


MS besin ortamında Buttumun (*Pistacia khinjuk* Stocks) azot kullanım verimliliği

Yusuf ERSALİ¹

¹ Gıda İşleme Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu, Batman Üniversitesi, Batman, Türkiye

✉: yusufersalian@gmail.com  0000-0003-4848-5943

Geliş (Received): 14.03.2024

Düzeltilme (Revision): 27.05.2024

Kabul (Accepted): 01.07.2024

ÖZ

Pistacia khinjuk (Buttum) türü Antep fıstığının doğal bir anaç türüdür. *P. khinjuk*'un tohum ve gövde çelikleriyle çoğaltılmasının zorluğu, sürgünlerin mikroçoğaltılmasını iyi bir seçenek haline getirmektedir. Bu çalışmada *P. khinjuk*'un mikroçoğaltımını daha verimli ve ekonomik hale getirmek amacıyla amonyum nitrat, oksin ve sitokin çeşitleri ve miktarları optimize edilmiştir. Bu amaçla, *P. khinjuk* türünün sürgün ucu kültürü ile mikroçoğaltımında Murashige ve Skoog (MS) temel besin ortamına NH_4NO_3 'ün 1650, 825, 412.5 ve 206.25 mg/L düzeylerinde katılmasının sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Sürgün çoğaltım aşamasında sitokinlerden, benzil amino pürin (BAP), 6-furfurilaminopurin (kinetin) ve 2-izopentil adenin (2-IP), sürgünlerin köklendirilmesi aşamasında oksinlerden, naftalen asetik asit (NAA), indol butirik asit (IBA) ve indol asetik asit (IAA) kullanılmıştır. Sonuçlarımıza göre, sürgün çoğaltım aşamasında en yüksek eksplant başına düşen sürgün sayısı (1.79), 0.5 mg/L BAP, ortalama sürgün uzunluğu (17.43 mm), 1 mg/L 2-IP ve total çözülebilir protein ise (3.35 mg/g) 2 mg/L BAP destekli 825 mg/L NH_4NO_3 içeren MS ortamından elde edilmiştir. Sürgünlerin *in vitro* köklendirilmesinde köklenme oranı (% 81), eksplant başına düşen kök sayısı (4.25) ve total çözülebilir protein miktarı (3.25 mg/g) 0.5 mg/L NAA, ortalama kök uzunluğu ise (18.30 mm) 2mg/L IBA destekli 412.5 mg/L NH_4NO_3 içeren MS besin ortamında en yüksek değerde olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Amonyum Nitrat, Çözülebilir Protein, MS, NAA

Nitrogen use efficiency of Buttum (*Pistacia khinjuk* Stocks) on MS nutrient medium

ABSTRACT

Pistacia khinjuk (Buttum) species is a native rootstock plant species of pistachio. The difficulty of seed and stem cuttings propagation of *P. khinjuk* make shoot micropropagation a good option for this species. In this study, the amount of ammonium nitrate, the types and amount of auxin and cytokinins have been optimized in order to make the micropropagation of *P. khinjuk* more efficient and economical. For this purpose, different amounts of NH_4NO_3 (1650, 825, 412.5 and 206.25 mg/L) were added to basic nutrient medium of Murashige and Skoog (MS) to investigate propagation and rooting of shoot of *P. khinjuk* species. For the shoot micropropagation stage cytokinins, benzylamino purine (BAP), 6-furfurilaminopurine (Kinetin) and 2-isopentyl adenine (2-IP), and for the rooting stage of the shoots auxins, naphthalene acetic acid (NAA), indole butyric acid (IBA) and indole acetic acid (IAA) were used. As our results, in the shoot micropropagation stage, the highest number of shoots per explant (1.79) in 0.5 mg/L BAP, average shoot length (17.43 mm) in 1 mg/L 2-IP and total soluble protein (3.35 mg/g) in 2 mg/L BAP medium were obtained from MS medium containing 825 mg/L NH_4NO_3 . In rooting of shoot, the highest value of rooting rate (81%), number of roots per explant (4.25) and total soluble protein (3.25 mg/g) in 0.5 mg/L NAA medium the average root length (18.30 mm) in 2mg/L IBA medium were observed in MS medium containing 412.5 mg/L NH_4NO_3 .

