayısı ve sürgün uzunluğunun artması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.

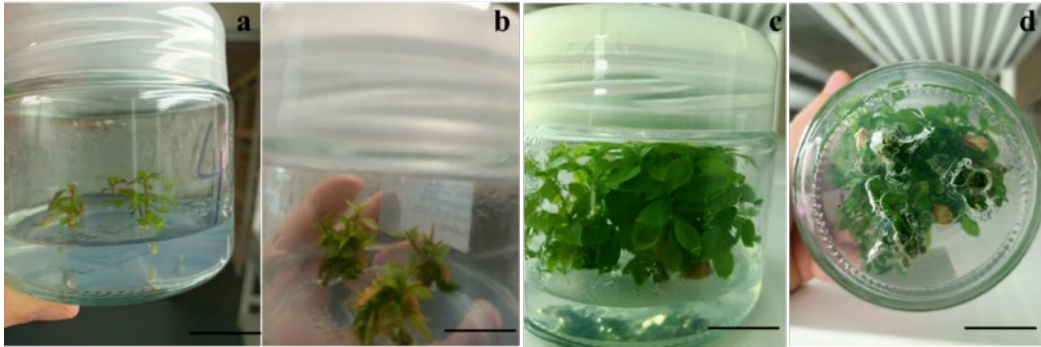
Bir diğer BAP'sız ve IBA'lı kültür ortamı olan 30 g L⁻¹ süktroz içeren MS besin ortamındaki vitrikiye sürgün yapraklarının benzer şekilde düzeldiği (Şekil 4.7a), köklenmenin ve kallus oluşumunun başladığı gözlenmiştir. Ayrıca yaprak sapı kısımları yeşil, yaprak uçları ise kırmızı renktedir (Şekil 4.7b). Devamında 31.

günde ise sürgünlerin büyük oranda yeşil ve sağlıklı yaprak görünümüne kavuştuğu, kök sayısının ve sürgün uzunluğunun arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.7c, d).



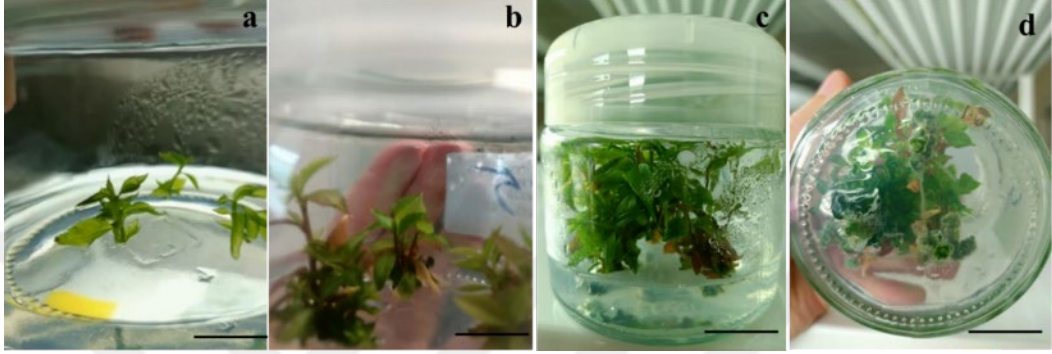
Şekil 4.7. Vitrikiye sürgünlerin BAP'sız ve IBA'lı 30 g L⁻¹ süktroz içeren kültür ortamındaki iyileşme süreci. Yaprakların açılması, köklenmenin ve kallus oluşumunun başlaması (a), renk geçişlerinin oluşması (b), kök sayısı ve sürgün uzunluğunun artması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.

Vitrifikasyon sonlandırma protokolünün 13. gününde BAP'lı ve IBA'lı 10 g L⁻¹ süktroz içeren MS besin ortamındaki bazı vitrikiye sürgünlerin yapraklarının iyileşme sürecine girerek açıldığı (Şekil 4.8a) ancak büyük oranda vitrifikasyonun diğer yapraklarda devam ettiği gözlenmiştir. Bununla birlikte bazı yapraklarda kırmızı renk mevcuttur. Kallus oluşumu ve kardeşleme başlamıştır (Şekil 4.8b). VSP'nin 31. gününde ise; büyük oranda sürgün yapraklarının sağlıklı bir görünümüne kavuştuğu, kallus çapının, sürgün uzunluğunun ve kardeşleme sayısının da arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.8c, d).



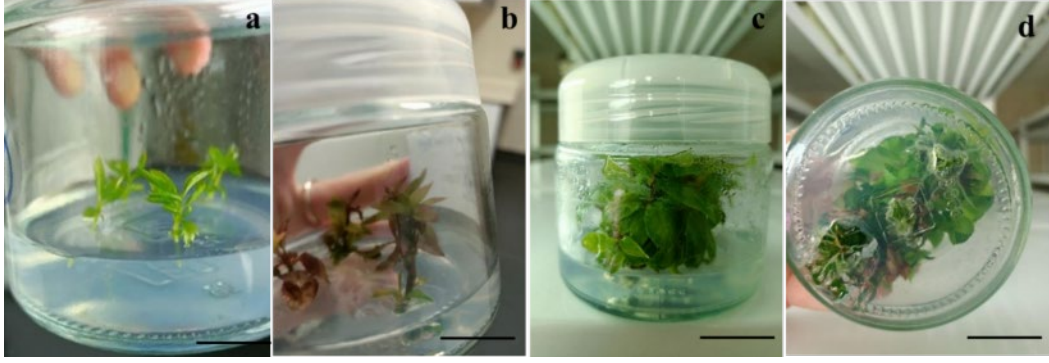
Şekil 4.8. Vitrikiye sürgünlerin BAP'lı ve IBA'lı 10 g L⁻¹ süktroz içeren kültür ortamındaki iyileşme süreci. Bazı vitrikiye yaprakların açılması (a), renk geçişlerinin, kallus oluşumunun ve kardeşlemenin başlaması (b) ve sağlıklı yaprak sayısının, kallus çapının, kardeşleme sayısının ve sürgün uzunluğunun artması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.

Benzer bir şekilde BAP'lı ve IBA'lı 20 g L⁻¹ süktroz içeren MS besin ortamındaki vitrifiye sürgünlerin yapraklarının iyileşme süreciyle birlikte normale döndüğü ancak büyük oranda vitrifikasyonun diğer yapraklarda devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.9a). Bununla birlikte bazı yapraklarda kırmızı renk, kardeşleme ve kallus oluşumu mevcuttur (Şekil 4.9b). VSP'nin 31. gününde ise; önceki incelemelere göre vitrifiye sürgünlerin iyileşme oranında artış görülmüş ve köklenme başlamıştır. Kallus çapı, sürgün uzunluğu ve kardeşleme sayısının da arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.9c, d).



Şekil 4.9. Vitrifiye sürgünlerin BAP'lı ve IBA'lı 20 g L⁻¹ süktroz içeren kültür ortamındaki iyileşme süreci. Bazı vitrifiye yaprakların açılması (a), renk geçişlerinin, kallus oluşumunun ve kardeşlemenin başlaması (b) ve sağlıklı sürgün yaprak, kardeşleme sayısının, kallus çapının ve sürgün uzunluğunun artması, köklenmenin başlaması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.

Bir diğer BAP'lı ve IBA'lı 30 g L⁻¹ süktroz içeren MS besin ortamındaki vitrifiye sürgün yapraklarının yarısından fazlasının açıldığı ancak diğer yapraklarda vitrifikasyonun devam ettiği gözlenmiştir. Bununla birlikte yapraklarda kırmızı renk geçişleri, kallus oluşumu ve kardeşleme başlamıştır (Şekil 4.10a, b). VSP'nin 31. gününde bir önceki incelemelere göre; iyileşme oranları artış göstermiş ve köklenme başlamıştır. Aynı zamanda kallus çapının, sürgün uzunluğunun ve kardeşleme sayısının da arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.10c, d).



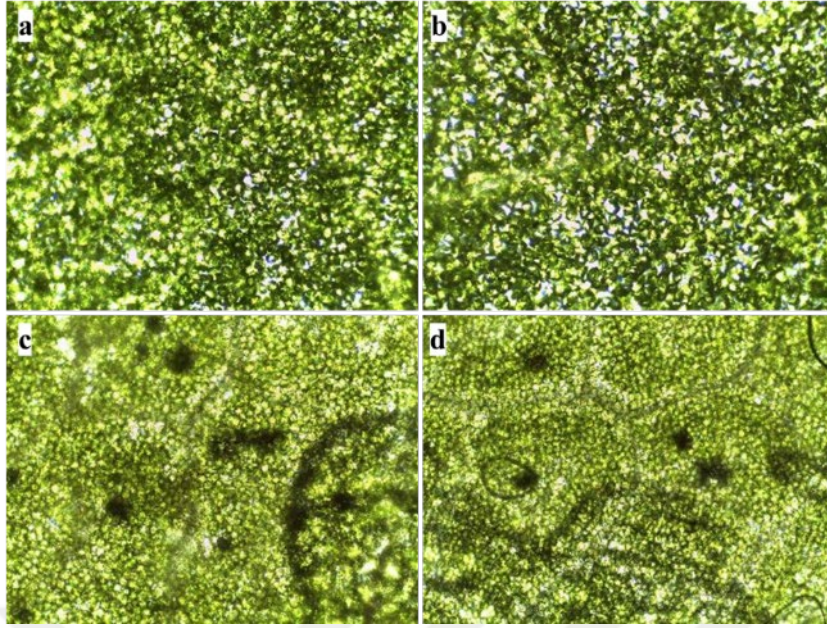
Şekil 4.10. Vitrifiye sürgünlerin BAP'lı ve IBA'lı 30 g L⁻¹ süktroz içeren kültür ortamındaki iyileşme süreci. Bazı vitrifiye yaprakların açılması, renk geçişlerinin, kallus oluşumunun ve kardeşlemenin başlaması (a, b) ve sağlıklı sürgün yaprak, kardeşleme sayısının, kallus çapının ve sürgün uzunluğunun artması, köklenmenin başlaması (c, d). Bar uzunluğu 10 mm'dir.

4.3 Mikroskobik incelemeler

Vitrifiye ile sağlıklı sürgünlerin yapraklarındaki stoma sayıları ve stomalarının en, boy ölçümleri için LAS LEICA marka ICC50 HD model mikroskopla çalışılmıştır. Ölçümler, 22,6 µm² (2×10⁻⁵ mm²) birim alanda 20× objektifle gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı, vitrifikasyon yüksek ve vitrifikasyon düşük olan yaprakların ölçümleri ve görselleri LAS EZ v3.4 bilgisayar programında incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda gözlemlenen bulgular stoma sayıları ve stomaların en-boy ölçümleri şeklinde alt başlıklar halinde aşağıda verilmiştir;

Stoma sayıları;

Hem sağlıklı hem de vitrifiye yaprakların üst epidermisinde stoma bulunmadığından incelemeler alt epidermisden gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11 a, b, c, d). Mikroskobik gözlemler için materyal olarak kullanılan sağlıklı yaprakların boyu 1,5 – 2,0 cm, eni 0,8 – 1,0 cm aralığında olup; vitrifiye yaprak numunelerinin ise boyu 0,9 – 1,2 cm, eni 0,3 – 0,4 cm'dir.



