

Morus nigra L. (Karadut) cv. 'Ekşi Kara' 'nın Mikroçoğaltımı

Duygu ÖZELÇİ¹, Emel YİĞİT^{2*}

^{1,2}İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü /MALATYA

¹<https://orcid.org/0000-0003-1621-1980>, ²<https://orcid.org/0000-0001-6333-8437>

✉: emel-yigit@windowslive.com

ÖZET

Bu çalışmada, ülkemizin önemli gen kaynaklarından karadutun (*Morus nigra* L.), doku kültürü yöntemi ile çoğaltılması için en uygun protokolün belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için en uygun eksplant alma zamanı, kültür başlatma ve sürgün çoğaltımı için en iyi 6-Benzilaminopürin (BAP) konsantrasyonu ve köklenmeyi sağlamak için en elverişli Indol-3-Bütirik Asit (IBA) konsantrasyonu araştırılmıştır. Kültür başlatmak için Haziran ayının uygun zaman olduğu, besi ortamına 0.75 mg L⁻¹ BAP ilavesinin en iyi sonuç verdiği ve sürgün çoğaltımı için 1 mg L⁻¹ BAP'ın öne çıktığı saptanmıştır. 1.5 mg L⁻¹ IBA uygulamasında %95 köklenme başarısı elde edilmiştir. Eksplantın alınmasından aklimatizasyonun tamamlanması arasında geçen süre 20-25 hafta sürmüştür. Geliştirilen mikroçoğaltım protokolü ile sürdürülebilir, hızlı ve ekonomik çoğaltım yapılabileceği kanıtlanmıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 21.01.2021

Kabul Tarihi : 27.04.2021

Anahtar Kelimeler

Morus nigra L.

Hormon

Mikroçoğaltım

Doku kültürü

In vitro

Micropropagation of the *Morus nigra* L. (Black Mulberry) cv. 'Ekşi Kara'

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the most suitable protocol for the propagation of black mulberry (*Morus nigra* L.), one of the important gene resources of our country, by tissue culture method. For this, the most suitable explant taking time, the best concentration of 6-Benzylaminopurine (BAP) for culture initiation and the shoot propagation and the best Indole-3-Butyric Acid (IBA) concentration to achieve rooting was investigated. It was determined that June is the right time for culture initiation, 0.75 mg L⁻¹ BAP addition to the nutrient medium gives the best results and 1 mg L⁻¹ BAP comes into prominence for shoot propagation. Overall, 95% rooting success was achieved in 1.5 mg L⁻¹ IBA application. The period between the receipt of the explant and the completion of acclimatization lasted 20-25 weeks. It has been proved that sustainable, fast and economical propagation can be made with the developed micropropagation protocol.

Research Article

Article History

Received : 21.01.2021

Accepted : 27.04.2021

Keywords

Morus nigra L.

Hormone

Micropropagation

Tissue culture

In vitro

Atf İçin: Özelçi D, Yiğit E 2022. *Morus nigra* L. (Karadut) cv. 'Ekşi Kara' 'nın Mikroçoğaltımı. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 49-56. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.865910.

To Cite: Özelçi D, Yiğit E 2022. Micropropagation of the *Morus nigra* L. (Black Mulberry) cv. 'Ekşi Kara'. KSU J. Agric Nat 25 (1): 49-56. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.865910.

GİRİŞ

Morus nigra L. (Karadut), Urticales takımı, Moraceae familyası, *Morus* cinsinin içinde bulunmaktadır (Datta, 2002). Karadut, lezzetli meyvelerinin yanı sıra, peyzajda süs bitkisi olarak, ayrıca farmakolojik ve kozmetik sanayide kullanımı için de yetiştirilmektedir (Benedetta ve ark., 2007; Vijayan ve ark., 2011, Vijayan ve ark., 2012). Meyvesi bakımından değerli olan *M. nigra*'nın, *M. alba* L. (Beyaz dut) gibi fazla çeşidi yoktur. *M. nigra* türünün, İran ve Kafkaslar'dan orijinlendiği bildirilmektedir

(Gökmen, 1973). Sürgünleri koyu kahverengi, hafif tüylü olup kesildiğinde lateks salgılar. *M. nigra*'nın adaptasyon kabiliyeti iyidir. Bu özelliği sayesinde farklı iklim ve toprak şartlarına uyum yeteneği yüksek olduğu için ılıman ve subtropik iklim bölgelerinde yetişebilir.

Karadut fidan üretiminde; aşılama, hava daldırma, çelik ve doku kültürü ile çoğaltım yöntemleri kullanılmaktadır. Karadutların aşısı ile çoğaltılmasında genellikle anaç olarak yabancı beyaz dut kullanılmaktadır. Anaçların aşısı kalınlığına

gelmesi yaklaşık iki yıl sürmekte ve bu zaman kaybına neden olmaktadır. Aşı ile çoğaltılmada göz (T ve ters T) ve kalem (yarma, kakma) aşuları kullanılır. Beyaz dut anaçlarına aşılardan karadut fidanlarında aşı tuttuktan sonra aşı bölgesinde şişkinlik olarak ortaya çıkan kısmi uyuşmazlık görülebilir. Bu kısmi uyuşmazlık, ağacın erken meyveye yatmasını da etkilemektedir Çok sık görülmemekle birlikte, ileri safhalarda aşı atması olayı meydana gelebilir. (Vural ve ark., 2008; Güneş ve Çekiç, 2011). Ayrıca dutun lateks çıkarması, göz aşısında alınan aşı gözünün altında genellikle boşluk bulunması, aşı gözlerinin iri olması ve aşı uyuşmazlığı gibi nedenler aşı tutma oranının azalmasına neden olmaktadır. Genel olarak beyaz dut ve mordutlarda aşı tutma oranı %90'nın üzerindeyken karadutlarda bu oran %20-40 arasındadır (Anonim, 2010). Karadutlarda aşı ile çoğaltmanın başarısı bir yana özellikle uyuşmazlık konusu nedeniyle karadutta fidan üretiminde diğer vejetatif çoğaltım yöntemleri tercih edilmelidir.

