

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**MYROBOLAN B ERİK KÖK ANACININ (*PRUNUS
CERASIFERA* L.) SIVI KÜLTÜRLERDE BÜYÜK
ÖLÇEKTE MİKROÇOĞALTIMI**

Serpil ORHAN FEDAKAR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 612.01.00

Sunuş Tarihi: 26.01.2015

Bornova-İZMİR

2015

Serpil Orhan FEDAKAR tarafından doktora tezi olarak sunulan “Myrobolan B. Erik Kök Anacının (*Prunus cerasifera* L.) Sıvı Kültürlerde Büyük Ölçekte Mikroçoğaltımı” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 26.01.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL

.....

Raportör Üye: Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN

.....

Üye : Prof. Dr. Burçin ÇOKUYSAL

.....

Üye : Yar. Doç. Dr. Meltem BAYRAKTAR

.....

Üye : Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Myrobolan B. Erik Kök Anacının (*Prunus cerasifera* L.) Sıvı Kültürlerde Büyük Ölçekte Mikroçoğaltımı” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26 / 01 / 2015

İmzası

Adı-Soyadı
Serpil Orhan Fedakar

ÖZET**MYROBOLAN B ERİK KÖK ANACININ (*PRUNUS CERASIFERA* L.) SIVI KÜLTÜRLERDE BÜYÜK ÖLÇEKTE MİKROÇOĞALTIMI**

ORHAN-FEDAKAR, Serpil

Doktora Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Ocak 2015, 156 sayfa

Bu çalışma kapsamında kök boğazı çürüklüğüne dayanıklı, kuvvetli bir erik kök anacı olan ve geleneksel yöntemlerle köklendirilmesinde problem olan, ekonomik olarak önemli Myrobolan B (*Prunus cerasifera* L.) çeşidinin sıvı kültürlerde büyük ölçekte mikroçoğaltımları amaçlanmıştır.

Yarı katı besin ortamında kültüre alınan Myrobolan B, erik kök anaçlarına ait nodal eksplantlardan elde edilen sürgünler, içinde 30 g/l şeker, 0.7 mg/l BAP ve 0.01 mg/l NAA içeren MS besin ortamı bulunan RITA biyoreaktörlerde üretim parametrelerinin optimizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. RITA biyoreaktörlerde yapılan çalışmalarda optimum inokulasyon yoğunluğu 6 adet eksplant, daldırma süresi 1 sa: 20 sn; altkültür süresi 40 gün, besin ortamı miktarı 250 ml, ışık şiddeti 3000 lüks olarak belirlenmiş olup optimum koşullarda çoğaltma katsayısı 7.33, eksplant başına ortalama sürgün sayısı 14.68 ve vitrifikasyon oranı %8.33 bulunmuştur. RITA biyoreaktörlerde üretilen çoklu mikrosürgünlerden elde edilen tek sürgünlerde %91.67 oranında köklenme başarısı elde edilmiştir. Ardından serada torf:perlit (4:1) ortamına alınan köklü bitkiciklerin %91.11'i dış koşullara adapte edilmiştir.

RITA biyoreaktörlerde küçük ölçekte yapılan sıvı kültürlerde üretim modelinin büyük ölçek uygulamalarının gerçekleştirilmesi amacıyla 5 l'lik balon tip geçici daldırma biyoreaktör tasarımı gerçekleştirilmiştir. RITA biyoreaktörler için optimum koşullarda biyoreaktörde kültüre alınan 2-3 sürgünlü Myrobolan B eksplantlarında çoğaltma katsayısı (5.83), ortalama sürgün sayısı (11.7) ve vitrifikasyon yüzdesi (%25) gibi önemli üretim parametreleri belirlenmiştir. Balon tip geçici daldırma biyoreaktörde çoğaltılan mikrosürgünlerin *in vitro* köklendirme oranları (%98.33) ve aklimatizasyon oranları (%91.11) RITA biyoreaktörlerden elde edilen sonuçlar ile benzer bulunmuştur. Mikroçoğaltım parametreleri açısından değerlendirildiğinde çoğaltma katsayısı, ortalama sürgün

sayısı ve düşük vitrifikasyon oranları bakımından RITA biyoreaktörlerin daha avantajlı oldukları saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Prunus cerasifera* L., Myrobolan B, erik klon anacı, sıvı kültür, RITA® biyoreaktörü, balon tip geçici daldırma sistemi, ticari mikroçoğaltım

ABSTRACT**LARGE SCALE MICROPROPAGATION OF MYROBOLAN B
PLUM ROOTSTOCK (*PRUNUS CERASIFERA* L.) IN LIQUID
CULTURE**

ORHAN-FEKADAR, Serpil

Ph.D. in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GÜREL

January 2015, 156 pages

In this study, it is aimed to mass propagation of economically significant and important Myrobolan B (*Prunus cerasifera* L.) specie which is resistant to root rot disease and also which has several problems of rooting by common methods.

New shoots derived from nodal explants on semi solid media were cultured in RITA bioreactors that contain MS medium supplemented with 30 g/l sugar, 0.7 mg/l BAP and 0.01 mg/l NAA to optimize micropropagation parameters. Inoculation density of 6 explants, immersion cycle of 20 seconds per hour, duration of subculture of 40 days, amount of media of 250 ml and optimum light intensity of 3000 lux were determined as optimum culture conditions for RITA bioreactors. Multiplication rate of 7.33, number of shoots per explants of 14.68 and vitrification rate of 8.33% were obtained from RITA bioreactors at optimum conditions. Single shoots of propagules from RITA bioreactors were rooted (91.67%). Shoots with well developed roots were acclimatized (91.11%) on turba: perlite (4:1) medium.

To scale up the micropropagation process on RITA, 5l balloon type temporary immersion bioreactor was designed. Propagules with 2-3 shoots were cultured in balloon type temporary immersion bioreactors on same optimum culture conditions with RITA bioreactors. Some of important micropropagation parameters such as multiplication rate, number of shoots per explants and vitrification rates were determined with respectively 5.83, 11.7 and 25%. Percentage of rooting (98.33%) and acclimatization (91.11%) of shoots from balloon type temporary immersion bioreactors were obtained similar with RITA bioreactors.

Keywords: *Prunus cerasifera* L., Myrobolan B, plum rootstock, liquid culture, RITA[®] bioreactor, balloon type temporary immersion system, commercial micropropagation

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana her türlü destek ve yardımı sağlayan tez danışmanım Prof. Dr. Aynur Gürel'e, çalışmam süresince yorumlarını ve desteklerini esirgemeyerek önemli katkılarda bulunan tez izleme komitemde yer alan hocalarım Prof. Dr. Fazilet Vardar Sukan ve Prof. Dr. Burçin Çokuysal'a, SANTEZ projesindeki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Meltem Bayraktar'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince maddi ve manevi desteklerinden dolayı başta İşletme Müdürümüz Osman Civil, Genel Müdürümüz Kemal Özpınar ve Yönetim Kurulu Başkanımız Mehmet Sinan Berksan olmak üzere Dikili Çiftlik A.Ş. yönetimine ve sevgili çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca, her konuda bana olan sonsuz desteklerinden ötürü annem, babam ve kardeşlerime, her zaman sevgi ve desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Musa Fedakar'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması; Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Bilim ve Teknoloji Genel Müdürlüğü (SANTEZ 00440.STZ.2009-2 no'lu proje), Ege Üniversitesi İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü (2010BİL024 no'lu proje), Asgen Tarım Ticaret A.Ş. ve Dikili Çiftlik A.Ş. tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxx
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	6
2.1 Bitkisel Özellikler	6
2.2 Myrobolan B. (Prunus cerasifera L.) Çoğaltım Teknikleri	8
2.3 Büyük Ölçekte Mikroçoğaltım için Maliyet Düşürücü Yöntemler	11
2.3.1 Ticari mikroçoğaltım için biyoreaktörlerin kullanımı	12
2.3.2 Geçici daldırma sistemleri	19
3. MATERYAL VE METOT	36
3.1 Materyal	36
3.2 Metot	38
3.2.1 Eksplantların sterilizasyonu ve kültürlerin başlatılması	38

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.2 Besin ortamlarının hazırlanması.....	39
3.2.3 Yarı katı kültürlerde mikroçoğaltım uygulamaları	41
3.2.4 Küçük ölçekte sıvı kültürlerin kurulması ile ilgili uygulamalar.....	44
3.2.5 RITA biyoreaktörlerinde mikroçoğaltım parametrelerinin optimizasyonu ve mikroçoğaltılan bitkiciklerin aklimatizasyonu ile ilgili uygulamalar.....	46
3.2.6 5 l balon tip biyoreaktörde mikroçoğaltım parametrelerinin ölçümü ve mikroçoğaltılan bitkiciklerin aklimatizasyonu ile ilgili uygulamalar.....	47
3.3 Verilerin Değerlendirilmesi.....	48
4. BULGULAR	49
4.1 Eksplantların Sterilizasyonu ve Kültürlerin Başlatılması Denemelerinden Elde Edilen Veriler.....	49
4.2 Yarı Katı Kültürlerde Mikroçoğaltım Uygulamalarından Elde Edilen Sonuçlar.....	51
4.2.1 Yarı katı kültürlerde sürgün çoğaltma ortamının belirlenmesi ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar	51
4.2.2 Yarı katı kültürlerde sürgün uzatma ortamının belirlenmesi ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar	56
4.2.3 <i>İn vitro</i> sürgünlerin yarı katı kültürlerde köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar	58

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3 Küçük Ölçekte Sıvı Kültürlerin Kurulması ile İlgili Uygulamalardan Elde Edilen Sonuçlar	59
4.3.1 <i>In vitro</i> sürgünlerin küçük ölçekte sıvı kültürlerle alıştırılması ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar	59
4.3.2 Küçük ölçekte sıvı kültürlerde <i>in vitro</i> sürgünlerin çoğaltımının geliştirilmesi ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar.....	70
4.3.3 Sıvı kültür koşullarında elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi ve dış koşullara adaptasyonu ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar	75
4.4 RITA Biyoreaktörlerinde Mikroçoğaltım Parametrelerinin Optimizasyonu ve Mikroçoğaltılan Bitkiciklerin Aklimatizasyonu ile İlgili Uygulamalar	76
4.4.1 RITA biyoreaktörlerinde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu	76
4.4.2 RITA biyoreaktörlerinde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu	92
4.4.3 RITA biyoreaktörlerinde ışık şiddetinin optimizasyonu	104
4.4.4 RITA biyoreaktörlerden elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi ve dış koşullara adaptasyonu ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar	110
4.5 5L Balon Tip Geçici Daldırma Biyoreaktörlerde Myrobolan B Bitkiciklerinin Mikroçoğaltımı ve Mikroçoğaltılan Bitkiciklerin Aklimatizasyonu ile İlgili Uygulamalardan Elde Edilen Sonuçlar	111
4.5.1 5l balon tip geçici daldırma biyoreaktörün tasarımı	111

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.5.2 5l balon tip geçici daldırma biyoreaktörde üretim parametrelerinin ölçümü ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar	114
4.5.3 5l balon tip geçici daldırma biyoreaktörden elde edilen mikrosürgünlerin köklendirilmesi ve dış koşullara aklimatizasyonu ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar	115
4.5.4 5l balon tip geçici daldırma biyoreaktör ile RITA biyoreaktörden elde edilen üretim parametreleri verilerinin karşılaştırılması	116
4.5.5 Farklı kültür koşullarında kültüre alınan Myrobolan B bitkiciklerinden elde edilen mikrosürgünlerin mikroçoğaltım parametreleri ile köklenme ve aklimatizasyon oranlarının karşılaştırılması	123
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	129
6. ÖNERİLER	139
KAYNAKLAR DİZİNİ	142
ÖZGEÇMİŞ	156