Şekil 4.11. Sağlıklı yaprakların üst epidermis mikroskop görüntüsü (a, b), Vitrifiye yaprakların üst epidermis mikroskop görüntüsü (c, d). Şekillerde stoma görülmemiştir.

Elde edilen verilere göre; vitrifiye yaprakların sağlıklı yapraklara göre daha fazla stoma sayısına sahip olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı yapraklarda birim alanda ortalama 2,09 adet stoma var iken; yüksek vitrifikasyona sahip yaprakta ortalama 4,83 adet, düşük vitrifikasyona sahip yaprakta ise ortalama 3,68 adet stoma mevcuttur. İstatistiksel verilere göre; yaprak çeşitleri arasında anlamlı bir fark olmadığı ancak birim alana düşen stoma sayısının en fazla 12 ve 13 adet ile düşük ve yüksek vitrifiye yapraklarda olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı yapraklarda ise; birim alanda en yüksek ortalama 6 adet stoma sayısı elde edilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Mikroskopik incelemeye alınan yaprakların birim alandaki ($22,6 \mu\text{m}^2$ ($2 \times 10^{-5} \text{ mm}^2$) stoma verileri

Yaprak örneği	Stoma sayısı/Birim alan ($\bar{x}$)	N	Toplam Stoma Sayısı	En az stoma sayısı	En fazla stoma sayısı	P*
Sağlıklı yaprak (SY)	$2,09 \pm 0,05$	400	838	1	6	1,675
Yüksek vitrifikasyon (YV)	$4,83 \pm 0,10$	400	1932	1	13	
Düşük vitrifikasyon (DV)	$3,68 \pm 0,09$	400	1474	1	12	

*: $P \leq 0,05$ Excel tanımlayıcı istatistik ve Anova Tek Etken Testi kullanılmıştır.

Sağlıklı ve vitrifiye yapraklarının stomalarının açık olduğu görülmüştür. Sağlıklı yapraklarda stomalar daha dağınık bir yerleşim durumunda iken; vitrifiye yaprakların bekçi hücreleri ise birbirine nispeten bitişik yığılmışlardır (Şekil 4.12).

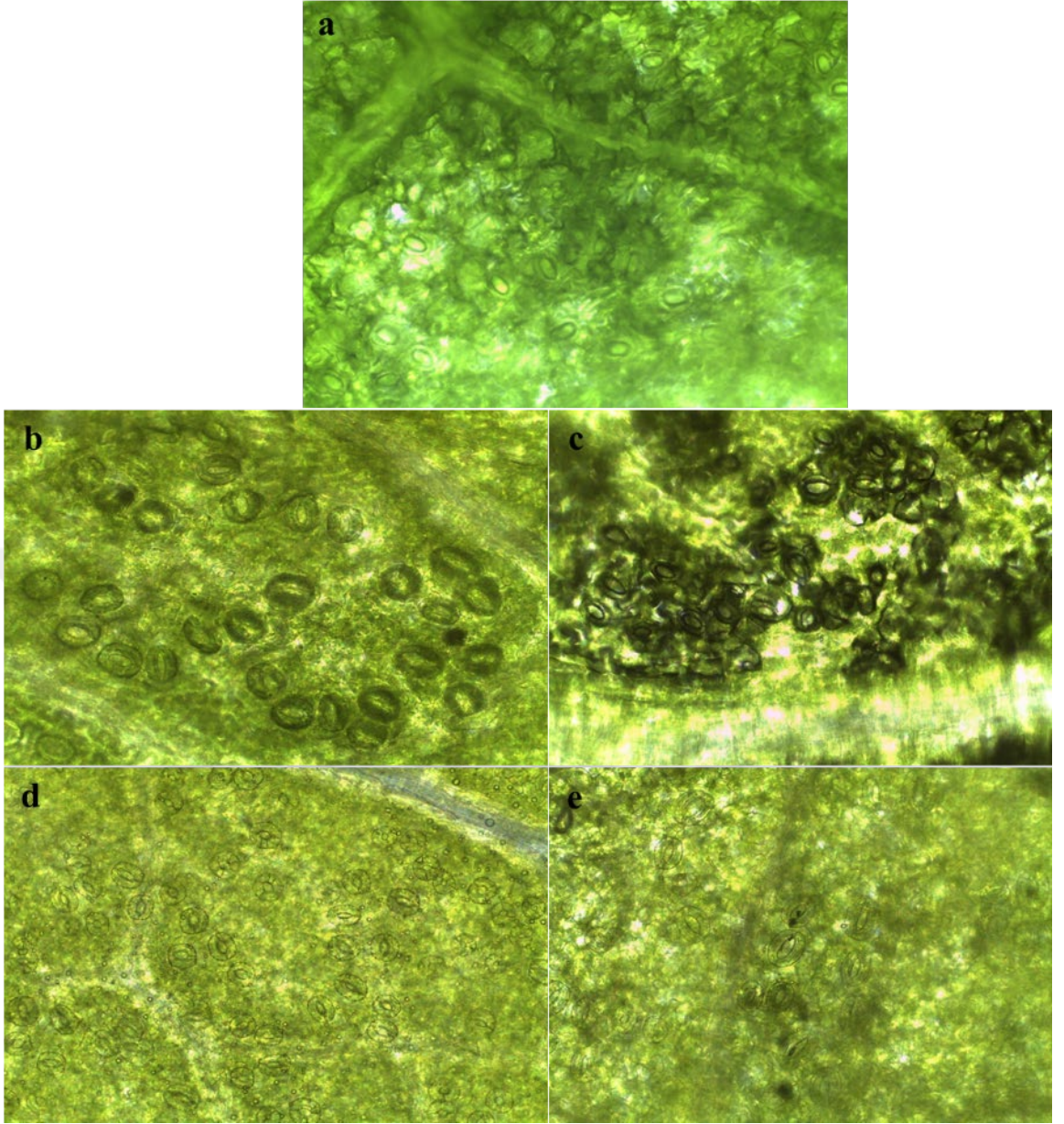
Stomaların en-boy ölçüleri ($\bar{x}$):

Sağlıklı ve vitrifiye (yüksek veya düşük oranlı) yapraklarda bulunan stomaların ortalama en ve boy ölçümleri Tablo 4.6'da verilmiştir. Yaprak çeşitlerinin aralarında stomalarının en-boy ölçümleri açısından anlamlı bir fark bulunmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte vitrifiye olan yaprakların stomalarının eni sağlıklı yaprakların stomalarına göre daha geniş, boylarının ise daha uzun olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.6. Mikroskopik incelemeye alınan yaprakların stoma ölçüleri

Yaprak örneği	N	Stoma eni (μm) ($\bar{x}$)	P_{stomaeni} *	Stoma boyu (μm) ($\bar{x}$)	$P_{\text{stomaboyu}}$ *
Sağlıklı yaprak (SY)	100	0,079 $\pm$ 0,001	1,245	0,116 $\pm$ 0,001	2,275
Yüksek vitrifikasyon (YV)	100	0,106 $\pm$ 0,001		0,137 $\pm$ 0,002	
Düşük vitrifikasyon (DV)	100	0,103 $\pm$ 0,002		0,123 $\pm$ 0,002	

*: $P \leq 0,05$ Excel tanımlayıcı istatistik ve Anova Tek Etken Testi kullanılmıştır.

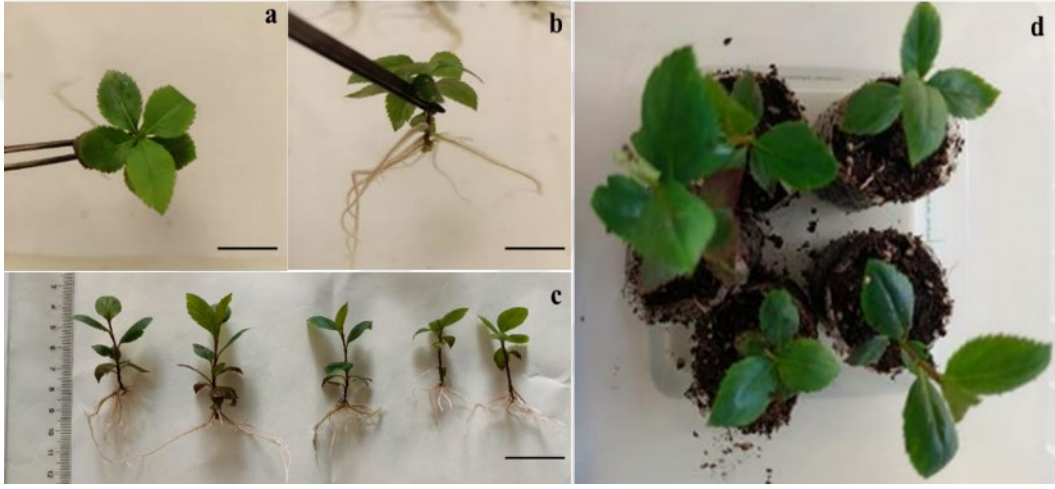


Şekil 4.12. Stomaların mikroskoptaki görüntüsü (20×); sağlıklı (a), yüksek vitrifiye (b, c) ve düşük vitrifiye yapraklardaki stomalar (d, e)

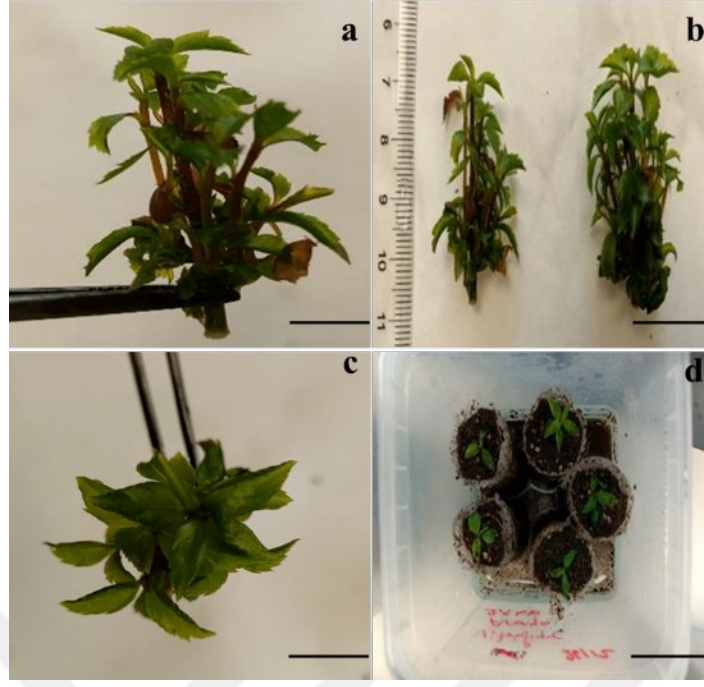
4.4 İklimlendirme aşaması

Vitrifiye ve köklü sağlıklı aronya sürgünlerinin iklimlendirme aşamasında paperpotlardaki yaşam yüzdeliğini (YY) belirlemek amacıyla yapılan çalışmanın bu kısmında gözlemlere dayalı olarak aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Bu aşamada vitrifikasyon oluşturma protokolünde (VOP) vitrifiye olan ve vitrifikasyon sonlandırma protokolüne (VSP) alındıktan sonra sağlıklı ve köklü olarak gelişen sürgünler kullanılmıştır (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14). Paperpotların alındığı kültür kutuların nem oranı %99, sıcaklığı ise 24 – 26 °C olarak ölçülmüştür.