Hava daldırması ile çoğaltma, fazla işçilik ve masraf gerektirdiğinden bu yöntem ticari üretim için yavaş ve pahalı olmaktadır. Karadutun çelikle çoğaltılmasında istenilen başarı henüz elde edilememiştir. Ayfer ve ark. (1986) ile Koyuncu ve ark. (2004) karadutun yeşil çelikle çoğaltımında, hiç köklenme sağlayamamışlardır. Karadutların çelikle çoğaltımında, farklı yöntemler kullanarak Ünal ve ark. (1992) %4-20, Özkan ve ark. (1996) %57, Koyuncu ve Şenel (2003) %0-33, Karadeniz ve Şişman (2004) %1-23 oranında köklenme elde ettiklerini bildirmişlerdir. Aşılama, hava daldırması ve çelikle çoğaltımın dezavantajları nedeniyle *in vitro* çoğaltım gibi daha avantajlı alternatif çoğaltma metodlarının araştırılması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, diğer klonal çoğaltım yöntemleri ile karşılaştırıldığında *in vitro* çoğaltım, en hızlı olanıdır (Bhojwani ve Razdan, 1996; Nas ve Read, 2004; Suttie, 2002).

Bitki organ, doku ve hücrelerinin *in vitro* koşullarda manipüle edilerek kültüre alınması ve çoğaltılması, bitki doku kültürü olarak adlandırılır. Steril şartlarda ve geliştirilmiş besi ortamı üzerinde kültüre alınmak suretiyle, bitkinin çeşitli kısımlarından (meristem, yaprak vb.), hücrelerinden veya bir hücreden tam bir bitki *in vitro* şartlarda elde edilebilir. Böylelikle, elit bitki çeşitleri klonal çoğaltılabilir, tehlike altındaki bitkiler muhafaza edilebilir, meristem kültürü ile virüsten arı bitkiler elde edilebilir, bitkisel gen kaynakları saklanabilir ya da bitki hücrelerinden sekonder metabolitler üretilebilir (Stewart, 2016). Ayrıca, piyasaya yeni sürülen çeşitlerin fidanlarının hızlı bir şekilde üreticilere dağıtılmasında önemli avantajlar sağlamaktadır. Doku kültürünün bitkilerde uygulanmasındaki amaç, bitkisel üretimde bilinen klasik yöntemlerle çözümü güç olan veya

çözümlemeyen problemlere çözüm getirmek, bitkisel üretimin ekonomik, kalite ve kantite yönünden daha yüksek olmasına yardımcı olmaktır (Hatipoğlu, 2018).

Bu araştırmanın amacı, ülkemizin önemli gen kaynaklarından karadutun (*Morus nigra* L.) doku kültürü yöntemi ile çoğaltılması için en uygun protokolü belirlemektir. Üretim için, en uygun eksplant alım zamanı, başlangıç, sürgün proliferasyonu ve köklendirme aşamaları için elverişli bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Kullanım alanları genişleyen ve ticari olarak da önemi artan karaduta olan talep son zamanlarda artmaktadır. Artan bu talebi karşılayabilecek hızda ve yeterli miktarda fidan üretimi, ülkemizde henüz bulunmamaktadır. Karadutta ticari kapama bahçe kurma ihtiyacının ortaya çıkması, fidan talebinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı hızlı çoğaltmaya imkân veren *in vitro* çoğaltım gibi alternatif metodların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

MATERYAL ve METOD

Bitki Materyalinin Alınması

Bu araştırma, 2017-2019 yıllarında Kayısı Araştırma Enstitüsü'ne ait Doku Kültürü Laboratuvarı'nda ve İnönü Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü ile birlikte koordineli bir şekilde yürütülmüştür. Araştırmada kullanılan *M. nigra* eksplantları, Kayısı Araştırma Enstitüsü arazisinde bulunan Ülkesel Dut Genetik Kaynakları Parseli'ndeki karadutun tescilli tek çeşidi olan "Ekşi kara" çeşidinden temin edilmiştir.

Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu

Doku kültürü, bütün aşamaların aseptik koşullarda yapılması gerektiği ve sterilizasyonun çok önemli olduğu çalışmalardır. Çalışmada, polikarbonat gövdeli ve polipropilen kapaklı kültür kapları (Magenta Vessel GA-7) kullanılmıştır. Pens ve bisturiler her kullanımdan önce alüminyum folyoya sarılarak otoklavda sterilize edilerek kullanılmıştır. Araştırmada inokulasyon işlemleri için steril kabin kullanılmıştır.

Eksplantların Alınması

Eksplantlar, *M. nigra*'nın *in vitro* çoğaltımında uygun vejetasyon dönemini belirlemek için; Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında bir yıllık sürgünlerdeki nodal tomurcuklardan alınmıştır. Sürgünlerin uç kısımlarından 5-10 cm uzunluğunda çeliklerden yararlanılmıştır. Çelikler alındıktan sonra, saf su içerisine konulup hızla doku kültürü laboratuvarına getirilerek sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.