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Organogenezis yoluyla mikroçoğaltım prosesine geçici daldırma sisteminin -GDS- entegrasyonu (Gonzalez, 2005)	21
2.2 Somatik embriyogenezis yoluyla mikroçoğaltım prosesine geçici daldırma sisteminin –GDS- entegrasyonu (Gonzalez, 2005)	22
2.3 (1) Twin-Flask sistemi tasarım ve çalışma prensibi; (A) Bekleme fazı: Sıvı ortamın tamamı besin ortamı tankında bulunmaktadır. Her iki tankta hava girişi kapalıdır ve selonoid valfler atmosfere açıktır. (B) Besin ortamının kültür tankına transferi. Kültür tankının hava yolu kapalı, besin ortamı tankının hava yolu açıktır. Yüksek basınç besin ortamını kültür tankına hareket ettirir. (C) Daldırma periyodu: Sürgün demetleri sıvı ortama daldırılır. Besin ortamı tankı boştur. Her iki tankta hava yolları kapalıdır ve selonoid valfler atmosfere açıktır. (D) Besin ortamının kültür tankından drenajı: Kültür tankının hava yolu açıkken, besin ortamı tankının hava yolu kapalıdır. Yüksek basınç dolayısıyla besin ortamı tekrar besin ortamı tankına aktarılır. (2) Gel-git sisteminin tasarımı ve çalışma prensibi; (A) Bekleme periyodu; (B) Besin ortamının transferi. Besin ortamı tankına hava basıncı uygulanır ve sıvı ortam kültür tankına geçer; (C) Daldırma periyodu; (D) besin ortamının drenajı. Hava basıncı durdurulur ve besin ortamı yerçekimi ile tekrar besin ortamı tankına aktarılır (Georgiev et al., 2014).....	26

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 2.4 (1) RITA sisteminin tasarımı ve çalışma prensibi; (A) Bekleme periyodu; (B) Sıvı ortamın transferi. Ana borudan biyoreaktörün tabanına hava basıncı uygulanır. Sıvı ortam üst bölüme doğru hareket eder; (C) Daldırma periyodu; (D) Besin ortamının drenajı. Hava akışı kesilir ve besin ortamı yer çekimi ile alt bölüme hareket eder. (2) Termo-fotobiyoreaktörün tasarımı ve çalışma prensibi; (A) Bekleme periyodu; (B) Sıvı ortamın transferi. (C) Daldırma periyodu; (D) Besin ortamının drenajı. Hava beslemesi durdurulur ve yerçekimi ile sıvı ortam tekrar besin ortamı tankına hareket eder (Georgiev et al., 2014).....26
- 2.5 Gel-git sistem ile entegre doyurulmuş tübüler konvektif akış-hibrit sistem tasarımı ve çalışma prensibi; (A) Transforme saçaklı köklerin immobilizasyonu ve uniform dağılımı elde edilinceye kadar kabarcık kolon prensibinde çalışma; (B-E) Şekil 2.3 (1)'de açıklanan biçimde Twin-flask sistemine benzer işlem adımları uygulanmaktadır (Georgiev et al., 2014).....27
- 2.6 (1) Kabarcık güdümlü immersiyon biyoreaktör tasarımı ve çalışma prensibi: (A) Bekleme periyodu, (B) Daldırma periyodu. Reaktöre hava beslenir ve köpük oluşumu sağlanır. Eksplantlar besin ortamından oluşturulan köpük ile sarılır. Havalandırma durdurulduğunda, sıvı drenajı ile birlikte köpük yoğunluğu da azalır ve eksplantlar gazla zenginleştirilmiş ortama maruz bırakılırlar. (2) (A, B) Beşik (rocker) sistemi dizaynı ve çalışma prensibi, (C, D) BioMINT biyoreaktörün dizaynı ve çalışma prensibi (Georgiev et al., 2014).....27
- 2.7 Döner tambur biyoreaktör sistemi tasarımı ve çalışma prensibi (Georgiev et al., 2014) 28

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.8	(A) RALM biyoreaktör, (B) SETIS geçici daldırma biyoreaktör sistemi, (C) PLANTIMA sistemi, (D) PLANTFORM biyoreaktör, (E) Box-in-Bag ve (F) WAVE biyoreaktör tasarımları (Georgiev et al., 2014) 28
2.9	Yeni geçici daldırma sisteminin çalışma prensibi a) Bitki materyali sıvı ortamın dışında iken pistonun konumu, b) Bitki materyali besin ortamına daldırıldığında pistonun konumu 31
3.1	2009 yılı Nisan ayında kurulan denemelerde kullanılan Bademli Fidancılık Kooperatifi'ne ait arazide bulunan Myrobolan B anaçlarının görünümü 36
3.2	2009 yılı Nisan ayında kurulan denemelerde kullanılan Dikili Çiftlik A.Ş. gölgeevinde bulunan Myrobolan B anaçlarının görünümü 37
3.3	Eksplant olarak kullanılan tek yıllık Myrobolan B sürgünleri 37
3.4	(a) Ön sterilizasyon için yaprakları uzaklaştırılan Myrobolan B çelikleri (b) Tek nodlu eksplantlar..... 48
4.1	Sera ve arazi koşullarındaki donör bitkilerden alınan ve farklı sterilizasyon yöntemleri uygulanan nod eksplantlarında gözlenen kontaminasyon oranları (%)..... 51
4.2	Sera koşullarındaki donör bitkilerden alınan ve sterilize edilen nodal eksplantta gözlenen rejenerasyon 51
4.3	(a) Yarı katı kültür koşullarında mikroçoğaltıma alınan Myrobolan B eksplantları, (b) 30 günlük alt kültür sonrasında gözlenen yeni sürgün oluşumları, (c) Hafif vitrifikasyon oluşumu, (d) Yapraklarda ağır vitrifikasyon oluşumu 52

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.4 Farklı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)	54
4.5 Farklı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)	54
4.6 Farklı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda vitrifikasyon oluşum oranları (%)	56
4.7 (a) Yarı katı kültür koşullarında sürgün uzaması amacıyla alt kültüre alınan Myrobolan B eksplantı, (b) uzatma ortamına alınan rozet şeklinde eksplantlar, (c) uzatma ortamında kök oluşumu, (d) uzatma ortamında sürgün boylarında uzama ve kök oluşumları	57
4.8 Farklı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen boyları (cm)	58
4.9 (a) Yarı katı kültür koşullarında köklendirme ortamında kültüre alınan Myrobolan B bitkiciklerinde kök oluşumları, (b) köklendirme ortamındaki <i>in vitro</i> bitkicikler, serada cocopeat ortamına alınan erik kök anacının (c) 30 gün sonundaki gelişimi, (d) 90 gün sonundaki gelişimi	59
4.10 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)	61
4.11 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen boyları (cm)	62
4.13 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda vitrifikasyon oluşum oranları (%).....	63
4.14 Filtre köprülü tüplerde Myrobolan B bitkilerinde 30 günlük altkültür sonunda (a) M17 sıvı besin ortamında sürgün çoğaltımı, (b) E5 sıvı besin ortamında sürgün uzaması, (c) M16 sıvı besin ortamında vitrifikasyon oluşumu	64
4.15 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) (Filt. Köp. Tüp: Filtre köprülü tüp; Kar. Erlen: Karıştırmalı erlen; Filt. Köp. Erlen: Filtre köprülü erlen; Filt. Köp. Kar. Erlen: Filtre köprülü karıştırmalı erlen).....	64
4.16 Farklı sıvı kültür tiplerinde alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarından eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)	66
4.17 Farklı sıvı kültür tiplerinde alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen boyları (cm)	68
4.18 Farklı sıvı kültür tiplerinde alt kültüre alınan <i>in vitro</i> Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda vitrifikasyon oluşum oranları (%).....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.19 M17 sıvı besin ortamı içeren erlenlerde, (a) Filtre köprülü karıştırmasız, (b) Filtre köprüsüz karıştırmasız, (c) Filtre köprüsüz karıştırmalı ve (d) Filtre köprülü karıştırmalı kültür tiplerinde kültüre alınan <i>Myrobolan B.</i> eksplantlarında 30 günlük alt kültür sonunda sürgün gelişimleri ve vitrifikasyon oluşumları.....	70
4.20 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> <i>Myrobolan B</i> eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)	72
4.21 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> <i>Myrobolan B</i> eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)	72
4.22 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> <i>Myrobolan B</i> eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen boyları (cm)	73
4.23 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan <i>in vitro</i> <i>Myrobolan B</i> eksplantlarında 30 gün sonunda vitrifikasyon oluşum oranları (%)	74
4.24 Filtre köprülü tüplerde <i>Myrobolan B</i> bitkilerinde 30 günlük altkültür sonunda (a) M18 (b) M19 ve (c) M20 sıvı besin ortamında sürgün çoğaltımları.....	74
4.25 Sıvı kültür koşullarında mikroçoğaltılan sürgün demetlerinden elde edilen tekli eksplantların (a) Yarı katı kültür koşullarında köklendirilmesi (b) Köklendirme ortamında kök gelişimleri, (c) Sera alıştırma ortamına alınmaya hazır köklü bitkicik, (d) Serada torf perlit ortamına alınan erik kök anacınının 15 gün sonunda kök ve yaprak gelişimi	75

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.26 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında* 30 gün sonunda elde edilen çoğaltma katsayıları	77
4.27 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)	80
4.28 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları (adet)	80
4.29 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama sürgün boyları (cm)	82
4.30 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen sürgün demeti başına ortalama yaprak sayıları (adet)	83
4.31 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama gövde kalınlıkları (mm)	85
4.32 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları (mg)	86

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.33 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg)	88
4.34 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen vitrifikasyon oranları (%).	90
4.35 (a) RITA biyoreaktörlerde kültüre alınan 6 adet 2-3 sürgünlü eksplant, (b) Faklı inokülasyon yoğunluklarında eksplantlar içeren RITA biyoreaktör tankları (c) 6 adet inokülasyon yoğunluğu içeren saatte 20 sn daldırma süresi uygulanan RITA biyoreaktör, (d) Biyoreaktörden hasat edilen Myrobolan B çoklu sürgün demeti ve hasat edilen çoklu sürgün demetinde boy durumu (e) 8 adet eksplant içeren ve saatte 20 sn daldırma sıklığı uygulanan RITA biyoreaktörlerde vitrifikasyon ve morfofizyolojik bozukluk oluşumları	92
4.36 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarından elde edilen çoğaltma katsayıları.....	94
4.37 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam sürgün sayıları (adet).....	95
4.38 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları (adet).....	96

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.39 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama sürgün boyları (cm).....	97
4.40 RITA biyoreaktörlerde altkültür süreleri ve besin ortamı miktarlarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen sürgün demeti başına ortalama yaprak sayıları (adet).....	98
4.41 RITA biyoreaktörlerde altkültür süresi ve besin ortamı miktarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama gövde kalınlıkları (mm)	99
4.42 RITA biyoreaktörlerde altkültür süresi ve besin ortamı miktarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları (mg)	100
4.43 RITA biyoreaktörlerde altkültür süresi ve besin ortamı miktarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg)	101
4.44 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları (%).....	102
4.45 (a) ve (b) RITA biyoreaktörlerde kültüre alınan 6 adet 2-3 sürgünlü eksplant, (c) 250 ml besin ortamı içeren RITA biyoreaktörde 40 günlük alt kültür süresinin sonunda mikrosürgün demetleri, (d) Biyoreaktörden hasat edilen Myrobolan B çoklu sürgün demeti (e) ve (f) 350 ml besin ortamı içeren RITA biyoreaktörlerde 60 günlük alt kültür süresinin sonunda vitrifikasyon oluşumları ve morfofizyolojik bozukluklar	104