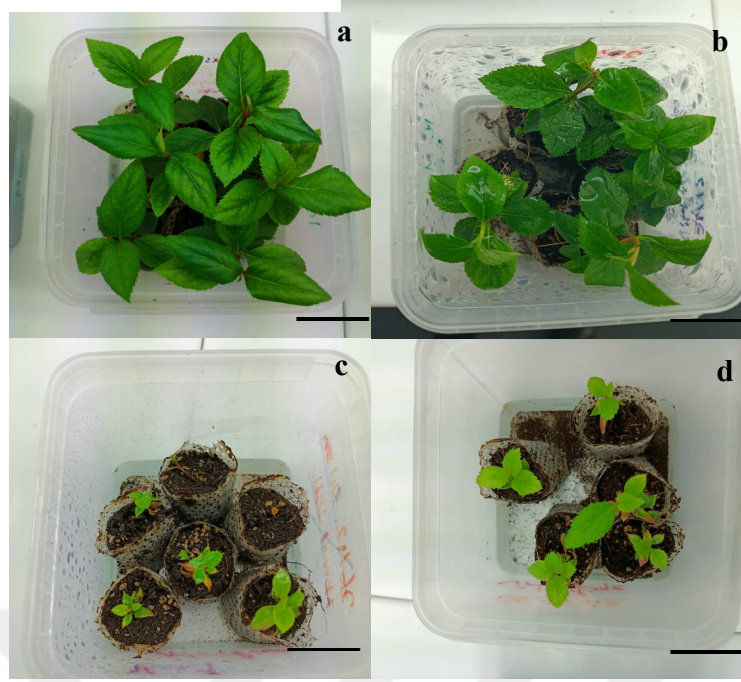


Şekil 4.13. Sağlıklı aronya sürgünlerin paperpotlara aktarılma aşaması: sürgün yapraklarının üstten (a), köklerinin yandan (b), paperpotlara alınan sürgünlerin genel (c) ve sürgünlerin paperpottaki (d) görünüşleri. Bar uzunluğu 10 mm'dir.



Şekil 4.14. Vitrifiye aronya sürgünlerinin paperpottlara aktarılma aşaması: sürgünlerin önden (a, b), vitrifiye yaprakların üstten (c) ve vitrifiye sürgünlerin paperpottaki (d) görünümü. Bar uzunluğu 10 mm'dir.

Sürgünler kültür kutularında 10 gün boyunca %99 neme maruz bırakılarak yaşam yüzdeleri ve morfolojik parametreleri takip edilmiştir. Vitrifiye sürgünlerin yapraklarındaki camsılaşmanın açıldığı ancak yaprak en-boy oranlarının sağlıklı yapraklar ile kıyaslandığında aralarında büyük ölçüde fark olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.15). Sağlıklı sürgünlerin uzunluğunun ve yapraklarının en-boy ölçülerinin arttığı belirlenmiştir. 10. gün oda şartlarına alıştırma amacıyla sürgünlerin bulunduğu kültür kaplarının kapakları açılarak kültür kutularının üstlerine yıldız şekli olacak şekilde bırakılmıştır (Şekil 4.16). Bir hafta daha oda şartlarında bekletilen kültür kaplarının nem oranı %95 – %98 arasında ölçülmüştür. Kontroller sırasında kültür kaplarının ve paperpottaki toprağın nem durumuna göre su ilavesi yapılmıştır.



Şekil 4.15. İklimlendirme aşamasının 10. günündeki sağlıklı (a, b) ve vitrifiye (c, d) sürgünler. Bar uzunluğu 10 mm'dir.



Şekil 4.16. Kültür kaplarının kapaklarının köşelerden hava alacak biçimde yıldız biçiminde örtülmesi

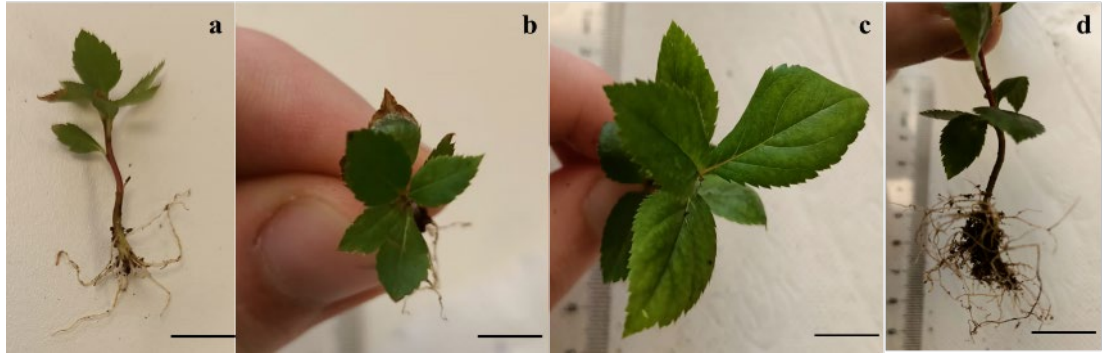
Yaklaşık 20 gün sonra sürgünler kültür kutularından çıkarılarak ortalama uzunlukları, yaprakların en ve boy ölçümleri, kök uzunlukları ve kök sayıları ölçülmüş ve veriler Tablo 4.7'de, kültür kaplarından çıkarılan sürgünlerin görselleri ise Şekil 4.17'de verilmiştir. Verilere göre; yaprak sayısı sağlıklı sürgünlerde ortalama 10 adet iken; vitrifiye sürgünlerde ortalama 9,6 adet tespit edilmiştir. Bu

fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P=0,69$). Yaprak boyu ortalama 2,4 cm ile en yüksek sağlıklı sürgünde, en düşük ise ortalama 1,0 cm ile vitrifiye sürgündedir. Yaprak eni ortalama 1,2 cm ile en yüksek sağlıklı, en düşük ortalama 0,7 cm ile vitrifiye sürgünde gözlenmiştir. Sürgünlerdeki kök sayısı ortalama 19,8 adet ile en yüksek sağlıklı, ortalama 10,4 adet ile en düşük vitrifiye sürgünde görülmüştür. Kök uzunluğu bakımından bitkiler değerlendirildiğinde, en yüksek kök uzunluğu ortalama 4,4 cm ile sağlıklı, en düşük ortalama 1,3 ile vitrifiye olan sürgünlerde gözlenmiştir. Sürgün uzunlukları ise; sağlıklı sürgünlerde ortalama 5,9 cm, vitrifiye sürgünlerde ortalama 2,5 cm'dir.

Tablo 4.7. İklimlendirme sürecinin sonunda sürgünlerin morfolojik gözlemleri

Sürgün örneği	Yaprak sayısı ($\bar{x}$)	Yaprak boyu (cm) ($\bar{x}$)	Yaprak eni (cm) ($\bar{x}$)	Kök sayısı ($\bar{x}$)	Kök Uzunluğu (cm) ($\bar{x}$)	Sürgün Uzunluğu (cm) ($\bar{x}$)
Sağlıklı	10 $\pm$ 0.6	2,4 $\pm$ 0.3	1,2 $\pm$ 0.1	19,8 $\pm$ 2.1	4,4 $\pm$ 0.5	5,9 $\pm$ 0.2
Vitrifiye	9.6 $\pm$ 0.7	1,0 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0,0	10.4 $\pm$ 1,3	1,3 $\pm$ 0.3	2,5 $\pm$ 0,2

Yaprak sayısı: $P=0,69$; $F=0,16$; Yaprak boyu: $P:0,003$; Yaprak eni: $P=0,007$; Kök Sayısı: $P=0,005$; Kök uzunluğu: $P=0,0006$; Sürgün uzunluğu: $P=1,5 \text{ E-}06$



Şekil 4.17. İklimlendirme aşaması sonunda vitrifiye (a, b) ve sağlıklı sürgünler (c, d). Bar uzunluğu 5 mm'dir.

Morfolojik parametreleri yapılan sağlıklı ve vitrifiye sürgünler kekila torfu bulunan geniş bir saksıya yerleştirilerek dış koşullara adaptasyonu takip edilmiştir (Şekil 4.18a). Sağlıklı sürgünlerin saksıdaki yaşam yüzdeliğinde bir düşüş görülmemiş ve dış koşullara adaptasyonu sağlanmıştır. Ancak kültür kutularında %81,8 yaşam yüzdeliğine sahip vitrifiye bitkiler saksıda hızla kuruyarak ölmüştür (Şekil 4.18b).



Şekil 4.18. Saksıya aktarılan sağlıklı ve vitrifiye sürgünler (a), 20 gün sonra vitrifiye sürgünler kekila torfunda ölmüştür (b)

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, *Aronia melanocarpa* klonlarının eksplantları *in vitro* koşullarda farklı sükroz ve farklı BAP konsantrasyonlarında vitrifikasyon oluşturma protokolüne alınarak vitrifiye edilmiş; daha sonra elde edilen vitrifiye eksplantların vitrifikasyon sonlandırma protokolünde iyileşme süreçleri takip edilmiştir. Bu protokollerde eksplantlardaki vitrifikasyon oluşma ve sonlanma oranlarıyla birlikte süreleri, sürgünlerin morfolojik gözlemleri ve mikroskopik incelemeleri de ele alınmıştır. Aynı zamanda çalışmanın sonunda sürgünler iklimlendirme aşamasına alınarak kültür kutularındaki ve saksıdaki yaşam yüzdelikleri hakkında veriler elde edilmiştir. Elde edilen bulgular tezin bu bölümünde diğer çalışmalarla tartışılarak yorumlanmıştır.