Keywords: Ammonium Nitrate, MS, NAA, Soluble Protein

GİRİŞ

Azot (NH_4^+ , NO_3^-), en önemli makro besin elementlerinden biridir ve bitki büyümesi ve gelişmesinde hayati rol oynayan protein, nükleik asit, enzim kofaktörleri ve sekonder metabolitlerin ana bileşenidir. Uygun azot formu ve yeterli azot temini, optimum bitki büyümesinde dikkat edilen parametrelerin başında gelmektedir [1]. Bunun yanında bitki

beslenmesinde aşırı azot kaynaklarının oluşturduğu toksisiteye Campos ve ark. [2] tarafından değinilmiştir. Doku kültürü metodu, hem araştırma amaçlı hem de ticari amaçlı bitki çoğaltımı için oldukça hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Doku kültüründe başarının elde edilmesi sürgün çoğaltımında ve sürgünlerin köklendirilmesinde optimum kültür ortamının bulunması, mikroçoğaltım işleminin tamamlanması açısından oldukça önemlidir [3]. Besin ortamı içerik

maddeleri, farklı beslenme veya bitki büyüme düzenleyicileri gereksinimleri nedeniyle türden türe farklılık gösterebilir. Bu nedenle kültüre alınan türlerin sürgün çoğaltımı ve köklendirme aşamasında etkili çoğaltım sonuçlarının elde edilmesi için, farklı bazal tuz formülasyonlarının, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin veya ortamdaki değişen mineral konsantrasyonlarının test edilmesi gereklidir [4].

Bitkilerde aşırı amonyum enzimatik aktivitenin azalmasına ve bitkinin morfolojik ve fizyolojik özelliklerinde değişikliğe neden olan makro moleküllere (protein, lipit, nükleik asit) zarar vererek etkisini göstermektedir [5]. Ayrıca aşırı azot (NH_4^+ , NO_3^-), K^+ , Ca^{2+} ve Mg^{2+} gibi diğer katyonlarla rekabet ederek bu besinlerin emilimini azaltmaktadır [6]. Bununla birlikte, optimum azot konsantrasyonlarında, özellikle bitkilerin daha fazla büyümesini teşvik eden daha büyük bir fizyolojik ve beslenme aktivitesi gösterdiği bilinmektedir [7]. Mikroçoğaltım amaçlı yapılan çalışmalarda MS [8] besin ortamı içeriği elementlerinin farklı kuvvetlerde kullanıldığında organojeneze [9], sürgün ucu nekrozu ve kararmaya [10], sürgün ve kök oluşumuna [11] ve mikroçoğaltıma sınırlayıcı bir etki yapan hiperhidrisiteye [12] neden olduğu vurgulanmıştır.

Antepfıstığı anaçlarına ait tohumların çimlenme ve köklenme sorunları, anaç çoğaltımında büyük engeller yaratmaktadır [13]. Bu anaçların çelikle çoğaltımında diğer ağaç türleri gibi başarı gösterilemediği [14] için mikroçoğaltım yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Antepfıstığı yetiştiriciliğinde yeni bahçelerin tesisi için ihtiyaç duyulan anaç sayısını karşılamak üzere biyoteknolojik bir yöntem olan mikroçoğaltım tekniği ile birçok *Pistacia* türünün mikroçoğaltımı gerçekleştirilmiştir. *P. khinjuk* türlerinde yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında MS besin ortamından daha verimli sonuçların elde edildiği ortaya konmuştur [15]. Ancak, *Pistacia* türlerinin sürgün çoğaltımında hiperhidrasyon, biyokütlenin daha çok kallus oluşumu ile sonuçlanması, verimli sürgün oluşumunu engellemektedir. Aynı şekilde sürgünleri köklendirme çalışmaları da düşük oranda gerçekleşmektedir [15]. Buna ek olarak sürgün oluşturma ve köklendirme basamaklarında kullanılan optimal azot (amonyum ve nitrat) miktarı mikroçoğaltımdaki maliyetler açısından da önemli yer tutmaktadır. Özellikle MS besin ortamındaki azot kaynaklarına karşı bitki dokularının farklı tepkilerine dikkat çekilmekte ve bu ortamlardaki amonyum nitrat (NH_4NO_3) ve potasyum nitrat (KNO_3) düzeylerinin azaltılması ile sürgün ve kök oluşumunda artış sağlandığı bildirilmektedir [16].