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.46 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama çoğaltma katsayıları	106
4.47 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam sürgün sayıları (adet).....	107
4.48 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet).....	107
4.49 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında ortalama sürgün boyları (cm).....	108
4.50 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam vitrifiye bitki sayıları (adet)	109
4.51 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında vitrifikasyon oluşum oranları (%).....	109
4.52 (a) RITA biyoreaktörlerinde mikroçoğaltılan sürgün demetlerinden elde edilen tekli eksplant, (b) Yarı katı kültür koşullarında 20 günlük altkültür süresi sonunda mikrosürgünde kök oluşumu (c) Serada torf: perlit ortamına alınan bitkicikler, (d) Serada aklimatizasyonu yapılan Myrobolan B bitkisinde 40 gün sonunda kök ve yaprak gelişimi.....	110
4.53 Balon tip geçici daldırma reaktör sistemi (a) 5 l cam balon reaktör tankı (b) 1.5 l cam besin ortamı tankı (c) Gaz besleme ünitesi (d) Biosis kontrolör ve balon tip geçici daldırma sistemi	112

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.54	Biosis balon tip geçici daldırma reaktörü özel yazılım ana ekranı 113
4.55	Biosis balon tip geçici daldırma reaktörü özel yazılım ayar ekranı..... 113
4.56	(a) 5 l Balon tip geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan 20 adet 2-3 sürgünlü eksplantlar (b) 30 günlük altkültür sonunda biyoreaktörde çoğaltılan sürgün demetleri (c) ve (d) 40 günlük alt kültür sonunda hasat edilen sürgün demetleri, (e) Hasat edilen çoklu sürgün demetinde sağlıklı mikrosürgünler, (f) Hasat edilen kısmen vitrifiye olmuş sürgün demeti 115
4.57	(a) Balon tip geçici daldırma biyoreaktörlerde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgün demetlerinden elde edilen ve yarı katı kültür koşullarında köklendirilen tek sürgünlü bitkicikler (b) Serada torf: perlit ortamına alınan bitkicikler, serada aklimatizasyonu yapılan bitkicikte (c) 15 gün sonunda sürgün gelişimi, (d) 40 gün sonunda kök ve sürgün gelişimi 116
4.58	RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen çoğaltma katsayıları 118
4.59	RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda belirlenen ortalama sürgün sayısı (adet) 119
4.60	RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen ortalama boyları (cm)..... 119
4.61	RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen ortalama yaprak sayıları (adet)..... 120

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.62 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen ortalama gövde kalınlıkları (mm).....	120
4.63 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen ortalama yaş ağırlıkları (mg)	121
4.64 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen ortalama kuru ağırlıkları (mg)	122
4.65 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen vitrifikasyon oranları (%)	123
4.66 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinde eksplant başına düşen ortalama sürgün sayıları (adet).....	124
4.67 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin aklimatizasyon oranları (%)	125
4.68 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin ortalama boyları (cm)	126
4.69 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin aklimatizasyon oranları (%)	127

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

4.70	Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin 20 günlük altkültür sonunda köklenme oranları (%).....	128
------	--	-----

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Türkiye 2013 yılı erik ve kayısı üretim miktarları (ton) ve ağaç varlıkları (Tüik verileri, 2014)	2
1.2 2013 – 2014 (Ocak-Ağustos) Türkiye geneli yaş meyvede ihracat yapılan ilk 10 madde (AKİB verileri, 2014)	2
1.3 Yıllar itibariyle sertifikalı meyve ve asma fidanı ile çilek fidesi üretim miktarlar (adet), (GTHB BÜGEM faaliyetleri, 2014)	3
2.1 En sık kullanılan geçici daldırma sistemlerinin genel özellikleri, avantajları ve dezavantajları (Georgiev et al., 2014)	23
3.1 Eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri.....	39
3.2 Tüm çalışmalar süresince kullanılan temel besin ortamları	40
3.3 Mikroçoğaltım ortamının belirlenmesi amacıyla kullanılan besin ortamlarının içerikleri.....	41
3.4 Sürgün uzatma ortamının belirlenmesi amacıyla kullanılan besin ortamlarının içerikleri.....	43
3.5 Sıvı kültür denemelerinde mikroçoğaltım ve sürgün uzatma ortamlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan besin ortamlarının içerikleri	44
3.6 Sıvı kültür denemelerinde mikroçoğaltımın geliştirilmesi amacıyla kullanılan besin ortamlarının içerikleri	45
4.1 Arazi koşulları ve sera koşullarındaki Myrobolan B bitkilerinden alınan nod eksplantlarında, kültüre alındıktan 30 gün sonra kontamine eksplant sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)	49

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.2 Arazi koşulları ve sera koşullarındaki donör bitkilerden alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon yöntemlerine göre 30 gün sonunda gözlenen kontamine eksplant yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları	50
4.3 Arazi koşulları ve sera koşullarındaki donör bitkilerden alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon yöntemlerine göre elde edilen kontamine eksplant yüzdeleri ile ilgili LSD gruplandırması*	50
4.4 Farklı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)**	53
4.5 Farklı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ile ilgili varyans analiz sonuçları	53
4.6 Farklı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam vitrifiye bitkicik sayıları (adet)* ve vitrifikasyon oranları (%)**	55
4.7 Farklı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında oluşan vitrifikasyon oranları (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	55
4.8 Farklı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda ölçülen sürgün boyları (cm)*	57
4.9 Farklı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında sürgün boyları (cm) ile ilgili varyans analiz sonuçları	58

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.10 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)*	60
4.11 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları (adet) ile ilgili varyans analiz sonuçları	60
4.12 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen sürgün boyları (cm)*	62
4.13 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam vitrifiye bitkicik sayıları (adet)* ve vitrifikasyon oranları (%)**	62
4.14 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında oluşan vitrifikasyon oranları (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	63
4.15 Farklı sıvı kültür tiplerinde alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)**	65
4.16 Farklı sıvı kültür tiplerinde alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları (adet) ile ilgili varyans analiz sonuçları	65
4.17 Farklı sıvı kültür tiplerinde alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen sürgün boyları (cm)*	67

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.18 Farklı sıvı kültür tiplerinde alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarının boyları (cm) ile ilgili varyans analiz sonuçları	67
4.19 Farklı sıvı kültür tiplerinde alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam vitrifiye bitkicik sayıları (adet)* ve vitrifikasyon oranları (%)**	68
4.20 Farklı sıvı kültür tiplerinde alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında oluşan vitrifikasyon oranları (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları	69
4.21 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)**	71
4.22 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen sürgün boyları (cm)*	73
4.23 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında alt kültüre alınan in vitro Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam vitrifiye bitkicik sayıları (adet)* ve vitrifikasyon oranları (%)**	73
4.24 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında* 30 gün sonunda elde edilen çoğaltma katsayıları	77
4.25 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen çoğaltma katsayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları	78

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.26 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen çoğaltma katsayıları ile ilgili LSD gruplandırması	78
4.27 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)*	79
4.28 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)*	79
4.29 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları	81
4.30 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları ile ilgili LSD gruplandırması*.....	81
4.31 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama sürgün boyları (cm)*	82

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.32 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen sürgün demeti başına ortalama yaprak sayıları (adet)*	83
4.33 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde elde edilen Myrobolan B sürgün demetlerinin ortalama yaprak sayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları	84
4.34 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B sürgün demetlerinin ortalama yaprak sayıları (adet) ile ilgili LSD gruplandırması*	84
4.35 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama gövde kalınlıkları (mm)*	85
4.36 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları (mg)*	86
4.37 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları (mg) ile ilgili varyans analiz sonuçları	87

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.38 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları (mg) ile ilgili LSD gruplandırması*	87
4.39 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg)*	88
4.40 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg) ile ilgili varyans analiz sonuçları	89
4.41 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg) ile ilgili LSD gruplandırması*	89
4.42 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen vitrifikasyon oranları (%)*	90
4.43 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları (%) ilgili varyans analiz sonuçları.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.44 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları (%) ilgili LSD gruplandırması*	91
4.45 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında* elde edilen çoğaltma katsayıları	93
4.46 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)*	94
4.47 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)*	95
4.48 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama sürgün boyları (cm)*	96
4.49 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama yaprak sayıları (adet)*	97
4.50 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama gövde kalınlıkları (mm)*	98
4.51 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları (mg)*	99

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.52 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg)*	100
4.53 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları (%)*	102
4.54 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları ile ilgili varyans analiz sonuçları	103
4.55 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları ile ilgili LSD gruplandırması*	103
4.56 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama çoğaltma katsayıları*	105
4.57 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama çoğaltma katsayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları	105
4.58 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)**	106

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.59 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları	106
4.60 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında ortalama sürgün boyları (cm)*	108
4.61 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam vitrifiye bitki sayıları (adet)* ve vitrifikasyon oranları (%)**	108
4.62 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları ile ilgili varyans analiz sonuçları	109
4.63 Balon tip geçici daldırma biyoreaktörde Myrobolan B bitkiciklerinin mikroçoğaltım denemelerinde 40 günlük altkültür sonunda ölçülen üretim parametreleri	114
4.64 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen üretim parametreleri değerleri.....	117
4.65 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen çoğaltma katsayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları	117
4.66 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen eksplant başına ortalama sürgün sayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları	118

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.67 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen yaş ağırlıklar ile ilgili varyans analiz sonuçları	121
4.68 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda elde edilen vitrifikasyon oranları ile ilgili varyans analiz sonuçları	122
4.69 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinde eksplant başına düşen ortalama sürgün sayıları (adet).....	123
4.70 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin ortalama boyları (cm)	124
4.71 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinde vitrifikasyon oluşum oranları.....	125
4.72 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin 20 günlük altkültür sonunda köklenme oranları*	126
4.73 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinden aklimatize olan toplam bitki sayıları ve aklimatizasyon oranları*	127

1. GİRİŞ

Dünyada birçok ülkede yaş meyve bitkisel üretim içinde önemli bir yer almaktadır. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)'nın en güncel verileri olan 2012 yılı verilerine göre; Dünyada toplam 56.5 milyon hektarlık arazide yaş meyve üretimi yapılmıştır. Söz konusu alanda yetiştirilen toplam yaş meyve miktarı 637 milyon ton olup, Dünya yaş meyve üretimi 2012 yılında 2011 yılına kıyasla %0.1 oranında azalış kaydetmiştir. 2012 yılı FAO verilerine göre; yaş meyve üretiminde Çin, yaklaşık %21.6'lık pay ve 137 milyon tonluk üretim ile ilk sırada yer alırken, bu ülkeyi sırasıyla Hindistan (71 milyon ton, %11.1), Brezilya (38.3 milyon ton, %6), ABD (26.5 milyon ton, %4.1) ve Endonezya (17.7 milyon ton, %2.8) izlemektedir. Ülkemiz yaklaşık 15 milyon tonluk yaş meyve üretimi ile dünya sıralamasında sekizinci sırada yer almakta ve küresel üretimden %2.4 civarında pay almaktadır (Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı verileri, 2014).

Dünyada toplam yaş meyve ihracatı 2012 yılı itibarıyla 61.8 milyar dolar seviyelerindedir. 2012 yılında toplam ihracat 2011 yılına göre %2.2'lik bir artış kaydetmiştir. Önde gelen ihracatçı ülkeler ise İspanya (7.4 milyar \$), ABD (6.2 milyar \$), Şili (4 milyar \$), Hollanda (3.8 milyar \$) ve İtalya (3.3 milyar \$)'dır. Trademap verilerine göre ülkemiz 1.7 milyar dolarlık ihracat hacmiyle 2012 yılı için dünya yaş meyve ihracatından %2.7'lik pay alarak 12'inci sırada yer almıştır (Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı verileri, 2014).

Erik ve kayısı subtropik ile soğuk ılıman iklim kuşağı arasındaki alanlarda yetişebilen, farklı iklim şartlarına uyum yeteneği yüksek meyve türleridir (Durmuş ve Yiğit, 2003). 2013 yılı Türkiye toplam erik üretimi 300 bin tona, kayısı üretimi 780 bin tona yaklaşmıştır. Türkiye, dünya kayısı üretiminde yaklaşık %20'lik payla birinci sıradadır. Türkiye'yi Pakistan, İran, Özbekistan ve İtalya takip etmektedir. Dünya kuru kayısı ihracatında Türkiye liderdir. Önemli ithalatçı ülkeler ise Rusya, ABD, İngiltere ve Almanya'dır (Çizelge 1.1), (Ünal, 2010; TÜİK verileri, 2014).