5.1 Vitrifikasyon Oluşturma Protokolü (VOP) morfolojik gözlemler, Tv süresi ve vitrifikasyon oranları

Çalışmada incelenen *Aronia melanocarpa* eksplantları, dört farklı sükroz (0 g L⁻¹, 10 g L⁻¹, 20 g L⁻¹ ve 30 g L⁻¹) ve beş farklı BAP (0 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹ ve 5 mg L⁻¹) konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamında VOP ile vitrifikasyon sürecine alınmıştır. Karbon kaynağı olarak kullanılan sükroz ve sitokinin olarak kullanılan BAP'ın miktarları belirlenirken; literatürde en çok kullanılan konsantrasyonlar dikkate alınmıştır (Litwińczuk, 2012; Şutan vd., 2017; Pırlak ve Almokar, 2018; Rusea vd., 2018; Özzambak vd., 2018; Petrova vd., 2019). Aynı zamanda sitokinin serisi içerisinde BAP seçilmesinin nedeni; fitohormonlar arasında *in vitro* bitki yetiştirme ve çoğaltmada en aktif olan ve başarıyla kullanılan bir sitokinin olmasıdır (Petrova vd., 2019).

Genel olarak alt kültür zamanının belirlenmesi *in vitro* kültürdeki sürgünlerin çoğalma hızına göre değişiklik gösterebilmektedir. Aynı zamanda sabit bitki büyüme düzenleyicilerin bulunduğu bir kültür ortamında uzun süreli inkübasyon süresinin farklı bitki çeşitleri üzerinde olumlu ya da olumsuz farklı etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Ancak genel olarak uzun süreli inkübasyonun somaklonal varyasyona neden olup bitki büyümesini engellediği belirtilmiştir (Abdalla vd., 2022; Peng vd., 2015; Hassanein vd., 2018). Aynı zamanda Çelebi-Toprak ve Alan (2018)'ın yaptığı bir çalışmada *Aronya melanocarpa*'nın başarılı mikroçoğaltım protokolünde 60 günlük bir inkübasyon süresinin belirlendiği görülmüştür. Bu nedenle VOP ortamındaki eksplantların kontrolleri 16., 23., 30., 38., 44. ve 65. günlerde yapılmış olup, 65. gün VOP deneyi sonlandırılarak bir sonraki aşama olan VSP'ye aktarılmıştır. 65 gün boyunca takip edilen VOP sürecinin sonunda 15 farklı besin ortamından sadece dokuz farklı besin ortamında vitrifikasyon probleminin meydana geldiği gözlenmiştir.

Besin ortamlarındaki eksplantlar morfolojik gözlemler açısından incelendiğinde; sükrozsuz ve BAP'sız veya sükrozsuz ve BAP'lı MS besin ortamlarındaki eksplantların yapraklarının büyük bir kısmında sararma, kuruma ve dökülme geliştiğinden sürgün sayısı/eksplant, kallus oluşumu (%), kallus çapı (mm) ve kök sayısı 0 olarak; sürgün uzunluğu (cm) ise herhangi bir büyüme ve gelişme gözlenmediğinden eksplantların kültür ortamına alınma uzunluğu olan 1,3 cm olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle bu iki besin ortamı hariç diğer besin ortamlarında en düşük ve en yüksek veriler ele alınarak VOP çalışması sonlandırılmıştır.

Vitrifikasyon oluşturma protokolünde (VOP), eksplant başına düşen sürgün sayısı BAP'sız besin ortamlarına göre BAP konsantrasyonunun artmasıyla artış göstermiştir. Şutan ve ark. (2017)'da *Aronia melonacarpa* “Melrom” ve “Nero” çeşitlerinin mikro çoğaltılması üzerine yaptıkları ve vitrifikasyon bulgusuna dair herhangi bir veri paylaşmadıkları çalışmalarında artan oksin (IBA) ve sitokinin (BAP) konsantrasyonlarıyla daha yüksek sürgün rejenerasyonu elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bununla birlikte aronyanın mikroçoğaltımı üzerine yapılan birçok çalışma incelendiğinde karbon kaynaklarının miktarları aynı tutularak farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin veya bu büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının çalışıldığı gözlenmiştir (Brand ve Cullina, 1992; Rusea vd., 2018; Pırlak ve Almokar, 2018; Petrova vd., 2019; Polat ve Eskimez, 2022). Bu tez çalışmasında ilk kez sükroz ve BAP'ın farklı konsantrasyonları kullanılarak besin ortamlarının kombinasyonları oluşturulmuştur. Bu bağlamda sükroz sabit tutulduğunda tek başına BAP oranının artırılmasıyla birlikte sürgün sayısında önemli bir artış elde edilmezken; istatistiki olarak anlamlı olmasa da farklı sükroz konsantrasyonlarının da BAP ile birlikte sürgün sayısı üzerinde etkisi olduğu ortaya konmuştur. Rusea ve ark. (2018)'nın *Aronia melanocarpa* “Nero” çeşidinin MS ve LF ortamlarında klonal çoğaltılması amacıyla yaptıkları bir çalışmada; sürgün sayısının MS besin ortamında LF besin ortamına göre ve sürgün sayısının 5 mg L⁻¹ BAP'da 10 mg L⁻¹ BAP içeren besin ortamına göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Petrova ve ark. (2019) farklı BAP ve MS konsantrasyonlarının aronyanın farklı çeşitlerinin sürgün sayısı üzerine inceledikleri çalışmada “Nero” çeşidindeki sürgün sayısının ½MS 1 mg L⁻¹ BAP'da ½MS 0,5 mg L⁻¹ ve 1,5 mg L⁻¹ BAP'a göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda MS'in tavsiye edilen miktarında ve 1,5 mg L⁻¹ BAP içeren besin ortamında 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ ve 2 mg L⁻¹ BAP'a göre daha yüksek sürgün sayısı elde edildiği belirtilmiştir. Her iki çalışmada da vitrifikasyon bulgusuyla ilgili veri paylaşılmamıştır. Fakat bu tez çalışmasıyla vitrifikasyon oranları ve süreleri birbirinden farklı olarak 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹ ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamlarında vitrifikasyon görüldüğü ortaya konmuştur. Ayrıca sadece BAP'ın artmasının sürgün rejenerasyonuna etkisi verilmemiş olup, farklı sükroz ve farklı BAP konsantrasyonlarının kombinasyonlarının vitrifikasyon süresi ve vitrifikasyon oranlarına etkisi de ilk kez bu çalışmada ortaya konmuştur.

Vitrifikasyon oluşturma protokolünün bulgularına göre; BAP'ın sürekli artırılması eksplant başına düşen sürgün sayısında her zaman artış olabileceğini göstermemekle birlikte, bitkilerde bir takım stres belirtileri de ortaya çıkarabilmektedir. Bu bağlamda; bu tez çalışmasındaki 10 g L⁻¹ sükroz ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamındaki eksplantların yapraklarında 10 g L⁻¹ sükrozun diğer BAP konsantrasyonlarına göre sararma olduğu, yaprak ve sürgün boylarının yeterince gelişmediği; 20 g L⁻¹ sükroz ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında vitrifikasyonla birlikte bazı yaprakların ve sürgünlerin yeterince gelişmediği, bazı yaprakların esmerleşmeye ve kırmızılaşmaya başladığı da gözlenmiştir. Dolayısıyla yüksek BAP oranları aronyada strese neden olmuştur.

Vitrifikasyon oluşturma protokolünde, 15 farklı MS besin ortamının içerisinde en düşük kallus çapı 2,8 mm ile 30 g L⁻¹ ve BAP'sız MS besin ortamında; en yüksek kallus çapı ise 12,7 mm ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında olduğu gözlenmiştir. Her bir sükroz konsantrasyonları kendi içinde incelendiğinde BAP konsantrasyonunun artmasıyla kallus çapının da arttığı görülmektedir. Tez  alışmamızdaki bu bulgu Beyaztaş (2022)'ın bir  z ms  meyve olan bal yemişin mikroçoğaltımı üzerine yaptığı çalışmadaki verilerle uyumlu görülmüştür.

Vitrifikasyon oluşturma protokolü besin ortamlarındaki eksplantlarda en düşük sürgün uzunluğu 2,0 cm ile 10 g L⁻¹ sükroz ve 2,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında; en yüksek sürgün uzunluğu ise 3,8 cm ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 1 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında olduğu gözlenmiştir. Buradan çıkan sonuca göre, sükroz oranındaki artışın sürgün uzunluğuna olumlu yönde etki ettiği görülmektedir. Pırlak ve Almokar (2018), aronyanın mikroçoğaltımı üzerine yaptıkları bir çalışmada %3 sükroz ve farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarını içeren besin ortamlarında en iyi sürgün uzunluğunun 1 mg L⁻¹ BAP içeren ortam olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda tez çalışmamızdaki bu bulgu; Özzambak ve ark. (2018) farklı toz şeker konsantrasyonun *Spathiphyllum* 'un mikroçoğaltımı üzerine etkisini inceleyen çalışmalarındaki sonuçlar ile Doğan (2019)'ın *in vitro* koşullarda farklı sükroz konsantrasyonlarının *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze bitkisinin sürgü rejenerasyonu üzerine etkisini inceleyen çalışmasının sonuçlarıyla uyumlu görülmüştür.

Vitrifikasyon oluşturma protokolünde temel amacımız köklendirme olmadığından herhangi bir oksin türevi bitki büyüme düzenleyicisi eklenmemiş, eksplantların oksinsiz ortamda k klenebilme durumu da gözlenmiştir. 15 farklı VOP MS besin ortamından dört farklı MS besin ortamının bazı sürgünleri 65 gün sonunda köklenmeye başlamıştır. Bu besin ortamları ortalama kök sayısına göre sırasıyla; 30 g L⁻¹ sükroz ve 1 mg L⁻¹ BAP (1,3 adet), 30 g L⁻¹ sükroz ve BAP'sız (1,8 adet), 20 g L⁻¹ sükroz ve BAP'sız (2,0 adet) ve 30 g L⁻¹ sükroz ve 0,5 mg L⁻¹ BAP (2,4 adet) şeklindedir. Bu protokolde BAP hücre bölünme aktivitesini uyarıcı etki gösterip (Davies, 2010) hücrelerin hızla çoğalmasını sağlayarak, bitki

dokularının köklenme yeteneğini artırmış olabilir. Sükroz da benzer şekilde enerji kaynağı ve hücre duvarı bileşenlerinin sentezine katılarak köklenmeyi teşvik etmiş olabilir.