Bazı bitki türleri için optimal azot kullanımı miktarı çalışmaları bilinmektedir [17, 7] ancak bu tür çalışmalar mikroçoğaltılan *Pistacia* türlerinde henüz yapılmamıştır. Bu çalışmada, buttumun sürgün ucu kültürü ile çoğaltımında MS temel besin ortamına NH_4NO_3 'ın 1650 mg/L, 825, 412.5 ve 206.25 mg/L düzeylerinde katılmasının sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

P. khinjuk tohumları Batman ili Batı Raman Dağı lokasyonundan 2023 Kasım ayında farklı ağaçlardan toplanmıştır. Laboratuvarında meyvesinden uzaklaştırıldıktan sonra tohum kabuğu çıkarılarak tohumlar %20 ticari sodyum hipoklorit ile 20 dakika dezenfekte edilerek şeker içermeyen MS besin ortamında çimlendirmeye bırakılmıştır. Çimlenen tohumlardan elde edilen aksenik sürgünler kullanılarak 1 mg/L benzil amino pürin (BAP) içeren MS temel besin ortamında sürgün stoku oluşturulmuştur. Bu sürgün stokundan elde edilen sürgünler MS temel besin ortamının NH_4NO_3 'ın 1650, 825, 412.5 ve 206.25 mg/L kuvvetlerinde sürgün çoğaltımları test edilmiş ve en uygun NH_4NO_3 miktarında 0.5, 1 ve 2 mg/L BAP, kinetin ve 2-IP ile sürgün çoğaltımları belirlenerek sürgünlerde total çözünebilir protein miktarı ölçülmüştür.

Köklendirme çalışmalarında MS temel besin ortamının NH_4NO_3 'ın 1650, 825, 412.5 ve 206.25 kuvvetleri ve NAA'nın 1 mg/L miktarı kullanılmıştır. En uygun NH_4NO_3 miktarında 0.5, 1 ve 2 mg/L NAA, IBA ve IAA kullanılarak sürgünlerin köklenme oranı, eksplant başına düşen kök sayısı, ortalama kök uzunluğu, köklerin total çözünebilir protein içeriği ölçülmüştür. Besin ortamı pH'ı 5.8 olarak ayarlanmıştır. Eksplantlar, 22 ± 2 °C, 16/8 h fotoperiyot ve 3500 lüks uygulanan bitki büyüme odası koşullarında 28 gün bekletilerek veriler kayıt edilmiştir. Ortalama sürgün sayısı, bir eksplant üzerinde gelişen sürgünlerin ortalamasının alınması sonucu ortaya çıkan rakamı ifade etmektedir. Sürgün çoğaltımında test amaçlı kullanılan sürgünlerin uzunluğu 10 mm'dir.

Ortalama sürgün uzunluğu (mm), sürgün çoğaltımı sonucu gelişen sürgünlerin dijital kumpasla ölçülerek ortalamasının alınması sonucu ortaya çıkan rakamı ifade etmektedir.

Köklenme oranı (%), köklenen sürgün sayısının toplam sürgün sayısına oranını yüzde (%) olarak ifade etmektedir.

Eksplant başına düşen kök sayısı, köklenen her bir sürgündeki primer kök sayısının ortalamasını ifade etmektedir.

Köklendirme için kullanılan sürgünlerin uzunluğu yaklaşık olarak 30 mm'dir.

Ortalama kök uzunluğu (mm), köklenen sürgünlerdeki primer kök uzunluğunun dijital kumpasla ölçülerek ortalamasının alınması sonucu ortaya çıkan rakamı ifade etmektedir.

In vitro sürgün ve kök dokularındaki toplam çözünebilir protein miktarı, Bradford [18] metoduna göre belirlenmiştir. Taze bitki örneğinin 0.5 g'ı 100 mM fosfat tamponunda (pH 7.0) homojenize edilerek +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 20 µl alınıp üzerine sırasıyla 480 µl distile su ve 5000 µl Bradford solüsyonu eklenerek UV-Vis spektrofotometre ile 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Dokularındaki toplam çözünebilir protein miktarı, Bovine Serum Albumin (BSA) ile hazırlanan standart eğri grafiği yardımıyla hesaplanarak mg/g taze ağırlık olarak ifade edilmiştir. Absorbans= $0.6831x+0.0186$, $R^2:0.9995$

Veri Analizi

Veriler standart varyans analizi (One-Way ANOVA) prosedürü kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiki önem görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ seviyesinde Duncan (Post hoc) çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. İstatistiksel analiz Windows için SPSS 16.0 sürümü kullanılarak yapılmıştır.