2013 ve 2014 yılı Türkiye geneli yaş meyve ihracatı yapılan ürünler arasında kayısı 27.213.461 kg ve 27.750.650 \$ ile altıncı, erik 10.769.713 kg ve 8.844.815 \$ ile onuncu sıradadır (Çizelge 1.2), (AKİB, 2014).

Çizelge 1.1 Türkiye 2013 yılı erik ve kayısı üretim miktarları (ton) ve ağaç varlıkları (TÜİK, 2014)

Ürün adı	Toplu meyveliklerin alanı (dekar)	Üretim (ton)	Ağaç başına ortalama verim (kg)	Meyve veren yaşta ağaç sayısı	Meyve vermeyen yaşta ağaç sayısı	Toplam ağaç sayısı
Erik	197.262	305.393	36	8.429.484	1.816.936	10.246.420
Kayısı	1.156.132	780.000	54	14.453.207	2.521.302	16.974.509

Çizelge 1.2 2013 – 2014 (Ocak-Ağustos) Türkiye geneli yaş meyvede ihracat yapılan ilk 10 ürün (AKİB, 2014)

S.N	Ürün	01.01.2013/31.08.2013		01.01.2014/31.08.2014		Artış&Azalış (%)		2014 Payı (%)	
		Miktar (kg)	Değer (\$)	Miktar (kg)	Değer (\$)	Miktar (kg)	Değer (\$)	Miktar (kg)	Değer (\$)
1	Kiraz, Vişne	54.678.185	155.437.899	50.521.786	144.323.707	-8	-7	12	35
2	Üzüm	80.325.471	73.985.793	87.976.797	74.365.866	10	1	20	18
3	Nar	31.770.735	25.575.714	47.184.388	32.514.800	49	27	11	8
4	Elma	20.637.541	9.532.335	91.171.563	31.685.980	342	232	21	8
5	Şeftali	28.828.377	24.935.846	34.902.003	30.738.322	21	23	8	7
6	Kayısı	41.732.208	42.713.154	27.213.461	27.750.650	-35	-35	6	7
7	İncir	8.940.996	19.361.713	7.167.413	18.584.382	-20	-4	2	4
8	Çilek	19.728.259	24.908.588	14.593.713	17.108.871	-26	-31	3	4
9	Karpuz	16.928.012	5.784.870	38.701.918	10.339.501	129	79	9	2
10	Erik	17.645.401	11.502.038	10.769.713	8.844.815	-39	-23	2	2

Önemli ihracat girdilerinden olan kayısı ve erik için üretim verimliliklerinin geliştirilebilmesi ismine doğru, kaliteli fidan kullanımına bağlıdır. Ekolojiye uygun verimli ve kaliteli çeşitler ve bunlara ait nitelikli fidan kullanımı ile birim alandan elde edilecek verimin yükseltilmesinin yanı sıra, ürünün kalitesinin de iyileştirileceği tüm üreticiler tarafından bilinmektedir. İklim ve toprak koşullarına uyumlu standart anaçlar üzerine, pazarın isteklerine uygun çeşitlerin aşılandığı

sağlıklı fidanlar ile kurulan meyve bahçeleri ve bağlar yüksek verim ve kaliteli ürünün güvencesinin ilk adımını oluşturmaktadır (Gençtan ve ark., 2008).

Ülkemizde yeni meyve bahçesi ve bağ tesislerinin sayısındaki artışlar, nitelikli meyve ve asma fidanına olan gereksinimin her yıl daha da artmasına yol açmaktadır. Bu durum, fidan üretim ve dağıtımında sağlıklı planlamaların yapılmasını zorunlu hale getirmiştir. Çizelge 1.3 'de, ülkemizde 2009-2013 yılları arasında üretilen sertifikalı üretim materyallerinin miktarları gösterilmektedir (GTHB-BÜGEM, 2014).

Çizelge 1.3 Yıllara göre sertifikalı meyve ve asma fidanı ile çilek fidesi üretim miktarlar (adet), (GTHB-BÜGEM, 2014)

Yıllar	Meyve Fidanı (adet)	Asma Fidanı (adet)	Çilek Fidesi (adet)	Toplam (adet)
2009	19.914.532	2.032.860	31.260.000	53.207.392
2010	27.953.671	3.407.915	32.257.000	63.618.586
2011	30.895.364	3.499.880	30.447.000	64.872.244
2012	45.394.005	3.393.588	32.221.084	81.008.677
2013	56.027.584	7.129.690	51.123.140	114.280.414

Modern meyvecilik için aşılı fidan kullanımı vazgeçilmez bir unsur haline gelmiştir. Kök anaçları üzerine, üstün çeşitlere ait kalemelerin aşılınması ile üretilen fidanlar kullanılarak çeşitli avantajlar elde edilmektedir. Bunlar; meyve ağaçlarının uygun olmayan ekolojik şartlarda yetiştirilmesi, ağaçlarda gelişmenin kontrol altına alınması, bodurlaştırıcı anaçlar ile küçük taçlı ağaçlar elde edilmesi, gençlik kısırlığı döneminin azaltılması, bazı bodurlaştırıcı anaçlar ile üzerine aşılı çeşidin ilk yıllarda verime yatmasının sağlanması olarak sayılabilir. Anaçlar, üzerine aşılana çeşidin su ve mineral alımını, toprak kaynaklı patojenlere dayanımını ve çevresel stres koşullarına toleransını etkilemektedir. Anaçların, aşılandıkları ağaçların canlılığı, şekli, ömrü, verimi, tohum başlangıcı, meyve iriliği, meyve rengi, meyvenin olgunlaşma süresi, meyve tutumu, çiçek tomurcuğu teşekkülü, hatta budama ve terbiye sistemi üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. İyi bir anaç; çelik ile uyumlu, hastalık ve zararlılara dayanıklı ya da toleranslı olmalı ve farklı toprak tipleri ile iklimsel koşullara adapte olabilmelidir (Gençtan ve ark., 2008; Hernandez et al., 2010).

Aşılama uygulamasının başarısı, aşı uygulamasını yapan kişinin deneyimlerine bağlıdır. Füzyonun ilk aşaması, anaç ve çeliğin kesilen temas bölgelerinde kallus oluşumu ile başlar. Kalluslar hücre bölünmesi ve çoğalmasını sürdürüp sıkıca kaynaşırlar. İkinci aşamada, kallus yardımıyla anaçtan çeliğe doğru besin ve su taşınır ve yeni sürgünlerin uzaması, birleşme bölgesinin kalınlaşması sağlanır. Böylece, anaç çelik füzyonu tamamlanmış olur. Aşı uygulamasının başarısını etkileyen diğer önemli faktörler, hava ve toprak sıcaklıkları, nem ve gübrelemedir (Tsvetkov et al., 2013).

Aşılı fidan kullanımının getirdiği avantajlar, meyve anaçları üretimini de önemli bir sektör olarak karşımıza çıkarmaktadır. Meyve anaçları geleneksel olarak, yavaş ve yüksek işçilik gerektiren vejetatif yöntemler (ayırma ya da çelikle köklendirme gibi) ya da uniform olmayan materyal üretimine neden olan generatif (tohum yoluyla) yöntemler ile çoğaltılmaktadır. Doku kültürü yöntemlerinin, meyve anaçlarının vejetatif çoğaltımı için kullanımı 70'li yılların ortalarında başlamış ve o tarihten bu yana oldukça fazla sayıda protokol geliştirilmiştir. Erik, kiraz, armut anaçları gibi birçok kök anacında *in vitro* klonal çoğaltım metodları bildirilmiştir (Vujovic et al., 2012).

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan, tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, kök, sürgün vb.), yapay besin ortamlarında ve virüslerden ve diğer mikroorganizmalardan arındırılmış şartlar altında genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitkiyi hızlı ve düşük maliyette çoğaltmak amacıyla kullanılan bir doku kültürü tekniğidir (Zou, 2010; Özkaynak ve Samancı, 2005).

Yarı katı besin ortamlarında gerçekleştirilen klasik bitki doku kültürü prosesinde, eksplantların çoklu sürgün oluşturma oranlarının düşük olması, yeni üretim yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Ölçek büyütme olanakları, fiziksel ve kimyasal çevrenin kolay kontrolü ve düşük üretim maliyetleri gibi avantajları nedeniyle, mikroçoğaltımın çeşitli biyoreaktörlerde gerçekleştirilmesi önerilmektedir (Berthouly and Etienne, 2005).

Mikroçoğaltım için geliştirilen düşük maliyetli tek kullanımlık (disposable) biyoreaktörler, araştırma ve laboratuvar ölçekleri için uygundur, ancak ticari uygulamalar için daha büyük reaktörlere ihtiyaç duyulmaktadır (Gonzalez, 2005). Bu amaçla, hava kaldırmalı (air lift) biyoreaktörler, karıştırılmalı tank biyoreaktörler (stirred tank), kabarcık kolonu (bubble column) ve balon tip kabarcık kolonu (balloon type bubble column) gibi çeşitli biyoreaktör sistemleri ölçek büyütme olanakları, fiziksel ve kimyasal çevrenin sıkı bir şekilde kontrolü ve üretim maliyetlerinin düşürülmesi gibi avantajları nedeniyle mikroçoğaltım için kullanılmaktadırlar (Paek et al., 2001; Takayama and Akita, 2008).

Bu projede kök boğazı çürüklüğüne dayanıklı, kuvvetli bir erik kök anacı olan ve geleneksel yöntemlerle köklendirilmesinde problem yaşanan, ekonomik olarak önemli Myrobolan B (*Prunus cerasifera* L.) çeşidinin nod eksplantlarının yarı katı besin ortamında rejenerasyonlarından sürgünlerin elde edilmesi, bu sürgünlerden, geçici daldırma sisteminin kullanıldığı 1 l'lik RITA® biyoreaktörlerde ve 5 l'lik kabarcık kolon biyoreaktörlerde kitlesel üretimin gerçekleştirilmesi, üretilen materyallerin köklendirilmesi ve sera koşullarına aktarılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

2.1 Bitkisel Özellikler

Rosaceae familyasına ait *Prunus* cinsi 200'ün üstünde, yaprak döken ve her dem yeşil ağaçlar ile çalılardan oluşmaktadır. Dünyada hem sıcak iklim kuşağında, hem de tropik ve sub-tropik bölgelerde geniş bir yayılım göstermektedir (Chin et al., 2014a).

Taş çekirdekli olarak adlandırılan *Prunus* çeşitleri yenilebilir meyveleri ve besleyici özellikteki çekirdekleri için çok eski çağlardan beri kültüre alınmaktadır (Çalışır ve ark., 2005). Temel ticari taş çekirdekli sulu mezokarp dokusu yenilenler, şeftali ve nektarin (*P. persica* L.), Avrupa eriği (*P. domestica* L.), Japon eriği (*P. salicina* L.), vişne (*P. cerasus* L.), kiraz (*P. avium* L.) ve çekirdeği yenilen badem (*P. dulcis* Miller) sayılabilir (Burgos et al., 2007). Antosiyanin, pektin, karotenoid gibi biyoaktif madde içeriklerinin yoğun olması sebebiyle, erik ve kayısı çeşitleri de önemli taş çekirdekli lerdendir. Ayrıca A vitamini, kalsiyum, magnezyum, potasyum, lif içerikleri yüksek olup, karbonhidrat ve antioksidan kaynağıdır (Tülay, 2003; Ionica et al., 2013).