Yüzey Sterilizasyonu

Çelikler laboratuvara getirildikten sonra yapraklar kesilerek sürgünden uzaklaştırılmıştır. Çelikler nodyumları içerecek şekilde 2-3 cm boyunda kesilerek mikroçelikler elde edilmiştir (Şekil 1). Mikroçeliklerin üst kısmı alt tarafa göre daha kısa bırakılmıştır. Tüm eksplantlar 3 kez saf suda yıkandıktan sonra sterilizasyon aşamalarına steril kabinde devam edilmiştir. Eksplantlar %3'lük CuSO_4 çözeltisinde,



Şekil 1. Sürgünlerin alınması ve sterilizasyona hazırlanması
Figure 1. Taking shoots and preparing them for sterilization

Başlangıç Kültürü Aşaması

Kültürü başlatma aşamasında; 4.4 g L^{-1} vitaminli Murashige ve Skoog (MS, M0222 Duchefa) 30 g L^{-1} sukroz, 7 g L^{-1} agar, 0.01 mg L^{-1} indol-3-bütirik asit (IBA), 0.2 mg L^{-1} giberellik asit (GA_3), 3 mg L^{-1} AgNO_3 , 0.5 mg L^{-1} Proclin içeren besi ortamı kullanılmıştır. Ayrıca 6-Benzilaminopürin (BAP)'ın tomurcukların sürmesi üzerine etkisini belirlemek için besi ortamına 0.75, 1 ve 3 mg L^{-1} konsantrasyonlarında BAP eklenmiştir. Besi ortamlarının pH'sı, 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH kullanılarak 5.75'e ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamlar, manyetik karıştırıcı üzerinde agar tamamen eriyinceye kadar tutularak kültür kaplarına yaklaşık 15 mL olacak şekilde doldurularak 121 °C'de 1.1 atm basınçta 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Her kaptaki dört eksplant olacak şekilde dikim yapılmıştır. Dikim sonrası 4 hafta süreyle 25±1°C'de, 16 saat fotoperiyotta, 4000 lux floresan lamba altında kültüre alınmıştır. 4 haftalık gelişme periyodu sonunda sürgün çoğaltım aşamasına transfer edilmiştir.

Sürgün Çoğaltımı Aşaması

Sürgün çoğaltım aşamasında, başlangıç ortamından elde edilen sağlıklı sürgünler kullanılmıştır. 4.4 g L^{-1} MS, 30 g L^{-1} sukroz, 7 g L^{-1} agar, 0.01 mg L^{-1} IBA, 0.2 mg L^{-1} GA_3 , 3 mg L^{-1} AgNO_3 , 0.5 mg L^{-1} Proclin içeren besi ortamında sürgünlerin gelişmesi sağlanmıştır. Ayrıca sürgün çoğaltımında uygun BAP konsantrasyonunu belirlemek için besi ortamına 0.75, 1 ve 3 mg L^{-1} konsantrasyonlarında BAP ilave edilmiştir. Besin ortamlarının pH'sı, 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH kullanılarak 5.75'e ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamlar kültür kaplarına doldurularak ve 121 °C'de 1.1 atm basınçta 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Sürgünler 4 hafta süreyle 25±1

manyetik karıştırıcıda çalkalanarak 20 dk bekletilmiş, daha sonra %70'lik etil alkolde ise 1 dk tutulmuştur. Bu uygulamalardan sonra steril saf su ile çalkalanan eksplantlar, %30'luk NaOCl ve 5-6 damla Tween 20 içeren çözeltiye alınarak burada 15 dk tutulmuştur. %5 Proclin (ProClin 200, Sigma) içeren suda 5 dk bekletildikten sonra 3'er kez 5 dk olacak şekilde steril saf su ile yıkanarak yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

°C'de, 16 saat fotoperiyotta floresan lamba altında kültüre alınmıştır.

Köklendirme Aşaması

Köklendirme aşamasında, 4.4 g L^{-1} MS, 30 g L^{-1} sukroz, 7 g L^{-1} agar, 3 mg L^{-1} AgNO_3 , 0.5 mg L^{-1} Proclin içeren besi ortamı kullanılmıştır. Ayrıca besi ortamına, köklenmede uygun IBA dozunu belirlemek üzere 0.5, 1.5 ve 2.5 mg L^{-1} konsantrasyonlarında IBA eklenmiştir.

Kültür başlatma ve sürgün çoğaltım aşamasında eklenen 0.01 mg L^{-1} IBA, 0.2 mg L^{-1} GA_3 ile kültür başlatma, sürgün çoğaltımı ve köklenme aşamalarında eklenen 3 mg L^{-1} AgNO_3 , 0.5 mg L^{-1} proclin sabit tutulmuştur, sadece BAP ve IBA konsantrasyonları değişmiştir.

Aklimatizasyon Aşaması

In vitro koşullarda köklendirilen bitkiler, aklimatizasyona alınmıştır. Köklenmiş bitkiler, akan musluk suyu altında yıkanarak besi yeri kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Bu işlem, mikroorganizma kaynaklı çürümelere en aza indirmek için yapılmıştır. Aklimatizasyon kabı olarak altına tek delik açılmış plastik bardak kullanılmıştır. Ortam harcı olarak otoklavlanmış %80 torf %20 perlit karışımı kullanılmıştır. Bitkiler, plastik bardaklara dikildikten sonra otoklavlanmış distile su ile sulanmıştır ve boş bir plastik bardak ile üzeri kapatılmıştır. 3 hafta sonra kademeli olarak üzeri açılarak aklimatizasyon aşaması tamamlanmıştır.