Birçok çalışmada vitrifikasyon problemini en aza indirmek için besin ortamlarında kullanılan bileşenlerin konsantrasyonlarının değiştirilmesi ya da bir denge belirlenmesi gerektiği belirtilmiştir (Zimmerman vd., 1991; Rossetto vd., 1992). Ancak özellikle aronyada vitrifikasyon sorununun çözümüne yönelik standart bir protokol ortaya koyan herhangi bir literatür çalışmasına rastlanmamıştır. Bununla birlikte ticari olarak doku kültürü ile Aronya üretimi yapan firmalardan (Xplant Biotech, İstanbul, Zerafet Çiçekçilik, Konya ve Göker Fidancılık, Yalova) edindiğimiz bilgiye göre; camsılaşma problemi binlerce Aronya bitkisinin çöpe atılmasına ve maddi kayıpların yaşanmasına neden olmuştur. Bu problemin giderilmesi ya da en aza indirilmesinin önemi bir kez daha ortaya çıkmış ve bu tez çalışmasıyla ilk kez *in vitro* koşullarda klonal çoğaltımı yapılan Aronya için farklı besin ortamlarında meydana gelen vitrifikasyonun başlama zamanı vitrifikasyon oranıyla birlikte ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışmasının vitrifikasyon bulgularına göre; klonlardan vitrifikasyon oluşturma protokolüne alınan eksplantlarda ilk 20 gün vitrifikasyon görülmezken; 23. günde 20 g L⁻¹ ve 30 g L⁻¹ sükroz ile 1 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹ ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamlarında vitrifikasyon başlamıştır. Düşük BAP konsantrasyonunun dahi vitrifiye sürgünlerin çıkmasına neden olabildiği, BAP konsantrasyonlarının artmasıyla vitrifikasyonun arttığı çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Kataeva vd., 1991; Canhoto, 2010; de Klerk vd., 2017). Çalışmamızda da 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren besin ortamlarında da vitrifikasyon 30. ve 65. günlerde düşük oranlarda başlamıştır. Bazı çalışmaların (Langford ve Wainwright, 1987) aksine bu tez çalışmasında artan sükroz konsantrasyonlarının vitrifikasyonu desteklediği gözlenmiştir (Zimmerman ve Cobb, 1989). Bu bağlamda çalışmamızdaki bulgulara bakıldığında 10 g L⁻¹ ve 20 g L⁻¹ sükroz oranlarında ve 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ BAP ve 2,5 mg L⁻¹ BAP’da vitrifikasyon oranı %22’de kalırken; 20 g L⁻¹ sükrozda BAP miktarı 5 mg L⁻¹ olduğunda vitrifikasyon oranı da %66’ya yükselmiştir. 30 g L⁻¹ sükroz bulunan ve 1 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹ ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren besin ortamlarındaki vitrifikasyon oranları ise diğer sükroz konsantrasyonlarının vitrifikasyon oranlarına göre daha yüksektir. 65 günün sonunda vitrifikasyon oranı en yüksek %77 ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında gözlenmiştir. En düşük vitrifikasyon oranı ise %11 ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamındadır. Bu süre içerisinde sükroz konsantrasyonu ne olursa olsun BAP’sız besin ortamlarında vitrifikasyon gözlenmemiştir. Çalışmamızda vitrifikasyonun oluşmasında BAP’ın rolü daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Vitrifikasyonu etkileyen birçok faktörün olduğu bilinmektedir ve kültür ortamı koşullarının vitrifikasyona etkisi hala araştırılmaya ihtiyaç duyulan bir konudur. Bu çalışmada vitrifikasyonun oluşmasını etkileyen üç

ana faktör olduğunu düşünüyoruz. Bunlar; yüksek bağıl nem, yüksek BAP ve yüksek sükroz konsantrasyonlarıdır. Karbon olarak kullanılan sükroz *in vitro* koşullardaki bitkinin gelişimi, büyümesi ve sürgün rejenerasyonu için önemli bir enerji kaynağıdır. Aynı zamanda bitkinin osmotik potansiyeli için de önemlidir. Ancak yüksek sükroz seviyelerinde sürgünlerde sükroz ve mineral alımında da artış olacağından osmotik potansiyelde de artış; suyun transpirasyonu ile de osmotik potansiyelde azalma meydana gelebilir (Özkaynak ve Samancı, 2004). Kültür ortamındaki %99 nem içeriği ile birlikte vitrifiye bitkilerdeki anormallikler bünyelerinde biriken suyun transpire edilememesine neden olabilir. Bu durumda su emilimi ve transpirasyon arasında yeterli denge sağlanamayarak apoplastta su birikmesine yol açabilir ve gaz değişimlerini yavaşlatabilir (Van den Dries vd., 2013; Marques vd., 2021). Yüksek BAP konsantrasyonu da ABA hormonuyla etkileşime girerek ABA'nın etkinliğini azaltarak su potansiyelini düşürmüş ve sürgünlerde vitrifikasyona neden olmuş olabilir.

5.2 Vitrifikasyon Sonlandırma Protokolü (VSP) morfolojik gözlemler, Ts süresi ve iyileşme oranları

Vitrifikasyon oluşturma protokolünde, 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamında vitrifikasyon oranı %11 ve %22 olarak gözlenmiş olup; BAP'sız MS besin ortamlarında ise hiçbir eksplantta vitrifikasyon bulgusuna rastlanmamıştır. Bu nedenle BAP'sız ve 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamları VSP protokolünde vitrifiye sürgünleri iyileştirme amacıyla tercih edilmiştir. Eksplantların morfolojik durumu da incelenerek; 38. günün sonunda eksplantların sürgün sayısı/eksplant, sürgün uzunlukları (cm), kallus oluşumu (%), kallus çapı (mm) ve kök sayısı verileri elde edilmiştir. Sükrozsuz, BAP'sız ve IBA'lı MS besin ortamı ile sükrozsuz, BAP'lı ve IBA'lı MS besin ortamlarındaki eksplantların büyük bir kısmında nekroziz olduğundan ve yeterince gelişme gözlenmediğinden bu besin ortamlarındaki veriler dikkate alınmamıştır. Nekroziz oluşumunun sebebi olarak sitokin konsantrasyonunun ani değişimi (Wang ve Hu, 1984; Kataeva 1986; Kataeva vd., 1991), eksplantların gelişmemenin nedeni olarak da ortamdaki sükroz eksikliği olduğu düşünülmektedir (Eckstein vd., 2012). Bu bağlamda aronanın klonal mikroçoğaltımı için besin ortamında mutlaka karbon kaynağı olması gerektiği de bu tez çalışmasıyla ortaya konmuştur.

Vitrifikasyon sonlandırma protokolünde (VSP), eksplant başına sürgün sayısı sükroz sabit iken BAP'sız besin ortamına göre BAP ile birlikte artmıştır. Bu bulgu birçok çalışmayla uyumlu görülmüştür (Şutan vd., 2017; Çelebi-Toprak ve Alan, 2018; Pırlak ve Almokar, 2018). Kallus oluşumu sükrozsuz MS besin ortamları haricindeki tüm kültür ortamlarında %100 gözlenmiştir. BAP'lı MS besin ortamlarındaki kallus çapının BAP'sız kültür ortamlarına göre daha yüksek olduğu

görülmüştür. Bununla birlikte sükröz sabit iken kallus çaplarının BAP'sız besin ortamlarına göre BAP'lı besin ortamlarında arttığı gözlenmiştir. Vitrifikasyon sonlandırma protokolü (VSP)'nde ortalama sürgün uzunluğu sükröz aynı konsantrasyonda iken BAP ile birlikte artmıştır. Bu bulgular sürgün uzunluğu ile BAP'ın arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Kök sayısı bakımından veriler incelendiğinde ise; sükröz içeren tüm besin ortamlarında köklenme görülürken; sadece 10 g L⁻¹ sükröz, BAP'lı ve IBA'lı MS besin ortamında köklenme olmadığı gözlenmiştir. Bu bulgu diğerlerinin arasında dikkat çekici bulunmuştur. Aynı sükröz konsantrasyonunda BAP içermeyen IBA'lı besin ortamında ise köklenme görülmüştür. 10 g L⁻¹ sükröz, BAP'lı ve IBA'lı MS besin ortamında kök gelişiminin olmaması diğer besin ortamlarına göre daha düşük sükröz konsantrasyonuna sahip olmasıyla ve IBA'dan daha yüksek konsantrasyonda BAP içermesi ile ilişkili olabilir. Çünkü bu ortamın sürgün sayısı diğer VSP MS besin ortamlarına göre daha yüksek gözlenmiştir. Bu aşamada BAP'ın da baskın olmasının etkisiyle köklenme yerine sürgün rejenerasyonu yeteneği indüklenmiş olabilir. Bununla birlikte bu çalışmadaki sitokin ve oksin oranlarında besin ortamında en az 20 g L⁻¹ sükrözün bulunması önemli görülmüştür.

Vitrifikasyon semptomları belirginleştikten sonra vitrifikasyonu ortam koşullarını değiştirmeden kontrol etmenin zor bir süreç olduğu anlaşılmıştır. Ancak farklı bitki türlerinde gözlenen camsılaşma problemi, kültür kaplarının içerisindeki bağıl nemin, bitki büyüme düzenleyicilerin ve etilen seviyelerinin düşürülmesi ya da soğuk uygulama gibi uygulamalar vitrifikasyonu kontrol altına almaya yardımcı olabilmektedir (Bonga vd., 1992; Rosetto vd., 1992; Gürel ve Gürel, 1998). Bu tez çalışması ile belirlenen protokollere göre vitrifiye edilen *Aronia melanocarpa* sürgünleri için ilk kez bu tez çalışması ile standart bir iyileştirici kültür ortamı belirlenerek, sürgünlerin vitrifikasyon problemini aşma yeteneği gösterebildiğini açıkça ortaya konmuştur.

Aronia melanocarpa'nın vitrifiye sürgünleri vitrifikasyon sonlandırma protokolünde sükrözlu ve BAP'sız besin ortamlarında ilk 13 günde %95'in üzerinde iyileşme gösterirken; 31. günde %98 ve üzerine çıkmıştır. Aynı süre içerisinde sükrözlu ve BAP'lı besin ortamlarında iyileşme oranı ilk 13 günde %26-66 arasında kalırken; 31. günde %65-94'e yükselmiştir. Bu bulgular aronyanın vitrifikasyondan hızlı bir şekilde çıkması için BAP'sız ve sükröz içeren MS besin ortamına ihtiyaç duyduğunu açık bir şekilde göstermiştir. Yapraklardaki camsı görünümün yerini sağlıklı yaprak görünümü almış ve yapraklar camsılara göre daha büyük, sürgün uzunlukları ise daha yüksek gözlenmiştir.

Hücrelerdeki su potansiyeli, sitokinlerin oranlarından etkilenebilmektedir (Asmono, 2020). Dolayısıyla bu tez çalışmasındaki VSP besin ortamında BAP'ın olmadığı koşullarda vitrifikasyonun belirgin bir şekilde sonlanması su potansiyeli ile ilişkili olabilir. Yüksek sitokin konsantrasyonlarının neden olabildiği su potansiyelini azaltma sorunu BAP'ın olmadığı durumda muhtemelen

yaşanmamaktadır. Su potansiyeli düşükken hücrelerdeki serbest su molekülleri arasındaki hareket azalır, aşırı su birikimine neden olmakta bu da vitrifikasyon problemini meydana getirdiğini düşünmekteyiz. Ancak su potansiyeli yüksek olduğunda su molekülleri hücrelerde rahatlıkla hareket edebilmektedir. *Aronia melonacarpa*'nın vitrifikasyon oluşma ve sonlanma süreçlerinde BAP'ın belirgin rolü de göz önüne alındığında su potansiyelinin değişimine etkisi olduğu ve aşırı su birikimi nedeniyle vitrifikasyon meydana geldiği kanaatini oluşturmuştur.