Erik, farklı özellikteki alt türlerinin çokluğu, farklı ekolojilere uyumu ve anaç zenginliği sayesinde geniş alanlara yayılmıştır. Dünyada beş kıtada yetiştiriciliği yapılmaktadır. Kültürel işlemlerin kolaylığı, hasat sezonunun oldukça uzun olması ve besleyici değerinin yüksek olması nedeniyle, dünyada ve ülkemizde erik yetiştiriciliğine olan ilgi giderek artmaktadır. Erik çeşitleri dünya üzerinde geniş bir yayılım göstermekte, elma, şeftali ve armuttan sonra dördüncü sırayı almaktadır. Ülkemizde ilk erik hasadı *Prunus cerasifera* L. türüne ait canpapaz gurubu eriklerle erkenci turfanda olarak Akdeniz bölgesinde başlar. En son erik hasadı ise *P. salicina* L. ve *P. domestica* L. grubu eriklerden geçici çeşitlerle son bulur. Geçici eriklerin çeşitlere göre farklı depolama şartlarında muhafaza edilmesiyle pazarlama süresi uzatılarak yaklaşık 9-10 aya çıkarılmaktadır (Karakaya ve ark., 2006; Karamürsel, 2011; Ionica et al., 2013).

Erik yetiştiriciliğinde farklı özellikteki alt türlerin çokluğundan dolayı iklim istekleri birbirinden farklılık gösterir. Mevcut türler içerisinde değişik iklim koşullarına en iyi uyabilen *P. cerasifera*'dır. Anadolu coğrafyasının bu türün anavatanı olması nedeniyle bu alanda oldukça yaygın olarak yetişmektedir. Avrupa grubu erikler ile Japon grubu erikler olgunlaşma zamanları ve genetik kompozisyonları bakımından farklılık göstermektedir. Avrupa erikleri kışı nispeten soğuk geçen soğuk ılıman iklimlerde rahatlıkla yetiştirilirken, Japon eriklerin yetiştiriciliğinde nispeten daha ılıman bölgeler tercih edilmektedir (Tian and Sibbald, 2007; Karamürsel, 2011).

Meyve ağaçları tınlı, kumlu-tınlı ve tınlı-kireçli topraklarda yetiştirilmektedir. Köklerinin derine inmesinden dolayı taban suyunun en az 2–4 m derinlikte olması gerekmektedir (Koçal, 2011). Farklı özelliklerdeki kök anaçlarının kullanılabilmesi nedeniyle, değişik toprak şartlarında erik ve kayısı yetiştiriciliği rahatlıkla yapılabilir. Anaçlar, üzerine aşılı çeşide ağaç şekli ve büyüklüğü, çeşitli toprak ve iklim şartlarına adaptasyonu, ürüne yatma, ürün kalite ve miktarı, çeşitli hastalık ve zararlılara dayanıklılık yönünden etki etmektedirler. Erikler ve kayısılar için anaç olarak muhtelif erik ve kayısı türleri ile birlikte şeftali, kayısı ve badem anaçları da kullanılabilir (Karamürsel, 2011).

Ülkemizde can erikleri (yeşil erikler) olarak bilinen *P. cerasifera*, ABD ve Avrupa'da Myrobolan erikleri olarak tanınmakta olup, çit bitkisi, süs ağacı ya da meyve fidanı olarak kullanımları yanında farklı çevresel koşullara iyi adapte olduklarından, erik yetiştiriciliğinde kök anacı olarak da kullanılmaktadırlar. Myrobolan eriği, diploid ($2n=2x=16$) türlerin melezlenmesi sonucu oluşmuştur ve Balkanlar, Asya ve Kafkas bölgesinden bazı alt türlerle birlikte Avrupa erikleri grubundan sayılmaktadır. Bu türlerin seleksiyonu sonucu elde edilen bazı çeşitler, iyi kalite özellikleri ya da kök ur nematoduna (*Meloidogyne* spp.) dayanıklılıkları dolayısıyla ekonomik olarak önemli olmaya başlamışlardır. Türkiye'de yetişen kültür tipleri ve yabani eriklerin çoğu *P. cerasifera* çeşitleridir ve Anadolu, Akdeniz bölgesi ve Ege bölgesi gibi geniş bir alana yayılmışlardır. Özellikle Akdeniz bölgesi, ekonomik olarak önemli birçok yeşil erik genotipinin yetiştiği

bölge olarak, erik çeşitliliği bakımından diğerlerine oranla daha zengindir (Ayanoğlu ve ark., 2007; Sutherland et al., 2009; Karamürsel, 2011).

Prunus cerasifera L.'nin sistematik sınıflandırması aşağıda belirtilmiştir.

Sınıf	: <i>Magnoliopsida (iki çenekliler)</i>
Takım	: <i>Rosales</i>
Familiya	: <i>Rosaceae (gülgiller)</i>
Alt familiya	: <i>Prunoideae</i>
Cins	: <i>Prunus</i>
Tür	: <i>Prunus cerasifera</i> L., (Horvath et al., 2011)

Meyve üreticileri, meyve bahçelerinden mümkün olduğu kadar erken verim almayı hedeflerken, fidan üreticileri de kaliteli fidan üretimine odaklanmıştır. Hastalıklara ve zararlılara dayanıklı, abiyotik stres koşullarına toleranslı meyve bahçelerinin kurulması amacıyla uygun kök anaçlarının seçilmesi sürdürülebilir meyve üretimi için önemli bir avantajdır (Hrotko, 2008).

Ülkemizde ve dünyada en çok kullanılan erik tohum anacı *P. cerasifera*, özellikle Avrupa grubu (*P. domestica*) erik çeşitleri için tercih edilmekle beraber, Japon grubu (*P. salicina*) erikler için de uygundur. Erik klon anaçlarının da birçoğu *P. cerasifera* klonu veya melezlemeleri ile elde edilmiştir. Erik klon anaçları erik yetiştiriciliğinin yanı sıra bazı kayısı, badem ve şeftali gibi farklı türler için de anaç olarak kullanılmaktadır. Erik klon anaçları içinde en yaygın olarak kullanılan Myrobalan B anacı, kireçli, ağır, drenajı kötü, hafif, kuvvetli ve zayıf gibi çeşitli topraklara iyi uyum sağlar. Kuvvetli ve verimli ağaçlar oluşturur, yoğun dikime uygundur. Nematod, bakteriyel kanser ve *Verticillium*'a duyarlı, kök boğazı çürüklüğüne ve kuraklığa orta derecede dayanıklıdır. Kayısı, badem, erik için ortak anaçtır (Karamürsel, 2011; Koçal, 2011).

2.2 Myrobalan B. (*P. cerasifera*) Çoğaltım Teknikleri

Meyve yetiştiriciliğinde kullanılan anaçlar üretilme şekline göre generatif (tohum anaçları) ve vejetatif (klon anaçları) olarak iki grupta toplanır. Üretilecek bitkinin yabani çeşidinin tohumlarından elde edilen ve çöğür olarak adlandırılan

tohum anaçları, yabancı döllenenmeden dolayı morfolojik, fizyolojik, kimyasal ve kalıtsal yapı bakımından ne birbirlerine, ne de ana ve tozlayıcı bitkilere benzerler (Karamürsel, 2011).

Çöğür anaçları, büyüme ve diğer kalıtım farklılıkları, kuvvetli büyümeleri ve geç verime yatmaları nedeniyle zamanla terk edilmektedir. Bunun yanı sıra, bazı çöğürler ağır topraklarda gelişmemekte ve özellikle *Phytophthora* kök çürüklüğü hastalığına karşı oldukça duyarlılık göstermektedir (Arıcı, 2008).

Klonal anaçlar, çelik, daldırma, kök veya dip sürgünü ve doku kültürü gibi vegetatif yöntemlerle üretilen anaçlardır. Bu anaçlar tüm özellikleri bakımından hem birbirlerine, hem de alındıkları ana bitkiye benzerler. Klonal anaçlar modern meyvecilikte arzu edilen anaç ve kalem standardizasyonu sağlamak ve bir örnek bahçe kurma imkânı oluşturmaktadır. Klonal anaçlar gençlik kısırılık döneminin kısa sürmesinden dolayı daha erken dönemde meyveye yatmaktadır. Ancak klonal kök anaçlarının üretim maliyetleri çöğürlere göre daha yüksektir (Arıcı, 2008; Hrotko, 2008; Sarropoulou et al., 2014).

Klonal *Prunus* anaçları, vegetatif olarak çelikleme ve mikroçoğaltım metodları ile çoğaltılmaktadır (Jakab et al., 2008). Bir bitkiden kesilen köksüz dal, yaprak, göz, gövde ve kök parçalarına çelik, çeliklerin uygun çevre koşullarında köklendirilmesi ile yeni bitkilerin elde edilmesi işlemine de çelikle çoğaltma denir. Çelikler genellikle yeşil çelik, odun çeliği veya kök çeliği olarak kullanılmaktadır. Odun çelikleri ile üretilmeyen türlerin ve anaçlarının yeşil çelikleri, hormon ile muamele edilerek, nem kontrollü seralarda, sisleme altında köklendirilir. Çelikle çoğaltma düşük maliyetli bir yöntem olmakla birlikte köklenme oranları, türler arasında oldukça değişkenlik göstermektedir (Kara, 2011). Pek çok hastalık etmeni çelikler ile yeni bitkilere taşınmakta ve zaman içinde klonda genetik bozulmalar meydana gelmektedir. Özellikle büyük ölçekli üretimler için çok sayıda çelik alınabilecek hastalıklardan ari damızlık parsellerin kurulması gerekmektedir (Yahyaoğlu ve ark., 2007). Myrobolan B. anacının çelikle üretimi köklenme oranının (%40) düşük olması sebebiyle ticari olarak yapılamamaktadır.

Fidan üretim teknolojilerinde son yüzyıldaki en önemli yenilikler; virüsten ari üretim yöntemleri ve mikroçoğaltım prosesinin meyve anaçlarına uygulanması ile meyve yetiştiricilerinin isteklerine uygun kalitede fidan üretiminin sağlanmasıdır (Hrotko, 2008). Laboratuar koşullarında sert çekirdekli meyve anaçlarının sürgün uçları ve yan sürgünleri farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren yarı katı yapay besin ortamlarında kültüre alınarak çoğaltılmaktadır. Türkiye ve Dünya’da iç ve dış pazarda öne çıkan sert çekirdekli meyve anaçları şeftali (GF677), kiraz (Maxma14, Gisela 5/6) ve erik (Myrobolan)’dır.

Avrupa Birliği ülkelerinin çoğu doku kültürü yöntemleri ile virüsten ari meyve fidanı ve üretim materyalleri elde etmektedir. Bazı ülkelerde ticari meyve bahçelerinin kurulumu için sadece virüsten ari üretim materyallerinin kullanımına izin verilmekte ve üye ülkeler arasında fidan satışı bitki pasaportları ile mümkün olmaktadır (Hrotko, 2008). Avrupa ülkelerinden İtalya, İspanya ve Yunanistan mikroçoğaltılmış anaç üretiminde önemli bir paya sahiptir. 2003 yılında İtalya’da, erik, şeftali, kiraz gibi çeşitleri içine alan 8 milyon *Prunus* kök anacı doku kültürleri ile üretilmiştir. Yine 2003 yılında Yunanistan’da yıllık 2 milyon sert çekirdekli meyve kök anacı üretimi yapılmıştır (Burgos et al., 2007; www.fao.org).

Myrobolan anacının mikroçoğaltımı amacıyla yapılan çalışmada 1 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA içeren ortamlarda çoklu sürgünlerin elde edildiği bildirilmiştir (Arıcı, 2008). Hossain et al. (2003), erik bitkilerinin mikroçoğaltımı için başlangıç materyali olarak, *in vitro* koşullarda %30 sükröz içeren hormonsuz MS (Murashige and Skoog 1962) ortamında çimlendirilen steril tohumlardan elde edilen sürgünleri, çoklu sürgün teşviki için 0.2 mg/l NAA ile farklı konsantrasyonlarda BA ve Kinetin içeren MS ortamlarında kültüre almışlardır. Eksplant başına en yüksek çoklu sürgün sayısı (6 adet), 0.5 mg/l BA ve 0.2 mg/l NAA içeren MS besin ortamında elde edilmiştir.