İstatistiksel Analizler

Araştırmada elde edilen verilerin analizleri, SPSS (Statistical Program in Social Sciences) 25 programı ile gerçekleştirilmiştir. Test sonuçları için, anlamlılık

düzeyi (p) 0.05 olarak alınmıştır. Çalışmada verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk Testi ile, varyansların homojenliği ise LEVENE testi ile kontrol edilmiştir. Veriler normal dağılım sağladığı için, çok gruplu değişkenlerin analizinde parametrik test yöntemlerinden ANOVA testi kullanılmış ve gruplar arası ikili karşılaştırmalar için Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Tekrarlı gözleme sahip verilerde ise, tekrarlayan ölçümlerde ANOVA analizi yapılmış çoklu karşılaştırmalarda ise, LSD Testi kullanılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Yüzey Sterilizasyonu ve Başlangıç Kültürü

Aylara ve BAP konsantrasyonlarına bağlı sterilizasyon ve kültür başlatma sonuçlarının saptanan değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında alınan eksplantlar, aynı sterilizasyon yöntemine tabi tutulmuştur. Haziran ayında başlatılan kültürler %91 sürme ve %8.67 kontaminasyon oranı ile daha başarılı bulunmuştur. Ağustos ayında kontaminasyon oranı

%13.33 ile en yüksek ve sürme oranı %79.33 ile en düşük saptanmıştır. Bu durum, Temmuz ve Ağustos aylarında karadut ağaçlarında tomurcukların büyüerek tomurcuk pullarında daha fazla toz tutması ve artan sıcaklığa bağlı inhibitör hormonların bitkide sentezi ile olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca bu aylarda sürgünler tüylerle kaplanarak kalınlaşmıştır. Tüylerin tuttuğu mikroorganizmalar, besi ortamında çoğalmaları için uygun koşul bularak hızla çoğalmıştır. Kışın yaprağını döken türlerin yeşil çelikleri için en iyi sonuçlar genellikle, çeliklerin mümkün olduğu kadar erken alınmasıyla elde edilir. Ancak bu sırada yapraklar tam bütünlüğünü almış ve sürgünler bir dereceye kadar olgunlaşmış olmalıdır. Birçok elma çeşitlerinde, yeşil çeliklerin köklenmesi üzerinde yapılan araştırmalarda, köklenmeyi uyarıcı kimyasal maddelerin optimum etkilerinde, çelik yaşının bir ay artmasıyla bile azalma olduğu bulunmuştur. En iyi sonuç, çeliklerin Mayıs ayında, sürgünler 10-17 cm boyunda iken alınmaları halinde elde edilmiştir (Hartman ve Kester, 1975).

Çizelge 1. Başlangıç kültürü sonuçlarının BAP değerlerine göre değişimi
Table 1. Change of culture initiation results by BAP values

Gruplar Groups	Aylar Months	0.75 mg L ⁻¹ BAP 0.75 mg L ⁻¹ BAP	1 mg L ⁻¹ BAP 1 mg L ⁻¹ BAP	3 mg L ⁻¹ BAP 3 mg L ⁻¹ BAP	BAP (A) p değeri BAP (A) p value	Aylar (B) p değeri Months (B) p value	BAP*Aylar (A*B) p değeri BAP *Months (A*B) p value
Sürme oranı (%) Sprout rate (%)	Haziran	a91.0 ± 1.0a	a88 ± 1b	a85.0 ± 1.0a	0.001*	0.001*	0.134**
	Temmuz	b88.0 ± 2.0a	b85 ± 1b	b79.67 ± 0.58a			
	Ağustos	c84.33 ± 1.15a	c83 ± 2b	c79.33 ± 0.58a			
Kontaminasyon oranı (%) Contamination rate (%)	Haziran	a8.67 ± 0.58a	a10.33 ± 1.53b	a9.0 ± 1.0ab	0.001*	0.030*	0.080**
	Temmuz	b10.0 ± 1.0a	b14.33 ± 1.53b	b13.67 ± 0.58c			
	Ağustos	c13.33 ± 1.53a	c15.0 ± 2.0b	c13.33 ± 0.58c			
Sürgün uzunluğu (mm) Shoot length (mm)	Haziran	a24.0 ± 1.0a	a22.0 ± 1.0a	a15.33 ± 0.58b	0.001*	0.001*	0.089**
	Temmuz	b22.33 ± 0.58a	b22.0 ± 1.0b	b16.67 ± 0.58a			
	Ağustos	c21.67 ± 0.58a	c21.67 ± 0.58a	c15.33 ± 0.58a			
Sürgün sayısı (Adet) Shoot number	Haziran	a3.67 ± 0.58a	a2.67 ± 0.58a	a1.33 ± 0.58a	0.001*	0.001*	0.932**
	Temmuz	b2.67 ± 0.58a	b2.33 ± 0.58a	a1.33 ± 0.58a			
	Ağustos	c3.0 ± 0.0a	c2.0 ± 0.0a	a1.33 ± 0.58b			
Boğum sayısı (Adet) Node number	Haziran	a2.67 ± 0.58a	a2.33 ± 0.58a	a2.33 ± 0.58a	0.001*	0.001*	0.513**
	Temmuz	b3.0 ± 1.0a	a2.33 ± 0.58b	b2.0 ± 1.0a			
	Ağustos	c3.67 ± 0.58.0a	b2.0 ± 0.0b	b2.0 ± 1.0c			

p değeri; Tekrarlı ölçümlerde ANOVA testi sonucu. *p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. **p>0.05 istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. Sol tarafta yer alan harfler aylara göre değişimi gösterirken, sağ tarafta yer alan harfler gruplar arası değişimi göstermektedir.