5.3 Mikroskobik incelemeler

Sağlıklı ve vitrifiye sürgünlerin yapraklarındaki stoma sayıları arasında toplam sayı bakımından fark olduğu; ancak istatistiki olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Vitrifiye bitkilerin normal bitkilere göre daha az stoma sayısına sahip olduğunu ortaya koyan araştırmacılar olmuştur. Dillen ve Buysens (1989)'ın *Gypsophila paniculata* bitkisinde ve Mohamed-Yasseen ve ark. (1992)'nin *in vitro* koşullarda vitrifiye olan ve vitrifiye olmayan soya, hindiba ve karanfil bitkilerinin stoma incelemelerini yaptıkları çalışmalarda vitrifiye sürgünlerin yapraklarında sağlıklı yapraklara göre daha az stoma bulgusu bildirmişlerdir. Ancak bu tez çalışmasında vitrifiye aronya sürgünlerinin birim alandaki stoma sayılarının sağlıklı sürgünlere göre daha yüksek olduğu ortaya konmuştur.

Üç yaprak örneğinde (sağlıklı yaprak, düşük ve yüksek vitrifiye yaprak) de hem stoma eni hem de stoma boyu ölçülerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sağlıklı yapraklardaki stomaların en boy ölçüleri vitrifiye yapraklardaki stomaların en boy ölçülerine yakın değerlere sahiptir. Bu bulgu Miguens (1993)'in *Datura insignis* bitkisi üzerinde yaptığı çalışma ile uyumlu görülmüştür.

Bununla birlikte bu çalışmadaki üç yaprak örneğinde stomaların açık olduğu gözlenmiştir. Vitrifiye sürgünlerde ortaya çıkan bozukluklar (Debergh ve Maene, 1984), yapraklar tarafından gerçekleştirilen iki ana süreci; fotosentez ve gaz değişimini etkileyebilmektedir (Debergh ve Maene 1984; Ziv, 1991). Vitrifiye sürgünlerin yapraklarında stomalar az ya da çok olabilmektedir. Aynı zamanda kalloz artışı nedeniyle koruyucu hücrelerin de düzgün çalışmadığı tahmin edilmektedir (Ziv ve Ariel, 1988, 1990; Debergh vd., 1992). Bununla birlikte stomaların sürekli açık kalmasının nedenleri stomaların hücre dışına potasyum pompalayamaması, nişasta sentezindeki aksaklıklar, ortamdaki yüksek oranda bağıl nemin varlığı olabilir.

5.4 İklimlendirme

Vitrifikasyon oluşturma ve sonlandırma protokollerinde elde edilen vitrifiye ve sağlıklı sürgünler iklimlendirme amacıyla paperpotlara yerleştirildikten sonra kültür kutularına aktarılarak bazı morfolojik parametreleri yaklaşık 20 gün boyunca takip edilmiştir. Bu süre sonunda iklimlendirme sürecinde sağlıklı ve vitrifiye sürgünler arasında yaprak sayısı bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fakat yaprak boyu, yaprak eni, kök sayısı, kök uzunluğu ve sürgün uzunluğu açısından sağlıklı ve vitrifiye sürgünlerin arasında istatistiki olarak anlamlı fark gözlenmiştir. Vitrifiye sürgünler, paperpot içerisinde köklenmesine ve yapraklarındaki camsılaşma oranında ciddi bir azalma olmasına rağmen görsel kalitesi açısından sağlıklı örneklerle göre belirgin bir farklılık gözlenmiş; düşük kalitede sürgünler elde edilmiştir. İklimlendirme aşamasında kültür kutularının kapaklarının yıldız şeklinde üzerlerine örtülmesiyle birlikte kutuların içerisindeki bağıl nemin %99'dan %95'lere düşürülmesi vitrifiye olarak paperpotlara yerleştirilen sürgünlerde camsılaşmanın büyük oranda azalması yönünde katkı sağladığı düşünülmektedir. Aronyadaki bu iklimlendirme uygulamasıyla elde edilen bulgu ilk kez bu tez çalışmasıyla ortaya konulmuştur. Aynı zamanda direkt kekila torfu bulunan saksıya aktarmadan önce sürgünlerin su tutma kapasitesi ve hava geçirgenliği sağlayan paperpotlara aktarılması olası bir “transplant şokunu” geciktirerek vitrifiye sürgünlerin köklenme yeteneğini artırmış olabilir.

Paperpotlardan çıkarılan her iki sürgün örneği de kekila torfu bulunan saksı içerisine alınarak dış koşullara alıştırma süreci 20 gün daha takip edilmiştir. Kültür kutularında paperpot içerisinde %81,8 oranında hayatta kalan vitrifiye sürgünler saksıya alındıklarında hayatta kalmayı başaramamıştır. Bu bulgu Dillen ve Buysens (1989)'in *in vitro* koşullarda *Gypsophila paniculata* bitkisinde yaptıkları çalışmada bitkinin toprağa aktarımından sonra elde ettikleri bulgu ile uyumlu görülmüştür. Bununla birlikte vitrifiye sürgünlerin zayıf vasküler yapısı (Gribble, 1999) ile birlikte enfeksiyonlara ve toprağa transfer aşamalarındaki hassas bir yapıda olmaları (Rodriguez vd., 2012) dış koşullara adaptasyonu zorlaştırmaktadır. Nitekim sağlıklı sürgünlerin kekila torfunda yüksek yaşam yüzdeliği göstermesi ve düşük kalitedeki vitrifiye sürgünlerin aynı toprakta ölmesi kök sisteminin yeterince gelişmemesi ile açıklanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, odunsu bir bitki olan *Aronia melanocarpa* bitkisinde *in vitro* koşullarda farklı sükroz ve farklı BAP konsantrasyonları kullanılarak vitrifikasyon sorununun modellenip çözüm önerileri getirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile literatürde sınırlı sayıda yer alan vitrifikasyon probleminin aronyada modellenmesiyle birlikte vitrifikasyonun başlama zamanı, vitrifikasyon oranı, vitrifikasyonun sonlanma zamanı, iyileşme oranı ve iklimlendirme aşamasındaki yaşam yüzdeliği belirlenmiştir. Aynı zamanda vitrifiye olan ve vitrifikasyonu sonlanarak sağlıklı gelişme gösteren sürgünlerde morfolojik değişim ve mikroskobik bulgular da incelenmiştir. Birinci aşamada; farklı konsantrasyonlarda BAP ve sükroz içeren MS besin ortamlarında VOP süreci ve eksplantlardaki “vitrifikasyon süresi (T_v)”, ikinci aşamada; vitrifiye olan eksplantların seçilerek farklı konsantrasyonlardaki BAP, sükroz ve tek doz IBA içeren MS besin ortamlarında VSP süreci ve vitrifiye eksplantlardaki “iyileşme süresi (T_s)”, üçüncü aşamada ise; VOP ile vitrifiye olan ve VSP ile sağlıklı gelişen aronya eksplantlarının paperpotlara aktarılaraq kültür kaplarındaki “yaşam yüzdeliği (Y_Y)” ve kekila torfu bulunan saksıda dış koşullara adaptasyonu belirlenmiştir.

Çalışmamızın bulguları ile vitrifikasyon oranını düşük tutup, kaliteli sürgünler elde etmek amacıyla aronyada klonal çoğaltma için optimum şartların belirlenmesinin önemli olduğu daha net ortaya konmuştur. Bu bağlamda; 3,5 g gelrite ile birlikte 10 g L⁻¹ ve 20 g L⁻¹ sükroz miktarlarında 1 mg L⁻¹ BAP ile 30 g L⁻¹ sükroz ve 0,5 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamlarının hem vitrifikasyon oranı hem de sürgün rejenerasyonu açısından en uygun ortam olduğu ortaya konmuştur. Kısa sürede daha yüksek sürgün rejenerasyonu elde etmek için BAP seviyesinin yükseltilmesi vitrifikasyon riskini artıracaktır. Dolayısıyla vitrifiye bitkileri kurtarmak ve maddi kayıpları azaltmak amacıyla “vitrifikasyon sonlandırma protokolü” kullanılabilecektir. Ancak bu protokolle birlikte vitrifiye bitkilerin iyileşme süresi de üretim planına eklendiğinden zaman maliyeti ortaya çıkacaktır. Bununla birlikte yüksek BAP konsantrasyonunun kullanımı tercih edildiğinde sürgünlerin mutlaka uygun zaman diliminde köklenme ortamına transferi sağlanmalıdır. Bu sayede hem yüksek sürgün elde edilmiş olacak hem de bu tez çalışmasında “vitrifikasyon oluşturma protokolü” ile belirlenen sürelerle dikkat edilerek düşük oranda vitrifikasyona sahip sürgünler üretilecektir. Aronyada klonal çoğaltım yapmak isteyen araştırmacıların ya da üreticilerin bu iki duruma dikkat ederek, üretim stratejilerine göre uygun olan üretim planını tercih etmeleri tavsiye edilmektedir.

In vitro koşullarda doku kültürü ile bitki üretimi yapılan çalışmalarda küresel bir sorun haline geldiği görülen vitrifikasyonun (camsılaşmanın) azaltılması ya da vitrifiye bitkilerin kurtarılmasına yönelik bilimsel çalışmalar önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasının sonucuna göre; aronyada meydana gelen vitrifiye sürgünleri kurtarmanın ya da bu çalışmada vurgulanan sükroz ve BAP kombinasyonları ile

MS besin ortamlarını kullanarak vitrifikasyon sorununu en aza indirmenin mümkün olduğu ilk kez standart protokollerin belirlenmesiyle ortaya konmuştur. Bu çalışmada önemle üzerinde durulan süktroz, BAP ve bağıl nem oranlarının dışında vitrifikasyon mekanizmasının daha iyi anlaşılması için farklı çalışmalarda farklı konsantrasyonların, farklı besin ortamı bileşenlerinin, çevresel koşullar ile kök ve sürgün gelişiminin incelenmesi tarafımızca önerilmektedir.



7. KAYNAKLAR

Bu tez çalışmasında APA atıf sistemi kullanılmıştır.

- Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M. K., El-Mahrouk, M. E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T.A., et al. (2022). An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. *Horticulturae*, 8(8), 677. <http://dx.doi.org/10.3390/horticulturae8080677>
- Ahloowalia, B. S., Prakash, J., Savangikar, V. A., & Savangikar, C. (2004). Plant tissue culture. Low-cost options for tissue culture technology in developing countries. International Atomic Energy Agency, Vienna, 3-11.
- Algül, B. E., Tekintaş, F. E., & Dalkılıç, G. G. (2016). Bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımı ve içsel hormonların biyosentezini artırıcı uygulamalar. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(2), 87-95. <https://doi.org/10.25308/aduziraat.294100>
- Asmono, S. L. (2020). *In vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana* Bertoni from internode and leaf explants using different concentrations of BAP (6-benzyl amino purine). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 411, No. 1, p. 012004). IOP Publishing.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. & Akbudak, M. A. (2001). *Doku kültürü: Temel laboratuvar teknikleri*. Babaoğlu, M., Gürel, E., & Özcan, S. (Ed.) *Bitki biyoteknolojisi I: Doku kültürü ve uygulamaları* (s. 1-35). Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya.
- Sağırkaya, H., & Bağış, H. (2003). Memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(1-2-3), 127-135.
- Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyess, A., & Keefer, C. L. (2003). Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology*, 59(8), 1839-1850. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01257-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01257-8)
- Beruto, M., Curir, P., & Debergh, P. (1999). Influence of agar on in vitro cultures: II. Biological performance of *Ranunculus* on media solidified with three different agar brands. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35(1), 94-101.
- Beyaztaş, T. N. (2022). *Bazı bal yemişi çeşitlerinin (Lonicera cceaerulea) mikroçoğaltım performanslarının belirlenmesi* (Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Bursa Uludağ Üniversitesi).
- Bonga, J. M., Aderkas, P., & Von Aderkas, P. (1992). *In vitro culture of trees*. (38). Kluwer Academic Publishers, 1-209.
- Bornman, C. H., & Vogelmann, T. C. (1984). Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in *Picea abies*. *Physiologia Plantarum* 61(3), 505-512. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb06364.x>
- Brand, M. (2010). Aronia: Native shrubs with untapped potential. *Arnoldia*, 67(3), 14-25.
- Brand, M. H. (2016). Propagation of Aronia by seed, cuttings, tissue culture and grafting©. *Acta Horticulturae*, 1174, 197-204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1174.41>
- Brand, M. H., & Cullina, W. G. (1992). Micropropagation of red and black chokeberry (*Aronia* spp.). *HortScience*, 27(1), 81.
- Bürün, B. (2021). Bitki biyoçeşitliliğinin korunmasında biyoteknolojinin kullanımı ve Türkiye'deki çalışmalar. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 10(1), 1-16. <https://doi.org/10.18036/estubtdc.590752>

- Canhoto, J. M. (2010). *Biotechnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press. (s. 13-405). <http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0404-6>
- Chang, C. C., Shapiro, D. B., Bernal, D. P., Wright, G., Kort, H. I., & Nagy, Z. P. (2008). Two successful pregnancies obtained following oocyte vitrification and embryo re-vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, 16(3), 346-349. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60594-9](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60594-9)
- Çağlar, M., & Demirci, M. (2017). Üzümsü meyvelerde bulunan fenolik bileşikler ve beslenmedeki önemi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(11), 18-26.
- Çelebi-Toprak, F., & Alan, A. R. (2018, August). A successful micropropagation protocol for three aronia (*Aronia melanocarpa*) cultivars. In XXX International Horticultural Congress IHC2018: II International Symposium on Micropropagation and In Vitro Techniques 1285 (pp. 173-176).
- Çelebi-Toprak, F., & Alan, A. R. (2018). A successful micropropagation protocol for three aronia (*Aronia melanocarpa*) cultivars. *Acta Horticulturae*, 1285, 173-176. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1285.27>
- Çetin, V. (2014). Meyve ve sebzelerde kullanılan bitki gelişmeyi düzenleyiciler. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 2, 40-50.
- Çetin, Y. (2004). *İmmatür sığır oositlerinin vitrifikasyon tekniği ile etilen glikol ve DMSO kullanarak payetlerde dondurulması*. (Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Daguin, F., & Letouze. (1986). Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. *Physiologia Plantarum*, 66(1), 94-98. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb01239.x>
- Davies, P. J. (2010). *The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions* (pp. 1-15). Davies, P. J. (Ed.). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* (3), Springer Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7>
- de Klerk, G. J. M., van den Dries, N., & Krens, F. A. (2017). Hyperhydricity: underlying mechanisms. *Acta Horticulturae*, 1155, 269-276. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1155.39>
- Debergh, P., Harbaoui, Y., & Lemeur, R. (1981). Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiologia Plantarum*, 53(2), 181-187.
- Debergh, P., & Maene, L. (1984). Pathological and physiological problems related to the in vitro culture of plants. *Parasitica*, 40(2/3), 69-75.
- Debergh, P., Aitken-Christie, J., Cohen, D., Grout, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R., & Ziv, M. (1992). Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30, 135-140.
- Dillen, W., & Buysens, S. (1989). A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19, 181-188.
- Doğan, M. (2019). Farklı sükröz konsantrasyonlarını içeren kültür ortamında *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze'un in vitro sürgün rejenerasyon performansı. *International Journal of Eastern Mediterranean Agricultural Research*, 2(1), 1-12.
- Doğan, S., Adanacıoğlu, N., & Oğur, E. (2022). Endemik mor mercan (*Origanum sipyleum* L.) bitkisinin in vitro çoğaltımı. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 32(1), 124-132. <http://10.18615/anadolu.1130869>

- Eckstein, A., Zięba, P., & Gabryś, H. (2012). Sugar and light effects on the condition of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* cultured in vitro. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 90-101. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9222-z>
- Gaspar, Th., Kevers, C., Debergh, P., Maene, L., Paques, M., & Boxus, Ph. (1987). *Vitrification: Morphological, physiological and ecological aspects* (pp. 152-166). Bonga, J. M. & Durzan, Don J. (Ed.). *Cell and Tissue Culture in Forestry: General Principles and Biotechnology*, 1(24-26), Springer Dordrecht. <http://doi.org/10.1007/978-94-017-0994-1>
- Gribble, K. (1999). The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. *Plant Growth Regulation*, 27, 181-190. <http://doi.org/10.1023/A:1006235229848>
- Güler, Ş. (2018). *Farklı vitrifikasyon yöntemleri ile dondurulan sığır oositlerinin çözündürme sonrası in vitro maturasyon başarıları* (Yüksek lisans tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi).
- Gürel, E., & Gürel, S. (1998). Plant regeneration from unfertilized ovaries of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured in vitro. *Turkish Journal of Botany*, 22(4), 233-238.
- Hakkaart, F. A., & Versluijs, Joke M. A. (1983). Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 89, 47-53. <http://doi.org/10.1007/BF01974443>
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9.
- Hardin, J. W. (1973). The enigmatic chokeberries (Aronia, Rosaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 100(3), 178-184. <https://doi.org/10.2307/2484630>
- Hassanein, A. M., Salem, J. M., Faheed, F. A., & El-nagish, A. (2018). Effect of anti-ethylene compounds on isoenzyme patterns and genome stability during long term culture of *Moringa oleifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132, 201-212. <http://doi.org/10.1007/s11240-017-1326-0>
- Hatipoğlu, R., (2000). *Bitki Biyoteknolojisi*. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi.
- Horzum, Ö. (2022). *Yeni Trend: Sağlık İçin Aronya Meyvesi*. Çavuşoğlu, Ş., & Uzun, Y. (Ed.) *Pratik Tarım ve Sürdürülebilirliğin Yansımaları*, Ankara, Türkiye, s. 1-359.
- Huang, L. C., Kohashi, C., Vangundy, R., & Murashige, T. (1995). Effects of common components on hardness of culture media prepared with gelrite™. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 31(2), 84-89. <http://doi.org/10.1007/BF02632242>
- Hussey, G. (1986). *Problems and prospects in the in vitro propagation of herbaceous plants*. Withers, L. A., & Alderson, P. G. (Ed.) *Plant Tissue Culture and Its Agricultural*, pp. 1-518.
- Jeong, B. R., K. Fujiwara, and T. Kozai, (1995). *Environmental Control and Photoautotrophic Micropropagation*. Janick, J. (Ed.) *Horticultural Reviews*, 17, 123-170. <https://doi.org/10.1002/9780470650585.ch4>
- Joyce, S. M., Cassells, A. C., & Mohan Jain, S. (2003). Stress and aberrant phenotypes in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(2), 103-121. <http://doi.org/10.1023/A:1023911927116>
- Jurendić, T., & Ščetar, M. (2021). *Aronia melanocarpa* products and by-products for health and nutrition: A review. *Antioxidants*, 10(7), 1052. <https://doi.org/10.3390/antiox10071052>
- Kadota, M., & Niimi, Y. (2003). Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 261-265. <http://doi.org/10.1023/A:1022378511659>

- Kataeva, N. (1986). Peculiarities of micropropagation of apple varieties with declined rooting ability. *Agriculture Biology*, 4, 18-23.
- Kataeva, N. V., Alexandrova, I. G., Butenko, R. G., & Dragavtceva, E. V. (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 27(2), 149-154.
- Kataeva, N. V., Alexandrova, I. G., Butenko, R. G., & Dragavtceva, E. V. (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 149-154. <http://doi.org/10.1007/BF00041283>
- Kevers, C., & Gaspar, T. (1985). Vitrification of carnation in vitro: changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 4, 215-223. <https://doi.org/10.1007/BF00040195>
- Kevers, C., Coumans, M., Coumans-Gillès, M. F., & Caspar, T. (1984). Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, 61(1), 69-74. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb06102.x>
- Kharrazi, M., Nemati, H., Tehranifar, A., Bagheri, A., & Sharifi, A. (2011). In vitro culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 5(13), 1-6.
- Kocaçalışkan, İ. (2017). *Bitki Doku Kültürleri Kitabı* (Organ, Doku ve Hücre) (ISBN: 978-975-8201-47-6). DPÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya.
- Kozai, T., & Smith, M. L. (1995). *Environmental control in plant tissue culture general introduction and overview*. Aitken-Christie, J., Kozai, T. & Smith, M. L. (Eds.), *Automation and Enviromental Control in Plant Tissue Culture*, Kluwer A. Publ. Netherlands, p. 301-318.
- Kraujalyte, V., Leitner, E., & Venskutonis, P. R. (2013). Characterization of *Aronia melanocarpa* Volatiles by headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME), simultaneous distillation/extraction (SDE), and gas chromatography-olfactometry (GC-O) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4728-4736.
- Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A., & Trounson, A. (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Human Reproduction*, 14(12), 3077-3079.
- Kumar, S. (2007). *Cryopreservation of buffalo oocytes by slow freezing and vitrification*. (Doctoral thesis, Deemed University, India).
- Kumlay, A. M. & Eryiğit, T. (2011). Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyici maddeler: bitki hormonları. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 1(2), 47-56.
- Lane, M., & Gardner, D. K. (2001). Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Molecular Reproduction and Development*, 58(3), 342-347. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200103\)58:3%3C342::AID-MRD13%3E3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200103)58:3%3C342::AID-MRD13%3E3.0.CO;2-X)
- Langford, P. J., & Wainwright, H. (1987). Influence of sucrose concentration on the photosynthetic ability of in vitro grown rose shoots. *Acta Horticulturae*, 227, 305-310. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.227.56>
- Liebermann, J., & Tucker, M. J. (2002). Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*, 124, 483-489.
- Litwinczuk, W. (2002). Propagation of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* Elliot) through in vitro culture. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Series: Horticulture*, 5(2).