Yeni geliştirilen anaçların ve çeşitlerin hızlı çoğaltımı ve yayılması mikroçoğaltım yöntemi kullanılarak yapılmaktadır, ancak bazı fidan üreticileri, yüksek üretim maliyetleri sebebiyle özellikle anaçlarda geleneksel çoğaltım

yöntemlerine geri dönme eğilimindedirler (Hrotko, 2008). Mikroçoğaltım tekniğinin ticari anlamda geniş çapta uygulanabilmesi için işçilik, genel yönetim giderleri ve büyüme odasındaki birim alan kayıpları azaltılmalı, hızlı ve verimli üretim prosesleri tasarlanmalıdır (Ziv, 2005; Afreen, 2006).

2.3 Büyük Ölçekte Mikroçoğaltım için Maliyet Düşürücü Yöntemler

Mikroçoğaltım geleneksel klonal çoğaltım yöntemlerine göre oldukça önemli avantajlara sahiptir. Bunlar arasında en önemlisi, yeni genotiplerin büyük ölçeklerde üretimlerinin hızlı yapılabilmesidir. Diğer avantajları; hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyallerin elde edilmesi, üretilen bitkilerin fenotipik ve genotipik olarak aynı olması, geleneksel yöntemlerden daha kısa kültür süresi sağlaması, zor üretilen türlerin üretimini mümkün kılması ve kütleli üretimde daha az başlangıç maddesine ihtiyaç duyulması olarak sıralanabilir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Önemli avantajlarının yanı sıra, mikroçoğaltım sistemlerinin ticari kullanımlarını sınırlayan çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlerin başında hem mikroçoğaltım prosesinde, hem de besin ortamının hazırlanması, bitki kültür kaplarına doldurulması ve bu kapların yıkanması aşamalarında kullanılan işçilikler sebebiyle üretim maliyetlerinin yüksek olması gelmektedir. Konvansiyonel mikroçoğaltım prosesinde işçilik maliyetleri üretim maliyetlerinin %45-60'ını kapsamaktadır (Gonzalez, 2005). Diğer sınırlayıcı faktörler çok sayıda kültür kabı ve yarı katı besin ortamına ihtiyaç duyulması, bitkilerin *in vitro* büyüme oranlarının ve çoğaltma katsayılarının düşük olması ve dış koşullara alıştırmaya esnasında, hiperhidrisite ve transplantasyon şoku nedeniyle, yüksek miktarda kayıpların gerçekleşmesi olarak sıralanabilir. Klasik yarı katı besin ortamlarında yapılan mikroüretimlerde, agarlı besin ortamının kullanılması dolayısıyla otomasyon prosesinin planlanması da mümkün olamamaktadır (Rathore ve et al., 2004; Berthouly and Etienne, 2005).

Üretim maliyetlerinin düşürülmesi için düşük maliyetli jelleştirme ajanları ve kimyasallar ile düşük maliyetli kültür kaplarının kullanımı, elektrik tüketimleri için uygun maliyetli sanayi tarifelerinin kullanımı, *ex vitro* köklendirme

uygulamaları, sıvı kültürler ile biyoreaktör ve robotların kullanımı gibi yöntemler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Savangikar et al., 2005; Wang et al., 2012).

Mikroçoğaltım prosesi için sıvı kültür sistemlerinin uygulanması ile işçilik giderlerinin düşürülmesinin yanı sıra, bitki kültür kabı kullanımı da azaldığı için, doku kültürü laboratuvarlarının en yüksek işletme maliyetlerini oluşturan bitki büyüme odası ihtiyacı da azalmaktadır. Sıvı besin ortamının aynı kültür kabı içinde yenilenebilme olanağı, uniform kültür koşullarının sağlanması ve otomasyon kolaylığı sıvı kültür sistemlerinin diğer önemli avantajlarıdır (Berthouly and Etienne, 2005). Eksplantların sıvı besin ortamında hareket etmesi, apikal dominansının yıkılmasına ve bitkicikte birçok sürgün tomurcuğunun oluşumuna neden olmaktadır (Zhu et al., 2005; Takayama and Akita, 2008). Sıvı kültür sistemlerinde elde edilen bitki çoğaltma katsayılarının agarlı kültürlerle göre daha yüksek olması, hedeflenen sayıda sürgün çoğaltımı için daha kısa altkültür sürelerine ihtiyaç duyulması ve çoğaltılan sürgünlerin kalitelerinin iyileştirilmesi bu sistemlerin büyük ölçekte ticari olarak uygulanabilirliğini sağlamaktadır (Albany et al., 2005; Farahani and Majd, 2012).

2.3.1 Ticari mikroçoğaltım için biyoreaktörlerin kullanımı

Biyokütle üretimi (nihai ürün olarak hücreler, organogenik ya da embriyogenik sürgün demetleri, sürgünler ya da kökler), bitkisel metabolit ya da enzim üretimi gibi büyük ölçekli proseslerin düşük maliyetli olarak gerçekleştirilebilmesi için *in vitro* bitki hücrelerinin kültüre alındığı farklı biyoreaktör konfigürasyonları geliştirilmiştir (Paek et al., 2005).

Biyoreaktörler karıştırma metotlarına ve tank yapılarına göre temel olarak mekanik karıştırmalı biyoreaktörler (karıştırmalı tank biyoreaktör, döner tamburlu biyoreaktör gibi) ve hava karıştırmalı ya da karıştırmasız biyoreaktörler (basit havalandırmalı biyoreaktör, kabarcık kolon biyoreaktör, hava kaldırmalı biyoreaktör, balon tip kabarcık kolon gibi) olarak sınıflandırılmaktadır (Paek et al., 2005; Takayama and Akita, 2008).

Mekanik karıştırmalı tank biyoreaktörler; ölçek büyütmenin kolay olması, etkin sıvı karıştırma ve oksijen transferi sağlaması, alternatif karıştırıcıların

kullanılması ve ‘iyi üretim uygulamaları’ (GMP) standartının kolay uygulanması gibi avantajları nedeniyle geniş kullanım olanağı bulmuşlardır. Bununla birlikte, mekanik karıştırmalı biyoreaktörlerin yüksek enerji gereksinimi, yüksek kayma gerilimi, sızdırmazlık ve yüksek biyoreaktörlerde karıştırıcı milinin sabitlenme zorluğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Paek et al., 2005; Georgiev et al., 2013). Mikrobiyal hücreler ile karşılaştırıldığında bitki hücre ve dokuları kayma gerilimine daha hassas oldukları için mekanik karıştırmalı biyoreaktörlerde, özellikle karıştırıcılar ile ilgili çeşitli modifikasyonlar yapılmaktadır (Ziv, 2005).

Pnömatik karıştırmalı reaktörlerde (hava kaldırmalı ve kabarcık kolon biyoreaktörler), reaktörün tabanında bulunan dağıtıcı (sparger) ile reaktör içine hava ya da gaz karışımı dağıtılmakta ve bu sayede havalandırma, karıştırma ve sıvı sirkülasyonu sağlanmaktadır (Georgiev et al., 2013). Hava kabarcıklı biyoreaktörlerin temel avantajları; düşük kayma gerilimleri, düşük enerji ihtiyaçları ve kolay kurulumlarıdır. Kabarcık kolon biyoreaktörlerde kabarcıklar daha düşük kayma gerilimi oluştururlar. Bu sebeple bitki organ kültürleri için çok uygundur. Ancak hem hava kaldırmalı, hem de kabarcık kolon biyoreaktörlerde yüksek hacimlerdeki havalandırmanın etkisi ile köpük oluşumu gerçekleşmektedir (Paek et al., 2005). Köpük oluşumu ve tank duvarında hücre gelişimi olguları tank çapı ile tankın üst bölümünün aynı büyüklükte olmasına bağlıdır. Bu problemin çözümü için mikroçoğaltım prosesinde balon tip biyoreaktörlerin kullanımı önerilmektedir (Paek et al., 2001).

2.3.1.1 Biyoreaktör tasarım kriterleri

Bitki hücre ve organ kültürlerinde kullanılan biyoreaktörler için temel dizayn parametreleri olarak; yeterli oksijen transferi, düşük kayma gerilimi ve iyi karıştırmanın sağlanması göz önünde bulundurulmalıdır. Ölçek büyütme çalışmalarında, sistemin düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olması kadar, karıştırma ve kütle transferi ihtiyaçları ile hücre ve dokuların kayma gerilimi hassasiyetleri arasında denge sağlanması da önemlidir (Georgiev et al., 2013). Biyoreaktörler sıcaklık, karıştırıcı hızı, ortam pH’ı, çözünmüş oksijen, karbondioksit ve redoks potansiyellerinin görüntülenmesi ve kontrolü için farklı problemlerle donatılmıştır (Paek et al., 2001). Biyoreaktörler çevresel koşulların

büyüme ve gelişme üzerine etkilerinin belirlenmesi ve optimizasyonu amacıyla özgün koşulların oluşturulması için uygun sistemlerdir (Hohe and Reski, 2005).

Biyoreaktörün temel fonksiyonlarından biri reaktör içindeki oksijenin gaz fazından sıvı faza kütle transferinin sağlanmasıdır. Oksijen transferi, oksijenin sıvı ortamda düşük çözünürlüğü sebebiyle biyolojik sistemlerin optimum performanslarını ve ölçek büyütme olanaklarını kısıtlayan bir adım olmaktadır. Yüksek hücre yoğunluğu oksijen transfer katsayısının (kLa) azalmasına neden olmaktadır. kLa ; biyoreaktör tankının geometrik ve operasyonel karakteristiği, karıştırıcı hızı, sıvı hidrodinamiği, besin ortamı içeriği, hücre tipi, morfolojisi ve konsantrasyonu gibi birçok parametre ile ilişkilidir (Georgiev et al., 2013). Optimal hücre gelişimi için çözünmüş oksijen konsantrasyonunun kritik çözünmüş oksijen konsantrasyonunun üzerinde olması gereklidir. Kritik çözünmüş oksijen konsantrasyonu (DO_{2krit}), spesifik oksijen alımında ölçülebilen artışın olmadığı konsantrasyonun üzerindeki çözünmüş oksijen konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Çözünmüş oksijen konsantrasyonu DO_{2krit} değerinin altında olduğunda hücreler enerji kaybettiği için metabolizmaları ve morfolojileri direkt etkilenmektedir (Jackson, 2005; Paek et al., 2005).

Ziv (1999), hava kaldırmalı biyoreaktörlerde yüksek havalandırma oranlarının süspanse hücre kültürlerinde hücre büyümesini inhibe ettiğini bildirmiştir. Biyoreaktörlerde ölçek büyütme çalışmalarında dikkate alınması gereken en temel tasarım kriterlerinden biri yeterli oksijenin (DO_{2krit} üzerinde bir değer) sağlanmasıdır. Mikroçoğaltılmış bitkiler mikrobiyal kültürlerle oranla daha düşük biyolojik oksijen ihtiyacına sahiptir (Curtis, 2005).

Temel tasarım kriterlerinden bir diğeri, besin ortamı ile hücre ve dokuların sıvı faz içinde eşit dağılımını sağlayan karıştırıcıdır. Sıcaklık, pH ve substrat konsantrasyonlarının tamamının kontrolü reaktörde iyi bir karıştırmanın sağlanması ile mümkündür. Büyük ölçekli reaktörlerde yeterli karıştırma olmaması istenmeyen konsantrasyon değişimleri ve kütle transferinde verimlilik düşüşlerine neden olmaktadır (Georgiev et al., 2013). Karıştırma hava ile ya da mekanik olarak yapılabilir. Önemli olan bitki hücrelerine zarar vermeyecek, ancak

kütle transferini iyileştirecek optimum karıştırmanın sağlanmasıdır (Rizvi and Kukreja, 2014).

Kültüre alınan bitkiler ya da bitki dokusunun aerobik solunumunu sürdürülmesi için doku içine oksijen transferi gereklidir (Curtis and Tuerk, 2006). Mikrobiyal hücreler ile karşılaştırıldıklarında bitki hücreleri çok daha büyüktür ve kayma gerilimine daha hassastır. Mekanik karıştırma reaktörlerin dışında, hava kaldırmalı reaktörlerde de dağıtıcı (sparger)'ya yakın bölümlerde kayma gerilimi yüksektir. Karıştırma hızının düşürülmesi ile kayma geriliminin azaltılması genel çözüm olarak sunulabilir. Ancak yetersiz karıştırma sebebiyle oksijen ve ısı transfer oranları düştüğü ve homojenizasyon sağlanamadığı için hücre yığınları oluşabilir. Karıştırma ve havalandırmadan kaynaklanan kayma gerilimi hasarı uygun biyoreaktör tasarımı ile kontrol altına alınmalıdır (Georgiev et al., 2013).