TARTIŞMA

Sürgün çoğaltımı

Sürgün oluşturma verileri değerlendirildiğinde (Tablo 1) 1 mg/L BAP destekli 825 mg/L NH_4NO_3 içeren MS besin ortamının, eksplant başına düşen sürgün sayısı, ortalama sürgün uzunluğu ve total çözülebilir protein değeri açısından 1650, 412.5, 206.25 mg/L miktarlarından daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir. Bununla birlikte sürgün sayısı bakımından NH_4NO_3 'ün 825 mg/L miktarının 1650 mg/L ile ve ortalama sürgün uzunluğu bakımından da 1650 mg/L ve 412.5 mg/L ile arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemsizdir. Genel olarak bu parametreler bakımından 206.25 mg/L NH_4NO_3 miktarında önemli düzeyde bir farklılıkla çalışmanın en düşük değerleri belirlenmiştir. 825 mg/L NH_4NO_3 içeren MS besin ortamı BAP, kinetin ve 2-IP sitokininlerinin 0.5, 1 ve 2 mg/L miktarları ile test edildiğinde en yüksek eksplant başına düşen sürgün sayısı (1.79) 0.5 mg/L BAP, ortalama sürgün uzunluğu (17.43 mm) 1 mg/L 2-IP destekli MS ortamından elde edildiği görülmektedir (Tablo 2). Aynı zamanda BAP ve 2-IP sitokinin çeşitlerinin sürgün çoğaltımında benzer sonuçları verdiğinden ekonomik olan sitokinin çeşidinin kullanılabilirliği söylenebilmektedir. Amonyum nitratın asimilasyonu ile ilgili değerlendirmelerde ortalama sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğunun en yüksek olduğu BAP destekli uygun amonyum nitrat miktarında (825 mg/L) çözülebilir total protein değerlerinin anlamlı farklılıklar göstermediği görülmektedir (Tablo 2).

BAP destekli MS temel besin ortamında 825 mg/L NH_4NO_3 miktarının *Schizobium amazonicum* ağacında [20] ve brokolide [19] sürgün çoğaltımını artırdığı rapor edilmiştir. Manyok bitkisi mikroçoğaltımında ise NH_4NO_3 miktarının 825 mg/L den daha az kullanılması [21] ile sürgün çoğaltımı optimizasyonunda verimli sonuçların elde edildiği rapor edilmiştir. Benzer şekilde MS temel besin ortamında NH_4NO_3 ve KNO_3 'ün sırasıyla 1/4 ve 1/2 oranlarında azaltılması ile Japon orkidesinde sürgün çoğaltımının başarılı olduğu bildirilmiştir [22]. Benzer başka bir çalışmada *Aloe compressa*'nın *in vitro* mikroçoğaltımında NH_4NO_3 'ü 825, 1650 ve 4950 mg/L miktarlarından en verimli ve sağlıklı sürgünlerin, 825 mg/L'de ve 1 mg/L BAP ile elde edildiği vurgulanmıştır [12]. Da Silva ve ark. [7] sarı çarkıfelek meyvesi fidelerinin oluşumu için besin çözeltisinin 234.5 mg/L N içermesi ve bu besin maddesinin %40'ının amonyum formunda olması gerektiği ve bununla birlikte, besin çözeltisindeki 104.8 mg/L NH_4^+ üzerindeki miktarın

katyonların, emiliminde ve sürgünlerin kuru madde ağırlığında azalmaya neden olduğu bildirmiştir. Besin ortamında aşırı miktarda amonyumun birikmesi yapraklarda kloroz ve nekroz [2] gelişmesi ve sürgün gelişimi ve kuru madde birikimindeki azalmayla sonuçlanabilmektedir [7]. Kültür ortamında amonyum ve nitratın uygun oranlarının bilinmemesi [23] ve amonyum ya da nitratın emilimi asimilasyonu, genetik, sıcaklık, pH besin maddeleri, su ve bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileşiminden kaynaklanabileceği de bildirilmiştir [24]. Khajehyar ve ark. [4] sitokinin çeşidi ve 1/2 MS kuvvetli mineral içeriğinin *Philadelphus microphyllus* A. Gray bitkisi sürgün çoğaltımında belirleyici bir rolle sahip olduğunu bildirmiştir. Sürgün çoğaltımıyla ilgili yapılan bu çalışmalarda sitokinin çeşidi ve MS besin ortamındaki diğer besin elementleri ve amonyum nitrat miktarının farklı bitki türlerinde farklı sonuçlara neden olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada 825 mg/L NH_4NO_3 içeren MS temel besin ortamının 0.5, 1 ve 2 mg/L BAP ile desteklendiğinde eksplant başına düşen sürgün sayısı, ortalama sürgün uzunluğu ve çözülebilir protein değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar oluşturmadığı anlaşılmaktadır. Ancak 0.5 mg/L BAP miktarının ekonomik olarak daha verimli olacağı görülmektedir.