p value; ANOVA test result in repeated measurements. * p <0.05 statistically significant difference, ** p > 0.05 no statistically significant difference. While the letters on the left show the change according to the months, the letters on the right show the change between groups.

Kültürde kullanılan 0.75 mg L⁻¹ BAP dozunun, en iyi sürme oranı, sürgün uzunluğu, sürgün sayısı ve boğum sayısı ile etkili olduğu saptandı. BAP konsantrasyonunun artması sürgünlerin daha kısa olmasına neden olurken yaprak alanını artırdığı

gözlemlendi. 3 mg L⁻¹ BAP içeren besi ortamında çoğaltılan eksplantlarda en kısa sürgünler ölçüldü. Balakrishnan ve ark. (2009) *M. alba*'nın nodal tomurcuklarını kullanarak yaptıkları çalışmada, besin ortamındaki BAP konsantrasyonu arttıkça

sürgün uzunluğunda azalma olduğunu bildirmişlerdir. Ahalya ve ark. (2020) farklı dut genotiplerinden (*Morus* spp.) alınan nodal eksplantların sürme oranını, en yüksek M-5 genotipinde %83 ile 1 mg L⁻¹ BAP ve 1 mg L⁻¹ NAA dozlarını içeren MS besi ortamında bulmuşlardır. En düşük sürme oranının ise % 56 ile Mysore genotipinde, 0.5 mg L⁻¹ BAP ve 1 mg L⁻¹ NAA dozlarını içeren ortamda bulunduğunu belirtmektedirler. Araştırmacılar, tomurcukların sürme oranının, genotipik farklılığa ve bitki büyüme düzenleyicilerin konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmektedirler.

Sürgün Çoğaltımı

Sürgün çoğaltımında farklı BAP konsantrasyonlarının etkisi Çizelge 2’te verilmiştir (Şekil 2).

Besi ortamına eklenen BAP konsantrasyonunun artması vitrifikasyon oranını artırmıştır. 3 mg L⁻¹ BAP uygulamasında %9.67 ile en yüksek vitrifikasyon oranı, 22.6 mm ile en düşük sürgün uzunluğu ve 2.33 adet ile en düşük boğum sayısı bulunmuştur. Sürgün uzunluğunun en yüksek 30.87 mm ve boğum sayısının en fazla 5.3 adet olması ile

sürgün çoğaltımı için uygun konsantrasyonunun 1 mg L⁻¹ BAP olduğu belirlenmiştir. Gogoi ve ark. (2017) *M. indica*’nın çoğaltımında, nodal eksplant kullanmışlardır. Sürgün çoğaltımı için MS besi ortamına 0.5, 1, 1.5, 2 ve 2.5 mg L⁻¹ BAP eklemişlerdir. Bu araştırmaya benzer olarak, BAP konsantrasyonunun artması ile, sürgün uzunluğunu azaldığını, en uzun sürgünün (2 cm) 0.5 mg L⁻¹ BAP ve en kısa sürgünün ise (1.2 cm) 2.5 mg L⁻¹ BAP ilavesinde gözlemişlerdir. İnternodyum sayısı en fazla (4.2 adet) 1.5 mg L⁻¹ BAP, en az (3.3 adet) ise 2.5 mg L⁻¹ BAP konsantrasyonunda bulmuşlardır. Zaki ve ark. (2011) *M. nigra* bitkisinin *in vitro* çoğaltımında, MS besi ortamına eklenen 0.5 mg L⁻¹ ve 1.5 mg L⁻¹ BAP dozlarının sürgün proliferasyon oranlarını sırası ile %80 ve %90 olarak belirlemişlerdir. Araştırma bulgularına göre sürgün proliferasyon oranları her üç ayda da yüksek bulunmuştur. En yüksek değer, Haziran ayında 0.75 mg L⁻¹ BAP uygulanan grupta %91 olarak saptanmıştır (Çizelge 1). Odunsu bitkilerin *in vitro* koşullardaki çoğaltımında BAP konsantrasyonunun yanı sıra bitkilerin besi ortamına tutunmasını sağlayan agar gibi jel yapıcı maddeler de vitrifikasyona sebep olabilmektedir.

Çizelge 2. Sürgün çoğaltımının BAP değerlerine göre değişimi

Table 2. Change of shoot propagation according to BAP values

Gruplar Groups	0.75 mg L ⁻¹ BAP 0.75 mg L ⁻¹ BAP	1 mg L ⁻¹ BAP 1 mg L ⁻¹ BAP	3 mg L ⁻¹ BAP 3 mg L ⁻¹ BAP
Alt kültüre alınabilir eksplant (%) Explant that can be subcultured (%)	a95.33 ± 1.15	a94.33 ± 2.08	b85.00 ± 1.00
Vitrifikasyon oranı (%) Vitrification rate (%)	a2.33 ± 0.58	a2.67 ± 0.58	b9.67 ± 0.58
Sürgün uzunluğu (mm) Shoot length (mm)	a27.9 ± 0.26	b30.87 ± 0.91	c22.6 ± 0.36
Boğum sayısı (adet) Node number	a3.33 ± 0.58	b5.33 ± 0.58	a2.33 ± 0.58

Harfler satır içindeki değişimleri göstermektedir.