Yarı katı ve sıvı kültürlerde ortamın başlangıç pH değeri genellikle 5.5 ile 5.9 arasında ayarlanmaktadır. Besin ortamlarının çoğunluğu tamponlanmadığı için sterilizasyon esnasında ve biyomas büyümesi süresince pH değerinde değişiklikler oluşur. Süspanse hücre, organ ve embriyonik kültürlerde pH değeri 24-48 saatte hızla 4.0-4.5 değerine düşer. Bu hızlı düşüş başlangıçta amonyum alımı ve hücre yıkımına bağlı asidifikasyon sebebiyle oluşmaktadır. Bununla birlikte birkaç gün sonunda, nitrat alımına bağlı olarak pH sabit 5.0-5.5 değerine ulaşır (Ziv, 1999).

Süspanse kültürlerde pH, hücre ve dokuların besin alımını etkilediği için kontrol edilmesi gereken bir faktördür. Örneğin pH artışıyla birlikte amonyum alımı artarken, nitrat kullanımı azalmaktadır. Bunun dışında havadaki oksijen oranı %10-80 arasında düzenlendiğinde, besin ortamı hacmi ve kültür kabının büyüklüğüne bağlı olarak pH değeri 0.2 birim değişmektedir (Paek et al., 2001). Bilgisayar kontrollü biyoreaktör kültürlerinde, pH dalgalanmalarının kayıt altına alınması ve kontrolü ile kompleks biyolojik prosesin tekrarlanabilirliği sağlanmaktadır (Paek et al., 2005).

Ölçek büyütme çalışmalarının temel konularından biri de hücre ve dokuların besin yararlanımıdır. Mineral besinlerin alınımı kültür tipine, yarı katı ya da sıvı olmasına, bitki biyokütlesinin tipi ve büyüklüğüne, kültürün fiziksel özelliklerine

bağlıdır. pH, sıcaklık, ışık, havalandırma, mineral konsantrasyonu, ortam hacmi ve viskozitesi çeşitli besin elementlerinin absorpsiyon oranını etkilemektedir. Sıvı kültürlerde gelişen bitki hücreleri ortam komponentleri ile daha iyi temasta oldukları için, besin elementleri alımı ve tüketimi daha hızlıdır. Bu sebeple büyüme düzenleyicilerinin kullanımı çoğalma ve rejenerasyon potansiyellerinin kontrolünde katı kültürlerden daha etkilidir. Biyoreaktörde besin ortamı içeriğindeki besin ve hormon konsantrasyonlarındaki değişimlerin ölçümleri, organogenez ve embriyogenezin daha iyi maniple edilebilmesi için yeni olanaklar sunmaktadır (Ziv, 1999; Paek et al., 2005).

Kültür ortamının atmosferi genellikle %78 azot, %21 oksijen ve %0.036 karbondioksitten oluşur. Kültürde karanlık periyotta, karbondioksit oranı artarken, ışıktaki fotootrofik koşullar başladığında karbondioksit içeriği azalır. Yarı katı ve süspanse kültürlerde, özellikle sükroz kullanılmayan ortamlarda karbondioksit zenginleştirmesinin hücre büyümesi ve aklimatizasyonda canlılık oranları üzerine olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. Etilen, etanol, asetaldehit gibi hidrokarbonlar *in vitro* gaz atmosferini etkileyen diğer komponentlerdir (Ziv, 1999; Paek et al., 2001).

Biyoreaktörlerde inokulum olarak, totipotensi özelliğine sahip, çoklu sürgün tomurcukları, protokorm benzeri yapılar, meristematik dokular, somatik embriyolar ve koltuk altı (aksiler) tomurcuklarına sahip sürgün ya da gövde gibi rejeneratif dokular kullanılmaktadır. İnokulum morfolojisi ve optimum büyüklüğü genuslar ya da çeşitler arasında farklılık göstermektedir (Takayama and Akita, 2008). Başarılı bir kültür başlangıcı için minimum hücre sayısı ya da eksplant boyunun seçimi önemlidir. Çünkü bitki hücreleri temel bileşikleri difüzyon ile kaybettiklerinden düşük popülasyon yoğunluğunda iyi gelişim gösteremezler. Kültürün başlangıcında büyük eksplantların küçük eksplantlara göre daha yüksek canlılık ve daha hızlı gelişim gösterdikleri bildirilmiştir (Paek et al., 2001).

Biyoreaktörlerde sıcaklığın kültür üzerine etkisi ile ilgili bilgiler sınırlı olmasına karşın, biyoreaktörler genellikle gece ve gündüz ortalama 25°C'de tutulmaktadır. Biyoreaktörde ısıtma ya da soğutma kullanılarak sıvı ortamın sıcaklığı kolaylıkla ayarlanabilir. Ziv (1999), biyoreaktörde patates kültüründe

25°C’de çok sayıda ve büyük yumrular oluşurken, 17°C’de yumru büyüklüğünün azaldığını bildirmiştir.

Mikroçoğaltılmış bitkilerin toprağa başarılı bir şekilde alıştırılabilmesi için iyi gelişmiş ve yeşil yapraklı mikrosürgünlerin üretimi önemlidir. Bu amaçla biyoreaktör içinde sürgün demetlerinin iyi ışıklandırılması gerekmektedir. Işık yoğunluğu dokuyu geçerken logaritmik olarak azaldığı için özellikle yüksek yoğunluklu sürgün kültürlerinde ışık iletiminin verimi azalmaktadır (Takayama and Akita, 2008).

2.3.1.2 Mikroçoğaltımda biyoreaktör uygulamaları

Biyoreaktörlerin mikroçoğaltımda kullanımı ile ilgili ilk çalışma 1981’de begonya için bildirilmiştir. Bu tarihten sonra birçok bitkide sürgün, çiçek soğanı, miniyumru ve somatik embriyo gibi farklı eksplantlar için uygun olduğu ispatlanmıştır (Dewir et al., 2006).

Biyoreaktörler günümüzde Amerika, Japonya, Tayvan, Kore, Kosta Rika, Hollanda, İspanya, Belçika ve Fransa’da süs bitkileri ve soğanlı bitkiler, ananas, patates ve orman ağaçlarının ticari olarak mikroçoğaltımında kullanılmaktadır. Yeşil yapraklı süs bitkilerinde sıvı kültür kullanımının sürgün demeti başına üretim maliyetini 0.17 dolardan 0.06-0.07 dolara düşürdüğü tahmin edilmektedir (Ziv, 1999).

Kore Orman Araştırma Enstitüsünde geliştirilen 5.000 l biyoreaktörde 6 haftalık kültür süresinin sonunda 400 kg ginseng adventif kökleri üretilmiştir. 20 l balon tip kabarcık kolon biyoreaktörde, 120 tek nodlu patates eksplantından 8 haftalık kültür süresi sonunda 20.000 adet virüsten ari patates mikrosürgünlerinin üretildiği ve dış koşullara başarılı bir şekilde transfer edildiği bildirilmiştir (Paek et al., 2001).

Tatlı fesleğenden elde edilen ve lateral tomurcuklar içeren nodal eksplantlar 5 l hava kaldırmalı reaktörde, üç hafta süreyle kültüre alınmıştır. Kültür süresinin sonunda taze ağırlığın 2.5 kat arttığı gözlenmiştir (Kintzios et al., 2004).

Sıvı kültürler, somatik embriyogenez ya da organogenik yol izi ile bitki çoğaltımı amacıyla kullanılmaktadır. Organogenik yol izi yoluyla biyoreaktörlerde muz, çilek, patates, kavak, kahve, zambak, ananas, orkide, siklamen, Boston eğrelti, *Spathiphyllum*, *Ornithogalum*, *Nerine*, *Narcissus* ve *Gladiolus* başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Ziv (2005), sebze ve süs bitkilerinin çoğaltımı için cam kabarcık kolon biyoreaktör, asparagus, kereviz ve hıyar embriyonik kültürleri için internal loop biyoreaktör, süs bitkileri, sebze ve odunsu bitki türleri için 2-5 l tek kullanımlık plastik biyoreaktör kullanmıştır.

Balon tip kabarcık kolon biyoreaktörler (BTBB) hücre, doku ve organ kültürleri için uygulanabilir bulunmuştur. 300, 500 ve 1000 L hacimli pilot ölçekte BTBB'ler birçok önemli bitkide biyokütle üretimi için kullanılmaktadır. Paek et al. (2005), orkide türleri, krizantem, zambak gibi önemli süs bitkileri, elma, üzüm, sarımsak gibi bahçe bitkileri, tarla bitkilerinden patates ve tıbbi ve aromatik bitkilerden ginsengin biyoreaktörlerde üretimleri ile ilgili olumlu sonuçlar bildirilmiştir.

Chlorophytum borivilianum, yumrulu kökleri tıbbi olarak önemli steroidal saponinlerin kaynağı olarak gösterilen nesli tehlikede bir bitkidir. Bu bitkilerin sıvı kültürlerde biyoreaktörde çoğaltımı (biyokütle artışı 4.4 kat) ve çoğaltılan mikrosürgün demetlerinin yine sıvı kültürlerde köklendirilmesi (köklendirme başarısı %100) ve köklü bitkiciklerin cam alıştırma seralarında dış koşullara aktarımı (aklimatizasyon oranı %85) sağlanmıştır (Rizvi and Kukreja, 2014).

Jin et al. (2013), önemli asma anaçlarından 5BB, çilek ve *Vaccinium angustifolium* gibi birçok bitkide büyük ölçekli üretim için biyoreaktörlerin kullanıldığını bildirmişlerdir.

Chin et al. (2014b), geleneksel muz mikroçoğaltım prosesine alternatif olarak, daha düşük somaklonal varyasyon oranı elde edilen somatik embriyogenez yolunu önermiştir. Somatik embriyogenez ile biyoreaktör teknolojisi birleştirilerek, karıştırma, gaz kompozisyonu, verimli oksijen transferi, pH ve hidrodinamik güç gibi fiziksel ve kimyasal faktörlerin düzenlenmesi sağlanmış ve biyoreaktörlerde optimum bitki büyütme koşulları oluşturulmuştur.

2.3.1.3 Mikroçoğaltımda biyoreaktörlerin kullanımını kısıtlayıcı faktörler

Sıvı kültürlerde, yarı katı kültürlerle göre daha iyi büyüme ve çoğaltma katsayısı elde edilmekle birlikte, başlangıç için yüksek inokulum konsantrasyonu ihtiyacı, hiperhidrisite ve diğer şekil bozuklukları, solunumun durması (asfeksi), köpük oluşumu, kayma gerilimi, mekanik hasar, oksidatif stres, farklı büyüklüklerde bitkicik oluşumu ve mikrobiyal kontaminasyon riski gibi dezavantajlar sıvı kültürlerin büyük ölçekte kullanımını sınırlandırmaktadır (Ziv, 1999; Paek et al., 2001; Berthouly and Etienne, 2005; Zhu et al., 2005; Takayama and Akita, 2008). Sıvı kültürlerin gelişimsel problemlere neden olan stres sinyallerini teşvik ettiği bildirilmiştir (Ziv, 2005).