Köklendirme

Çalışmamızda köklenme oranı bakımından 412.5 mg/L NH_4NO_3 miktarı 1650, 825 ve 206.25 mg/L miktarları ile karşılaştırıldığında çok belirgin bir farkla köklendirme sonuçlarına etki ettiği görülmektedir (Tablo 3). Köklendirmede oksin çeşitleri ve miktarlarının köklendirme üzerinde etkili olduğu da Tablo 4'te görülmektedir. Köklenme oranı bakımından NAA'nın 0.5, 1 ve 2 mg/L dozlarının benzer sonuçlar verdiği ve NAA'nın, IBA ve IAA'ya göre istatistiksel bakımdan önemli bir farkla daha yüksek köklenme oranları verdiği görülmektedir (Tablo 4). Eksplant başına düşen kök sayısı, ortalama kök uzunluğu ve total çözülebilir protein miktarı 412.5 mg/L NH_4NO_3 içeren 0.5, 1 ve 2 mg/L NAA ortamlarında istatistiksel olarak birbirine yakın değerlerde çıkmıştır. Her ne kadar IBA ortamında ortalama kök uzunluğu daha yüksek çıkmışsa da bu köklerin çapının NAA ortamlarından daha düşük ve kırılabilir olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak NAA ortamında eksplant başına düşen kök sayısı IBA ortamından neredeyse iki kat, köklenme yüzdesi de neredeyse 1/2 kat daha yüksek çıkmıştır. Köklendirme de total çözülebilir protein miktarı 412.5 mg/L NH_4NO_3 içeren 0.5, 1 ve 2 mg/L NAA ortamında birbirine yakın değerlerde çıktığı görülmektedir (Tablo 4). 412.5 mg/L NH_4NO_3 ortamı NAA ile desteklendiğinde, IBA ve IAA ya göre azot asimilasyonunun daha iyi yapıldığı total çözülebilir protein değerinden anlaşılmaktadır.

Başka benzer çalışmalarda 825 mg/L NH_4NO_3 içeren MS temel besin ortamında, "Julyred" elma çeşidinde [25] sürgünlerin 0.5 ve 1.0 mg/l IBA uygulamalarında sırasıyla %80 ve %90 köklendiği, "Red General Fuji" elma çeşidinde [26] ise 0.5 mg/l IBA+0.5 mg/l NAA

içeren MS temel besin ortamında %86 oranında köklendiği rapor edilmiştir. 206.25 mg/L NH_4NO_3 düzeyinde MS besin ortamında zor ve kolay köklenen elma genotiplerinde köklenme oranı 1 mg/L IBA uygulaması ile sırasıyla %50 (Golden Delicious) ve %100 (MM106) sonuçları elde edilmiştir [17].

Amghar ve ark. [27], NH_4NO_3 konsantrasyonunun 825 mg/L'e düşürülmesi ve kültür ortamına oksinler (IBA ve NAA), putresin ve AgNO_3 eklenmesiyle argan sürgünlerinde başarılı *in vitro* köklenme ve kuvvetli kök gelişiminin elde edildiğini göstermiştir. Da Silva ve ark. [7] sarı çarkıfelek meyvesi fidelerinin oluşumu için besin çözeltisinin 98.3 mg/L NH_4^+ içermesi gerektiği ve bununla birlikte, besin çözeltisindeki 104.8 mg/L NH_4^+

üzerindeki miktarın katyonların, emiliminde, kök gelişimi ve kök kuru maddesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Kenevir (*Canabis sativa* L.) bitkisi *in vitro* çoğaltımında köklendirme ortamında 825 mg/L NH_4NO_3 ½ MS besin ortamının 2.4 μM IBA ve 2 μM m-topolin ile desteklenmesi durumunda başarılı köklendirme sonuçlarının elde edildiği vurgulanmıştır [28]. Yapılan çalışmalara bakıldığında düşük miktarda NH_4NO_3 kullanımının köklendirmeye olumlu etki ettiği görülmektedir. Yaptığımız çalışmada da 412.5 mg/L NH_4NO_3 miktarı NAA ile desteklendiğinde köklendirme için daha verimli sonuçları elde edildiği anlaşılmıştır.