Letters indicate the changes within the line.



Şekil 2. *M. nigra*’da sürgün çoğaltımı
Figure 2. Shoot propagation in *M. nigra*

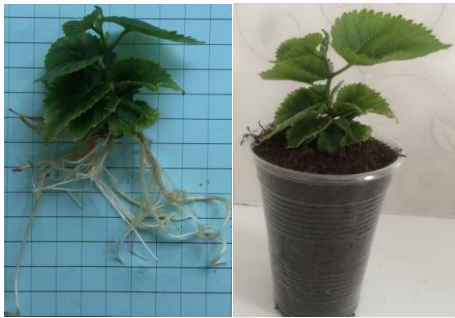
Ekşi kara çeşidinde boğum sayısı değişimi en yüksek 1 mg L⁻¹ BAP grubunda 5.33 adet olup, en düşük ise 3 mg L⁻¹ BAP grubunda 2.33 adet ölçülmüştür. Đurkovič ve ark. (2012) *M. nigra*’da sürgün proliferasyonunda MS besi ortamına eklenen 0.5 mg L⁻¹ BAP ve 0.1 mg L⁻¹ IBA kombinasyonunun en iyi sonuç verdiğini; Mn1 genotipinde 5.3 adet/sürgün ve Mn2 genotipinde 6.9 adet/sürgün elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yıldız ve Yılmaz (1999) *M. nigra*’nın

doku kültürü ile çoğaltımında MS besi ortamına 5 mg L⁻¹ kinetin ilavesi ile eksplant başına en fazla sürgün (4.1 adet) saptamışlardır. Kalkışım ve ark. (2013) *M. nigra*’nın çoğaltımı için MS besi ortamına 1.0 ve 2.0 mg L⁻¹ BAP eklenmesinin; rejenerasyonu, sürgün sayısını, sürgün uzunluğunu ve yaprak sayısını artırdığını bildirmişlerdir. Araştırma bulgularına göre sürgün sayısı, en yüksek 3.67 adet olarak 0.75 mg L⁻¹ BAP uygulanan grupta saptanmıştır.

Çeşitli dut türleri ile yapılan çalışmalarda; sürgün gelişimi ve çoğaltımı için BAP diğer sitokininler ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu belirlenmiştir (Yadav ve ark. 1990; Pattnaik ve Chand 1997). Bununla birlikte yüksek BAP konsantrasyonunun sürgün çoğaltımını engellediği, düşük konsantrasyonlarda daha başarılı sonuçların elde edildiği belirtilmektedir (Bhau ve Wakhlu 2003; Channuntapipat ve ark. 2003; Rugini ve Verma 1983; Tabachnik ve Kester 1977). *M. nigra*'nın sürgün ucu ve koltuk tomurcuğu eksplantlarında en iyi sürgün gelişiminin 1 mg L⁻¹ BAP uygulamasında elde edildiğini belirtmektedir (Yadav ve ark., 1990). Dagman (2019) Myrobolan anacının mikroçoğaltımında 1 mg L⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında kardeş sayısını 5.25 adet/ bitki ve sürgün boyunu 2.25 cm ölçmüştür. Yapılan çalışmada da benzer şekilde 0.75 mg L⁻¹ BAP uygulanan gruplarda karadutun gelişiminin daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Köklendirme

Köklenme üzerine IBA konsantrasyonlarının etkisi, Çizelge 3'de verilmiştir. *In vitro*'da bitkicikler 3-4 haftada köklenmişlerdir (Şekil 3).



Şekil 3. *M. nigra*'da köklendirme

Çizelge 3. Köklendirme sonuçlarının IBA konsantrasyonlarına göre değişimi

Table 3. Variation of rooting results according to IBA concentrations

Gruplar Groups	0.75 mg L ⁻¹ IBA 0.75 mg L ⁻¹ IBA	1.5 mg L ⁻¹ IBA 1.5 mg L ⁻¹ IBA	2.5 mg L ⁻¹ IBA 2.5 mg L ⁻¹ IBA
Köklenme oranı (%) <i>Rooting rate (%)</i>	ab92.00 ± 1.00	a95.00 ± 1.00	b87.33 ± 3.06
Kök uzunluğu (mm) <i>Root length (mm)</i>	a52.8 ± 1.11	b66.6 ± 1.18	c55.83 ± 0.57
Sürgün uzunluğu (mm) <i>Shoot length (mm)</i>	a34.97 ± 1.00	b52.5 ± 1.50	a34.37 ± 1.27
Kök sayısı/Sürgün (Adet) <i>Root Number/Shoot (Number)</i>	ab5.33 ± 0.58	a6.67 ± 0.58	b4.67 ± 0.58

Harfler satır içindeki değişimleri göstermektedir.