- Litwińczuk, W. (2013). Micropropagation of chokeberry by in vitro axillary shoot proliferation. *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*, 179-186.
- Marques, M. P., Martins, J., de Carvalho, L. A. B., Zuzarte, M. R., da Costa, R. M., & Canhoto, J. (2021). Study of physiological and biochemical events leading to vitrification of *Arbutus unedo* L. cultured in vitro. *Trees*, 35(1), 241-253. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-02036-0>
- McKay, S. A. (2001). Demand increasing for aronia and elderberry in North America. *New York Fruit Quarterly*, 9(3), 2-3.
- Miguens, F. C., Louro, R. P., & Machado, R. D. (1993). A scanning electron microscope study of normal and vitrified leaves from *Datura innoxia* plantlets cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32, 109-113. <https://doi.org/10.1007/BF00040124>
- Mohamed-Yasseen, Y., Davenport, T. L., Splittstoesser, W. E., & Litz, R. E. (1992). Abnormal stomata in vitrified plants formed in vitro. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 105, 210-212.
- Niedz, R. P., & Bausher, M. G. (2002). Control of in vitro contamination of explants from greenhouse-and field-grown trees. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38, 468-471. <https://doi.org/10.1079/IVP2002316>
- Oluk, E. A. & Çakır, A. (2009). Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), 5769-5772. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1216>
- Öktüren, F., & Sönmez, S. (2005). Bitki besin maddeleri ile bazı bitki büyüme düzenleyicileri (hormonlar) arasındaki ilişkiler. *Derim*, 22(2), 20-32.
- Özkaynak, E., & Samancı, B. (2004). Mikroçoğaltımda çevre kontrolünde son gelişmeler: besin ortamı üst çevresi ve kültür ortamı çevresi faktörleri. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 14(2).
- Özkaynak, E., & Samancı, B. (2016). Mikroçoğaltımda çevresel kontrol faktörleri. *Derim*, 20(1), 7-18.
- Özzambak, M. E., Zeybekoğlu, E., Gün, İ., & Kılıç, T. (2018). *Spathiphyllum*'un in vitro mikro çoğaltımı üzerine şeker konsantrasyonlarının etkileri. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(3), 1015-1023. <http://10.16984/saufenbilder.348480>
- Paek, K. Y., & Hahn, E. J. (2000). Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of *lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36, 128-132. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0026-2>
- Pasqualetto, P. L., Zimmerman, R. H. & Fordham, I. (1988). The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14, 31-40. <https://doi.org/10.1007/BF00029573>
- Peng, X., Zhang, T.T., Zhang, J. (2015). Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyanum* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122, 67-77. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0750-2>
- Pereira, A. M. S., Bertoni, B. W., Appezzato-da-Glória, B. et al. (2000). Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60, 47-53. <https://doi.org/10.1023/A:1006409807719>
- Petrova, I. V., Tokhtar, L. A., Kulko, S. V., & Borodayeva, Z. A. (2019). In vitro clonal micropropagation of *Aronia* L. varieties from the collection of the botanic garden of the

- National Research University “BelSU” (Belgorod, Russia). *EurAsian Journal of BioSciences*, 13(2), 1071-1073.
- Pırlak, L., & Almokar, H. (2018). Propagation of Aronia (*Aronia melanocarpa*) with tissue culture. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 32(3), 549-558.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro culture of higher plants*. Springer Science & Business Media, 1-160.
- Polat, M., & Eskimez, I. (2022). The effects of different hormone combinations on in vitro micropropagation of aronia (*aronia melanocarpa* (michx.) elliot). *Fresenius Environmental Bulletin*, 31(01A), 1219-1227.
- Poyraz Engin, S., & Boz, Y. (2019). Türkiye ve dünyada aronya (*Aronia melanocarpa* (Michx) Elliot) yetiştiriciliği. *Bahçe*, 48 (Özel Sayı 1): 247–252.
- Poyraz Engin, S. (2020). ‘Nero’ ve ‘viking’ aronya (*Aronia melanocarpa* (Michx) Elliot) çeşitlerinin agromorfolojik özellikleri ve farklı olgunluk seviyelerindeki meyve kalite parametrelerinin belirlenmesi (Doktora tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi).
- Rodríguez, R., Tamés, R. S., & Durzan, D. J. (Eds.). (2012). *Plant aging: basic and applied approaches* (Vol. 186). Springer Science & Business Media.
- Rossell, I. M., & Kesgen, J. M. (2003). The distribution and fruiting of red and black chokeberry (*Aronia arbutifolia* and *A. melanocarpa*) in a southern Appalachian fen. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 130(3), 202-205. <https://doi.org/10.2307/3557554>
- Rossetto, M., Dixon, K. W., & Bunn, E. (1992). Aeration: a simple method to control vitrification and improve in vitro culture of rare australian plants. *In Vitro-Plant*, 28, 192-196. <https://doi.org/10.1007/BF02823316>
- Rusea, I., Popescu, A., Isac, V., Şuţan, A. N., & Hoza, D. (2018). Adventitious shoot regeneration from petiole explants in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *Scientific Papers, Series B, Horticulture*, 62, 83-91.
- Saffazbekyan, S. A., Kataeva, N. V., & Milyaeva, E. L. (1990). Morphological properties of caper (*Capparis spinosa* L.) shoots during clonal micropropagation *Fiziologiya rastenij*, 37(1), 169-176.
- Sangwan, R. S., & Sangwan-Norreel, B. S. (Eds.). (2012). *The Impact of Biotechnology on Agriculture: Proceedings of the International Conference: “The Meeting Point Between Fundamental and Applied in Vitro Culture Research,”* Held at Amiens (France), July 10–12, 1989 (Vol. 8). Springer Science & Business Media.
- Sharma, S. K., Ramamurthy, V. (2000). Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. *Plant Cell Reports*, 19, 511–518. <https://doi.org/10.1007/s002990050765>
- Sidor, A., & Gramza-Michałowska, A. (2019). Black chokeberry *Aronia melanocarpa* L.—A qualitative composition, phenolic profile and antioxidant potential. *Molecules*, 24(20), 3710. <https://doi.org/10.3390/molecules24203710>
- Šnebergrová, J., Čížková, H., Neradová, E., Kapci, B., Rajchl, A., & Voldřich, M. (2014). Variability of characteristic components of aronia. *Czech J Food Sci.*, 32(1), 25-30.
- Soh, W. Y., & Bhojwani, S. S. (Eds.). (2013). *Morphogenesis in plant tissue cultures*. Springer Science & Business Media. 3-503.
- Szopa, A., & Ekiert, H. (2014). Production of biologically active phenolic acids in *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott in vitro cultures cultivated on different variants of the Murashige and Skoog medium. *Plant Growth Regulation*, 72(1), 51-58. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9835-2>

- Şahin, A., & Erdoğan, Ü. (2022). Aronia (*Aronia melanocarpa* Michx. Elliot) production and evaluation methods in the world and turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10(1), 81-85. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i1.81-85.4547>
- Şaylan, A. (2011). *Kadın gamet hücresinde vitrifikasyon araştırması*. (Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Şuğan, N. A., Isac, V., Duminićă, C., & Popescu, A. (2017). Studies on the in vitro micropropagation ability of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot. *Current Trends in Natural Sciences*, 6(11), 85-92.
- Vieitez, A. M., Ballester, A., San-Jose, M. C., & Vieitez, E. (1987). Vitrification in chestnut shoots regenerated in vitro. *Acta Horticulturae*, 212, 231-234. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1987.212.34>
- Walther, E., & Müller, S. (2012). Aronia, Apfelbeere (*Aronia melanocarpa* [Michx.] Elliott). *Hoppe B*, 4, 95-110.
- Wang, P. J., & Hu, C. Y. (1984). In vitro cloning of the deciduous timber tree *Sassafras randaiense*. *Z Pflanzenphysiol*, 113, 331-335.
- Tırpan, M. B. & Yaman, C. (2019). Kriyobioloji ve üreme organı dokularının dondurulması. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 8(3), 161-168.
- van den Dries, N., Gianni, S., Czerednik, A., Krens, FA., & de Klerk, G. J. M. (2013). Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. *J Exp Bot*, 64, 5221-5230. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert315>
- Yılmaz, A., Güler, E., Soydemir, H. E., Demirel, S., Mollahaliloğlu, S., Çiftçi, V., & Karadeniz, T. (2021). Miracle plant: black chokeberry (*Aronia melanocarpa*). *MAS Journal of Applied Sciences*, 6(1), 83-94. <https://doi.org/10.52520/masjaps.20>
- Zimmerman, T. W., & Cobb, B. G. (1989). Vitrification and soluble carbohydrate levels in *Petunia* leaves as influenced by media Gelrite and sucrose concentrations. *Plant Cell Reports*, 8, 358-360. <https://doi.org/10.1007/BF00716673>
- Zimmerman, T. W., Rogers, S. M., & Cobb, B. G. (1991). Controlling vitrification of *petunia* in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 27, 165-167.
- Zimmerman, T. W., Rogers, S., & Cobb, B. G. (1991). Controlling vitrification of *petunia* in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 27(4), 165-167. <https://doi.org/10.1007/BF02632211>
- Ziv, M., & Ariel, T. (1988). The relationship between cell wall deformity and stomatal malfunction in the leaves of carnation in vitro. *Proc. Intl. Soc. Plant Molecular Biol. Congress, Jerusalem*: 425.
- Ziv M., & Ariel, T. (1990). The effect of culture condition on vitrification and stomatal cell wall deformation in leaves of carnation plants in vitro. *Plant Science*.
- Ziv, M., Meir, G., & Halevy, A. (1983). Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2, 55-65. <https://doi.org/10.1007/BF00033553>
- Ziv, M. (1991). *Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. Micropropagation: technology and application*, 45-69. Debergh, P. C., & Zimmerman, R. H. (Eds.) *Micropropagation Technology and Application*, Kluwer Academic Publishers.

İnternet Kaynakları

- Merriam-Webster (2022). <https://www.merriam-webster.com/dictionary/vitrification#word-history>

Erişim tarihi: 13.11.2022.

Türkiye İstatistik Kurumu. (2022). Bitkisel Üretim İstatistikleri.
<https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=Tarim-111> Erişim tarihi: 13.11.2022.