Tablo 1. MS besin ortamının farklı NH_4NO_3 miktarlarında sürgün gelişimi ve protein içerikleri

BAP 1 mg/L			
NH_4NO_3 (mg/L)	Eksplant başına düşen sürgün sayısı	Ortalama sürgün uzunluğu (mm)	Total çözülebilir protein mg/g TA
1650	1.54 ± 0.38 ^{ab}	15.66±0.43 ^a	2.30±0.53 ^b
825	1.78 ± 0.45 ^a	16.52±0.54 ^a	3.25±0.45 ^a
412.5	1.42±0.43 ^b	15.53±0.46 ^a	2.53±0.48 ^b
206.25	1.27±0.46 ^b	13.34±0.56 ^b	1.95±0.72 ^c

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. TA: Taze Ağırlık

Tablo 2. En uygun NH_4NO_3 miktarında farklı sitokinin ve konsantrasyonlarının sürgün gelişimi ve protein içerikleri üzerine etkileri

825 mg/L NH_4NO_3	Eksplant başına düşen sürgün sayısı	Ortalama sürgün uzunluğu (mm)	Total çözülebilir protein mg/g TA
Kontrol	1.0 ± 0.00 ^d	10.54±0.43 ^c	2.28±0.11 ^c
0.5 mg/L BAP	1.79 ± 0.45 ^a	17.10±0.18 ^a	3.05±0.07 ^a
1 mg/L BAP	1.78 ± 0.45 ^a	16.52±0.54 ^a	3.25±0.45 ^a
2 mg/L BAP	1.76 ± 0.45 ^a	17.07±0.18 ^a	3.35±0.07 ^a
0.5 mg/L Kinetin	1.46±0.22 ^c	13.47±0.37 ^b	2.65±0.05 ^{bc}
1 mg/L Kinetin	1.48±0.42 ^c	13.37±0.37 ^b	2.45±0.05 ^{bc}
2 mg/L Kinetin	1.45±0.42 ^c	13.71±0.37 ^b	2.40±0.05 ^{bc}
0.5 mg/L 2-IP	1.72±0.23 ^a	16.35±0.43 ^a	2.67±0.20 ^{bc}
1 mg/L 2-IP	1.63±0.56 ^b	17.43±0.73 ^a	2.55±0.17 ^b
2 mg/L 2-IP	1.60±0.43 ^b	16.97±0.33 ^a	2.35±0.42 ^{bc}

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. TA: Taze Ağırlık

Tablo 3. Farklı NH₄NO₃ miktarlarının kök gelişimi ve protein içeriği üzerine etkisi

NAA 1 mg/L				
NH ₄ NO ₃ (mg/L)	Köklenme oranı (%)	Eksplant başına düşen kök sayısı	Ortalama kök uzunluğu (mm)	Total çözülebilir protein mg/g TA
1650	45.74±0.88 ^c	3.70±0.18 ^a	13.35±2.40 ^c	2.38±0.51 ^b
825	53.27±1.52 ^b	3.65±0.25 ^a	14.20±1.30 ^b	2.78±0.36 ^a
412.5	80.43±3.60 ^a	4.63± 0.43 ^a	16.05±1.20 ^a	3.10±0.52 ^a
206.25	43.52±1.52 ^c	3.42±0.57 ^a	12.95±1.80 ^c	2.15±0.56 ^b

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. TA: Taze Ağırlık

Tablo 4. En uygun NH₄NO₃ miktarında farklı oksin çeşidi ve miktarlarının kök gelişimi ve protein içeriği üzerine etkisi

412.5 mg/L NH ₄ NO ₃	Köklenme oranı (%)	Eksplant başına düşen kök sayısı	Ortalama kök uzunluğu (mm)	Total çözülebilir protein mg/g TA
Kontrol	0 ^d	0 ^d	0 ^c	0 ^c
0.5 mg/L NAA	81.30±4.15 ^a	4.25 ± 0.75 ^a	15.95±0.60 ^{ab}	3.25±0.05 ^a
1 mg/L NAA	80.20±5.67 ^a	4.20 ± 2.23 ^a	16.05±0.70 ^{ab}	3.10±0.05 ^a
2 mg/L NAA	80.40±4.85 ^a	4.15 ± 1.26 ^a	15.25±0.50 ^{ab}	3.15±0.25 ^a
0.5 mg/L IBA	57.10±6.35 ^b	2.35±0.45 ^b	17.90±1.60 ^a	2.45±0.22 ^b
1 mg/L IBA	56.20±8.47 ^b	2.45±0.57 ^b	18.20±1.70 ^a	2.56±0.31 ^b
2 mg/L IBA	55.30±7.17 ^b	2.47±0.25 ^b	18.30±2.40 ^a	2.49±0.23 ^b
0.5 mg/L IAA	26.30±2.80 ^c	1.45±0.20 ^c	13.10±1.30 ^b	2.46±0.56 ^b
1 mg/L IAA	25.10±2.80 ^c	1.25±0.10 ^c	12.30±1.46 ^b	2.36±0.66 ^b
2 mg/L IAA	30.20±2.60 ^c	1.65±0.40 ^c	12.00±1.30 ^b	2.25±0.50 ^b