Letters indicate the changes within the line.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Karadutun gıda sanayisinde ön plana çıkması ve antosiyanin içeriği ile ilaç sanayisinde kullanılması, karadut yetiştiriciliğine talebi artırmıştır. Diğer çoğaltım yöntemleri ile karşılaştırıldığında, birçok avantajı bulunan *in vitro* çoğaltım için en uygun yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Karadutun mikroçoğaltım protokolünün belirlendiği bu çalışmada, eksplant olarak nodal tomurcuklar kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre,

Figure 3. Rooting in *M. nigra*

En iyi köklenme oranı %95 ile 1.5 mg L⁻¹ IBA uygulamasında tespit edilmiştir. Bu konsantrasyon; sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğu kriterleri ile de önemli bulunmuştur. Kök uzunluğu değişiminde en düşük değer, 52.8 mm ile 0.75 mg L⁻¹ IBA grubunda olup, en yüksek değer 66.6 mm ile 1.5 mg L⁻¹ IBA grubunda ölçülmüştür. Sürgün uzunluğu değişiminde en yüksek değer, 52.5 mm ile 1.5 mg L⁻¹ IBA grubunda olup, en düşük değer ise 34.37 mm ile 3 mg L⁻¹ IBA grubunda ölçülmüştür. Kök sayısı/sürgün değişiminde en düşük değer, 3 mg L⁻¹ IBA grubunda 4.67 adet iken en yüksek değer 1.5 mg L⁻¹ IBA grubunda 6.67 adet olarak ölçülmüştür.

Özkul (2014) urmu dutunun (*M. nigra*) çoğaltımında %84 köklenme oranı ile 1 mg L⁻¹ IBA'nın köklenme için en uygun doz olduğu bildirmiştir. Habib ve ark. (2003) *M. alba*'nın çoğaltımı üzerine yaptıkları çalışmada, en yüksek köklenmeyi MS ortamında, 0.5 mg L⁻¹ IBA uygulamasında elde etmişlerdir. Şengül (2012) *M. nigra*'nın *in vitro* köklendirilmesinde, MS besi ortamına eklenen 0.5 mg L⁻¹ IBA ile %29.6 köklenme başarısı sağladığını, 1 mg L⁻¹ IBA'da başarının %25'e düştüğünü bildirmiştir. 0.5 mg L⁻¹ IBA uygulamasının 3.8 adet kök sayısı, 67.2 mm kök uzunluğu ve 24.8 mm sürgün uzunluğu ile daha başarılı olduğunu belirtmektedir. Gökdere (2019) *Prunus domestica*'nın köklendirilmesinde, IBA konsantrasyonunun kök sayısı üzerine etkisini araştırıldığı çalışmada kök sayısını, 0.3 mg L⁻¹ IBA uygulamasında 1.25 adet, 1 mg L⁻¹ IBA'da 2.5 adet ve 2 mg L⁻¹ IBA'da ise 2 adet olarak saptamıştır. Ekşi kara çeşidinde *in vitro* ortamda kök gelişimi için, 1.5 mg L⁻¹ IBA uygulamasının en uygun konsantrasyon olduğu bulunmuştur (Çizelge 3).

eksplantların alınması için Haziran ayının uygun olduğu, kültür başlatma için 0.75 mg L⁻¹ BAP, sürgün çoğaltımı için 1 mg L⁻¹ BAP ve köklenme için 1.5 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonlarının uygun olduğu belirlenmiştir. Doku kültüründe nodal eksplanttan bu mikroçoğaltım protokolü kullanılarak 20-25 haftada tam bir bitki elde edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada karadutun mikroçoğaltım yöntemi ile hızlı çoğaltılması için uygun protokolün bulunduğunu ve bundan sonra yapılacak araştırmalar için

bulguların bilim insanlarına önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Duygu ÖZELÇİ'nin doktora tezinin bir bölümüdür. Araştırmayı maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje birimine (Proje No FDK-2017-682), Laboratuvar imkanları ve örneklerin temininin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Kayısı Araştırma Enstitüsü'ne teşekkür ederiz.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Anonim 2010. Tarımsal yapı (üretim, fiyat, değer). T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü.
- Ahalya, BN 2020. Varietal response for *in vitro* shoot development in mulberry (*Morus* spp.). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 9(4): 1405-1407.
- Ayfer M, Gülşen Y, Kantarcı M 1986. Ayaş dutunun çelikle çoğaltımı üzerine bir araştırma. Ank. Ü. Ziraat Fak. Yıllığı, 35: 289-297.
- Balakrishnan V, Ram Latha M, Ravindran KC, Philip Robinson J 2009. Clonal propagation of *Morus alba* L. through nodal and axillary bud explants. Botany Research International, 2 (1): 42-49.
- Benedetta C, Germana P, Germana MA 2007. *In vitro* response of two Sicilian genotypes of *Morus* (L.) through axillary bud culture. Caryologia, 60(1-2): 178-181.
- Bhau BS, Wakhlu AK 2003. Rapid micropropagation of five cultivars of mulberry. Biologia Plantarum, 46 (3):349-355.
- Bhojwani SS, Razdan MK 1996. Plant tissue culture: Theory and practice, a revised edition. Elsevier: Amsterdam, S. 1-766.
- Channuntapipat C, Wirthensohn M, Ramesh SA, Battle I, Arus P, Sedgly M, Collins G 2003. Identification of incompatibility in genotypes of almond (*Prunus dulcis*) using specific primers based on the intrones of the s-alleles. Plant Breed., 122: 164- 168.
- Dagman FHA 2019. Bazı meyve anaçlarının klasik doku kültürü ve yeni nesil geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile mikroçoğaltımı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 62 sy.
- Datta RK 2002. Mulberry cultivation and utilization in India. Mulberry for animal production. FAO