Rakamlar kültürün 28. gününde her bir deney için 20 eksplantın ortalamasıdır. TA: Taze Ağırlık

SONUÇ

Odunsu türlerin mikroçoğaltım çalışmalarında sıklıkla kullanılan besin ortamı MS besin ortamıdır. MS besin ortamında amonyum nitrat (NH₄NO₃) düzeylerinin bitki türüne göre optimize edilmesi mikroçoğaltımın verim ve ekonomisi açısından önem arz etmektedir. Mikroçoğaltım çalışmalarında maliyetin önemli bir parametre olduğu bilinmektedir bu maliyetleri etkileyen faktörlerden bir tanesi de MS besin ortamında yüksek miktarda kullanılan NH₄NO₃ ve düşük miktarda kullanılsa bile oksin ve stokininlerin birim miktarlarının yüksek maliyetleridir.

Bu çalışmada sürgün çoğaltımı ve köklendirme istatistiksel verileri daha önceki çalışmaların ortalama sürgün çoğaltım ve köklendirme verileri ile karşılaştırıldığında sonuçların birbirine yakın olduğu görülmektedir. Bu bağlamda çalışmamız bu türün *in vitro* çoğaltım verilerini arttırmamıştır. Ancak daha düşük NH₄NO₃ miktarı kullanılarak *P. khinjuk* türünün *in vitro* koşullarda daha ekonomik bir şekilde çoğaltılabileceğini ortaya koymuştur.

KAYNAKÇA

- [1] Qin W., Assinck F.B.T., Heinen M., Onenema O. Water and nitrogen use efficiencies in citrus production: a meta-analysis. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 222, 103–111, 2016.
- [2] Campos, C.N.S., Prado R.M., Caione G., Lima Neto A. J Mingotte F L.C.. Silicon and excess ammonium and nitrate in cucumber plants. *African Journal of Agricultural Research*, 11 (4):276–83, 2016. doi: 10.5897/ajar2015.10221.
- [3] Khajehyar R, Tripepi R.R.. Different cytokinins and their concentrations affect shoot growth of little-leaf mockorange (*Philadelphus microphyllus* A. Gray) in tissue culture. Supplement to HortScience. ASHS 2020 Annual Conference. 55:366–367, 2020. (abstr.) <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.55.9S.1>.
- [4] Khajehyar R., Tripepi R., Love S., Price, W. J. Optimization of Tissue Culture Medium for Little-leaf Mockorange (*Philadelphus microphyllus* A. Gray) by Adjusting Cytokinin and Selected Mineral Components. *HortScience*, 59(1), 18-25, 2024. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.17440-23>