- animal production and health paper, 147: 45-62.
- Đurković J, Kaňuchová A., Kačík F, Solár R, Lengyelová A 2012. Genotype-and age-dependent patterns of lignin and cellulose in regenerants derived from 80-year-old trees of black mulberry (*Morus nigra* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC): 108(3): 359-370.
- Gogoi G, Borua PK, Al-Khayri JM 2017. Improved micropropagation and *in vitro* fruiting of *Morus indica* L.(K-2 cultivar). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15(1): 249-256.
- Gökdere S 2019. *In vitro* sürgün ucu yöntemiyle erik (*Prunus domestica* l.) anacının klonal çoğaltımı. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 56 sy.
- Gökmen H 1973. Kapalı tohumlular. Şark Matbaası. Ankara, 1, 186-190.
- Güneş M, Çekiç Ç 2011. Effects of various rootstocks, budding times and techniques on budding success of black mulberry. Propagation of Ornamental Plants, 11(1): 44-46.
- Habib A, Ali MR, Amin MN, Rahman MM 2003. Clonal propagation of white mulberry (*Morus alba* L.) using *in vitro* technique. Journal of Biological Sciences 3 (12): 1181-1187.
- Hartman HT, Kester DE 1975. Plant propagation principles and practices, 3rd ed. Prentice-Hall. INC. U.S.A.
- Hatipoğlu R 2018. Bitki biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190. Ders kitapları yayın no: A-58.
- Kalkışım Ö, Turan A, Azeri FN, Özdeş D 2013. Kara dut (*Morus nigra* L.) bitkisinin *in vitro* çoğaltımı. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 3(2): 77-84.
- Karadeniz T, Şişman T 2004. Beyaz dut ve karadutun meyve özellikleri ve çelikle çoğaltılması. Ulusal Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu Kitabı, Trabzon, S: 428 - 432.
- Koyuncu F, Şenel E 2003. Rooting of black mulberry (*Morus nigra* L.) hardwood cuttings. J. Fruit Ornament. Plant Res., 11: 53-57.
- Koyuncu F, Vural E, Çelik M 2004. Kara dut (*Morus nigra* L.) çeliklerinin köklendirilmesi üzerine araştırmalar. Ulusal Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu Kitabı, s: 424-427, Trabzon.
- Nas MN, Read PE 2004. Hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. Sci. Hort. 101: 189-200.
- Özkan Y, Arslan A 1996. Kara dut'un (*Morus nigra* L.) odun ve yeşil çelikle çoğaltılması üzerine araştırmalar. GOP Ü. Ziraat Fak. Dergisi, 13(1): 15-27.
- Özkul M 2014. Urmu dutunun (*Morus nigra* L.) *in vitro* mikroçoğaltımı. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe

- Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 67 sy.
- Pattnaik SK, Chand PK 1997. Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *M. lhou* Koiz. and *M. serrata* Roxb., through *in vitro* culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees. Plant Cell Rep. 16: 503-508.
- Rugini E, Verma DC 1983. Micropropagation of a difficult-to-propagate almond (*Prunus amygdalus*, Batsch) cultivar. Plant Sci. Lett. 28: 273-281.
- Stewart N 2016. Bitki biyoteknolojisi ve genetik İlkeler, teknikler ve uygulamalar (Çev. H.A. Öktem, M.Yücel). Nobel Akademik Yayıncılık. (orijinal yayın tarihi 2008).
- Suttie JM 2002. *Morus alba* L. (http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRI_CULT/AGP/agpc/doc/GBASE/data/pf000542.htm).
- Şengül E 2012. Karadutun (*Morus nigra* L.) *in vitro* çoğaltımı. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 60 sy.
- Tabachnik L, Kester DE 1977. Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones *in vitro*. HortScience 12: 545-547.
- Ünal A, Özçağırın R, Hepaksoy S 1992. Karadut ve mordut çeşitlerinde odun çeliklerinin köklenmesi üzerinde bir araştırma. Türkiye, İzmir, I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 13- 16 Ekim 1992, Cilt 1, 267-270. Vijayan K, Tikader A, Weiguo Z, Nair CV, Ercisli S, Tsou CH 2011. *Morus*. In wild crop relatives: genomic and breeding resources (pp. 75-95). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Vijayan K, Srivastava PP, Raju PJ, Saratchandra B 2012. Breeding for higher productivity in mulberry, Czech J. Genet. Plant Breed. 48:147-156.
- Vural U, Dumanoğlu H, Erdoğan V 2008. Effect of grafting/budding techniques and time on propagation of black mulberry (*Morus nigra* L.) in cold temperate zones. Propagation of Ornamental Plants, 8(2): 55-58.
- Yadav U, Lal M, Jaiswal VS 1990. Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees. Scientia Horticulturæ, 44(1-2): 61-67.
- Yıldız K, Yılmaz H 1999. *In vitro* kültüre alınan karadut (*Morus nigra* L.) eksplantlarında farklı hormon ve dozlarının sürgün oluşumuna etkileri üzerinde bir araştırma. 11. Kükem-Biyoteknoloji Kongresi Özel Sayısı, 23 (2): 211-216.
- Zaki M, Kaloo ZA, Sofi MS 2011. Micropropagation of *Morus nigra* L. from nodal segments with axillary buds. World Journal of Agricultural Sciences, 7(4): 496-503.