- [5] Podgorska, A., Burian M., Gieczewska K., Ostaszewska-Bugajska M., Zebrowski J., Solecka D., Szal B. Altered Cell Wall Plasticity Can Restrict Plant Growth under Ammonium Nutrition. *Frontiers in Plant Science*, 8:1344–19, 2017. doi: [10.3389/fpls.2017.01344](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01344).
- [6] Barreto R.F., Schiavon-Junior A. L., Maggio M. A., Prado R.M. Silicon alleviates ammonium toxicity in cauliflower and in broccoli. *Scientia Horticulturae*, 225:743–50, 2017. doi: [10.1016/j.scienta.2017.08.014](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.014).
- [7] Da Silva G.B., de Mello Prado R., Silva S.L.O.; Campos C.N.S., Castellanos L.G., dos Santos L.C.N., Barreto R.F., Teodoro P.E. Nitrogen Concentrations and Proportions of Ammonium and Nitrate in the Nutrition and Growth of Yellow Passion Fruit Seedlings. *J. Plant Nutr*, 43, 2533–2547, 2020. DOI: [10.1080/01904167.2020.1783299](https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1783299)
- [8] Murashige T, Skoog F. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473–497, 1962.
- [9] Shin S.L, Lee C.H. In vitro medium composition and culture method affecting masspropagation of Omsunda japonica Thunb. Prothalli. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 27:299–304, 2009.
- [10] Sha L., McCrown B.H., Peterson L.A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 110:631–634, 1985.
- [11] Orlikowska T. Effects of mineral composition and acidity of media, saccharose level, brand and quantity of agar on rooting of fruit rootstocks in vitro. *Biologia Plantarum*, 34:45–52, 1992.
- [12] Ivanova M., Staden J.V. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of in vitro regenerated shoots of Aloe polyphylla. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92:227–231, 2008.
- [13] Baninasab B., Rahemi M. The effects of scarification, cold stratification and gibberellic acid treatments on germination of Khokhong seeds. *J. Plant Sci.*, 3, 121-125, 2001.
- [14] Serdar Ü., Fulbright D. Achieving sustainable cultivation of tree nuts. Burleigh Dodds Science Publishing. 1st ed. 2019.
- [15] Ersalı Y. In vitro micropropagation of female khinjuk pistachio (pistacia khinjuk stocks) trees. Institute of natural and applied sciences university of Dicle PhD thesis, 2014.
- [16] Wang Y.T. High NO₃-N to NH₄-N ratios promote growth and flowering of a hybrid *Phalaenopsis* grown in two root substrates. *HortScience*, 43, 350–353, 2008.
- [17] Dumanoglu H., Aygün A., Erdoğan V. Effect of Ammonium Nitrate Levels on Shoot and Root Formation in Micropropagation of Apple Genotypes, *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*. 2 (1):177-182, 2009
- [18] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann. Biochem*, 72, 248-253, 1976.
- [19] Wilson F.M, James D.J. Regeneration and transformation of the premier UK apple (*Malus x pumila* Mill.) cultivar Queen Cox. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78:656–662, 2003.
- [20] Cordeiro I.M.C.C, Lameira O.A., Menezes I.C.C, Reis L.R.S. Effect of different ammonium nitrate concentrations in the control of *in vitro* stem segments oxidation of parica (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). *Revista de Ciências Agrárias*, 41:97–104, 2004.
- [21] Sato A.Y., Maria J., Sediyaama T., Borem A., Cecon P.R., Junqueira C.S. Cassava micropropagation: effect of ammonium nitrate concentrations with and without BAP. *Revista Ceres*, 48:405–413, 2001.
- [22] Ogura-Tsujita Y., Okubo H. Effects of low nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxins, and cytokinins in *in vitro* shoot formation from rhizomes of *Cymbidium kanran*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42:614–616, 2006.
- [23] Li, B., Li G., Kronzucker H.J., Baluska F., Shi W. Ammonium stress in Arabidopsis: Signaling, genetic loci, and physiological targets. *Trends in Plant Science*, 19 (2):107–14, 2014. doi: [10.1016/j.tplants.2013.09.004](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.09.004).
- [24] Bittsaanszky A., Pilinszky K. Gyulai G., Komives T. Overcoming ammonium toxicity. *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology*. 231:184–90, 2015. doi: [10.1016/j.plantsci.2014.12.005](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.12.005).
- [25] Laszloffy K., Abdulkader A.M., Mathe A. *In vitro* propagation of 'Julyred' apple. *Acta Horticulturae*. 300:149–154, 1991.
- [26] ZhongWu J., JiaMing S., XiaoNa D., YuFen S., Qiang Y., LaiQing S., HuaiRui S. Establishment of adventitious shoot regeneration system from leaves of Red General Fuji apple cultivar (*Malus domestica*) *in vitro*. *Journal of Fruit Science*. 25:797–800, 2008.
- [27] Amghar I., Ibriz, M., Ibrahim, M., Boudra, A., Gaboun F., Meziani R., Iraqi D., Mazri M.A., Diria G., Abdelwahd R., In Vitro Root Induction from Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) Adventitious Shoots: Influence of Ammonium Nitrate, Auxins, Silver Nitrate and Putrescine, and Evaluation of Plantlet Acclimatization. *Plants*, 10, 1062, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10061062>
- [28] Zarei A., Davis B., Feyissa B.A. Improvement of mineral nutrition and rooting efficiency of *Cannabis sativa* L. for *in vitro* large-scale propagation. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 59, 95–105, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10320-6>
- [29] Gezahegn G., Feyissa T., Rezene Y. Replacement of ammonium nitrate by alternative nitrogen sources in MS medium to enhance ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) *in vitro* regeneration. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 154, 89–95, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02513-7>