Bitkilerin sıvı ortamda kültüre alınmaları esnasında karşılaşılan problemlerden en önemlisi anormal morfogenez (hiperhidrisite) oluşumudur. Sıvı kültürde geliştirilen bitkilerin çoğu kırılğan, cam görünümlü olup sulu yaprak ya da sürgünler ile zayıf kök sistemine sahiptirler. Sıvı besin ortamından en çok etkilenen organlar yapraklardır. Hiperhidrik yapraklar, büyük hücre içi boşluklara, deforme vasküler yapıya ve anormal epidermise sahip mezofil dokuları oluşturmaktadırlar. Hiperhidrisite, transplantasyondan sonra bitki canlılığını etkilediği için *in vitro*'da oluşan yaprakların dökülmesine ya da çoğu zaman bitkinin ölmesine neden olur. Yaprakların iki temel görevi olan fotosentez ve solunum, hiperhidrik yapraklarda tam olarak fonksiyonel değildir ve bu sebeple dış koşullara aktarılan bitkilerin alıştırma performansı düşmektedir (Ziv, 1999; Berthouly and Etienne, 2005). Hiperhidrisite (vitrikasyon) semptomları; klorofil eksikliği, hücre camsılaşması, yüksek-lignifikasyon, epikutikular doku depolarının azalması ve enzimatik aktivite ile protein sentezindeki değişiklikler olarak sıralanabilir (Afreen, 2006).

2.3.2 Geçici daldırma sistemleri

Sıvı kültür sistemlerinin en temel dezavantajları olan hiperhidrisite ve asfeksi problemlerinin çözümü için bitki dokularının sıvı besin ortamı ile sürekli teması yerine, belli aralıklarla temasının sağlandığı geçici daldırma sistemleri

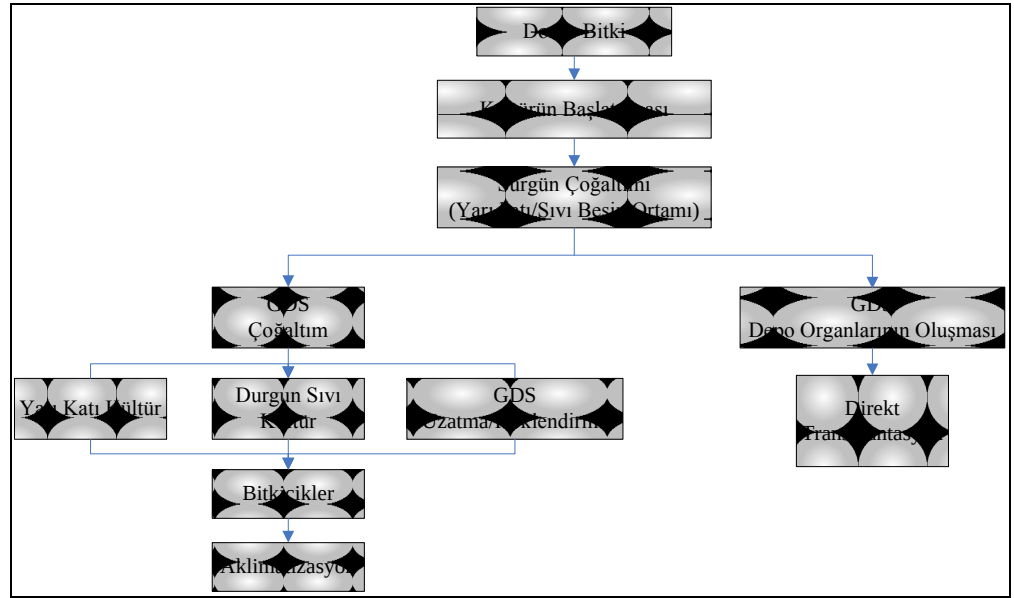
geliştirilmiştir. Sürekli daldırma sisteminde eksplantlar daha hızlı büyüme fakat %50 üzerinde hiperhidrisite oluşmaktadır (Fei and Weathers, 2014). Geçici daldırma sistemlerinde bitki büyüme ve gelişimleri ile hiperhidrisite oluşumları daldırma süresi ve sıklığının manipüle edilmesi ile kontrol edilmektedir. Daldırma süresince, bitkinin besin ortamı ile direkt teması ve daldırmanın olmadığı süreçte bitki yüzeyinin ince bir film tabakası şeklinde besin ortamı ile kaplanması ve ortamın kabarcıklanma yoluyla direkt oksijenlenmesi sayesinde mikroçoğaltım verimliliği artmaktadır. Karıştırmanın bulunmamasına bağlı olarak bitki dokularında mekanik stres oluşumu engellenmektedir. Geçici daldırma sistemlerinde üretilen bitkicikler yüksek foto-mikzotrofik metabolizma gösterdikleri için daha fazla besin elementine ihtiyaç duymaktadır. Bu yöntem; bitkiciklerin fotosentetik kapasitesini iyileştirmekten ziyade, foto-mikzotrofik koşullarda besin elementi alımını artırmaktadır. Bunun sonucu olarak, geçici daldırma sistemlerinden elde edilen bitkilerin aklimatizasyonda yarı katı kültürden elde edilenlerden daha iyi performans gösterdikleri bildirilmiştir (Escalona et al., 2003; Berthouly and Etienne, 2005; Afreen, 2006; Farahani and Majd, 2012).

Geçici daldırma sistemlerinin mikroçoğaltım amacıyla kullanımı; işçilik giderlerinin azalması, bitki büyüme odasının birim alanından etkin yararlanma, yüksek biyolojik verimlilik, bitki kalitesinin artırılması, basit otomasyon, düşük yatırım ve işletme maliyetleri gibi avantajları nedeniyle üretim maliyetlerini azaltmakta, dolayısıyla üretim verimliliğini artırmaktadır (Escalona et al., 2003; Gonzalez, 2005; Afreen, 2006; Farahani and Majd, 2012).

Geçici daldırma sistemlerinde otomasyon, daldırma süresi, sıvı ortamın drenajı ve bitki dokusunun gaza maruz bırakılması aşamalarının kontrolünü sağlamaktadır. Genellikle immersiyon süresi daha kısarken (birkaç dakika), gaza maruz bırakma süresi daha uzun (birkaç saat) tutulmaktadır. Geçici daldırma sistemlerinde optimal nem ve sıvı teması dokularda hiperhidrisite oluşumunu azaltırken, gaz kompozisyonu ile zenginleştirilmiş çevre, bitki hücrelerine oksijen taşınmasını önemli ölçüde kolaylaştırmaktadır. Geliştirilmiş oksijen transferi asfeksi gibi fizyolojik bozuklukların oluşumunu da azaltmaktadır. Besin ortamına sürekli daldırılan sıvı kültürlerde ise oksijen taşınımı esnasında birkaç katmanda

(gaz-sıvı; sıvı-katı arayüzleri) direnç ile karşılaştığı için kütle transferi verimliliği daha düşüktür (Georgiev et al., 2014).

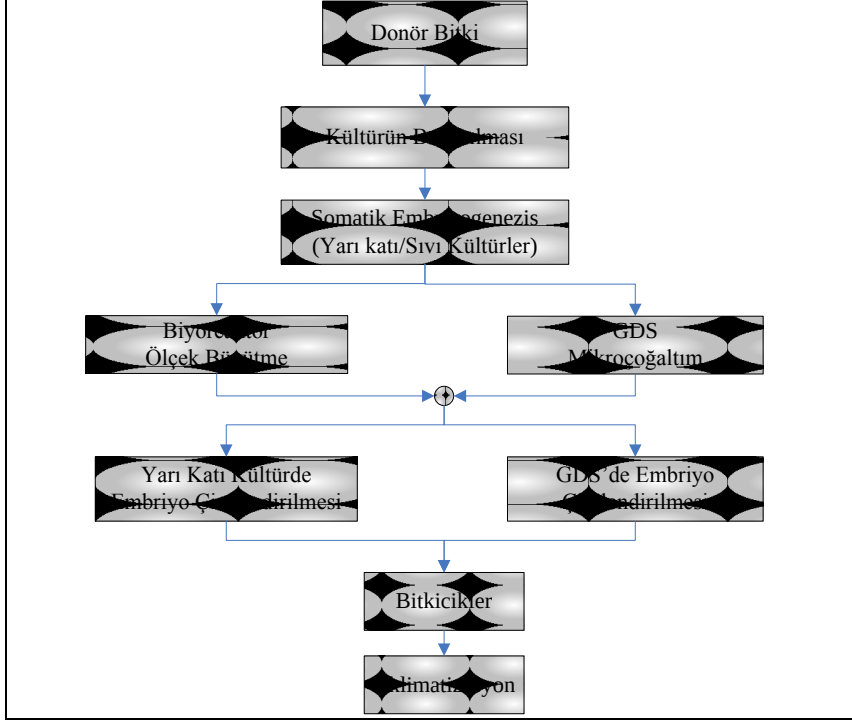
Geçici daldırma sistemlerinin ticari mikroçoğaltıma entegrasyonu için donör bitki seçimi, kültürün başlatılması ve sürgün çoğaltımını içeren standart *in vitro* kültür prosedürünün kurulması gerekmektedir. Elde edilen *in vitro* sürgünler, geçici daldırma sisteminde çoğaltılır ve çoğaltılan sürgünler daha sonra durgun sıvı ortamda veya yarı katı ortamda uzatılıp köklendirilebilir ya da aynı geçici daldırma sisteminde besin ortamı değiştirilerek köklendirilebilir. Son opsiyon işçiliği ve enerji giderlerini azalttığı için ticari açıdan daha uygulanabilir bulunmaktadır. Bir diğer seçenek ise geçici daldırma sisteminde mikroyumru gibi depo organlarının çoğaltımı ve bu organların aklimatizasyona gerek kalmadan direkt olarak sera ya da araziye transfer edilmesidir (Şekil 2.1) (Gonzalez, 2005).



Şekil 2.1 Organogenez yoluyla mikroçoğaltım prosesine geçici daldırma sisteminin -GDS- entegrasyonu (Gonzalez, 2005)

Geçici daldırma sistemi, somatik embriyo üretimi için kullanıldığında da benzer şekilde ilk aşamada kültürün başlatılması ve yarı katı ya da sıvı kültürde somatik embriyo oluşumunun indüklenmesi gerekmektedir. Ardından geçici daldırma sistemlerinde sekonder embriyogenezis yoluyla somatik embriyolar çoğaltılıp yarı katı ya da geçici daldırma sisteminde çimlendirilebilirler ya da

somatik embriyolar büyük ölçekte biyoreaktörlerde çoğaltılıp çimlendirildikten sonra geçici daldırma sistemlerinde bitkicikler geliştirilebilir (Şekil 2.2), (Gonzalez, 2005).



Şekil 2.2 Somatik embriyogenez yoluyla mikroçoğaltım prosesine geçici daldırma sisteminin – GDS- entegrasyonu (Gonzalez, 2005)

Geçici daldırma sistemlerinin ticari olarak kullanımlarına karar verilirken, kültüre alınan bitki materyallerinin gelişim, çoğaltım ve kalite değerlerinin kapsamlı bir şekilde kayıt altına alınması ve konvansiyonel üretim metotlarında elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması önemlidir. Geçici daldırma sistemlerinin verimliliğini etkileyen kültür parametreleri daldırma süresi, sıvı ortamın ve kültür kabının hacmi ile oksijenlenme ve basınçlı havalandırma olarak sıralanabilir (Berthouly and Etienne, 2005; Akdemir et al., 2014).

Geçici daldırma sistemleri için transparan cam ya da plastik kültür kapları kullanılmaktadır. Böylece kültüre alınan bitki materyallerinin dış ışık kaynaklarından yararlanması sağlanmaktadır (Georgiev et al., 2014).

Geçici daldırma sistemleri dört farklı kategoride sınıflandırılabilirler; i) yatık sallanan sistemler, ii) bitki materyalinin tam daldırıldığı ve besin ortamının

yenilendiği sistemler, iii) materyalin kısmı daldırıldığı ve besin ortamının yenilendiği sistemler, iv) besin ortamı yenilenmeden sıvı besin ortamının pnömatik güç kullanılarak transfer edildiği tam daldırma sistemleri (Çizelge 2.3), (Berthouly and Etienne; 2005; Polzin et al., 2014).

Çizelge 2.1 En sık kullanılan geçici daldırma sistemlerinin genel özellikleri, avantajları ve dezavantajları (Georgiev et al., 2014)

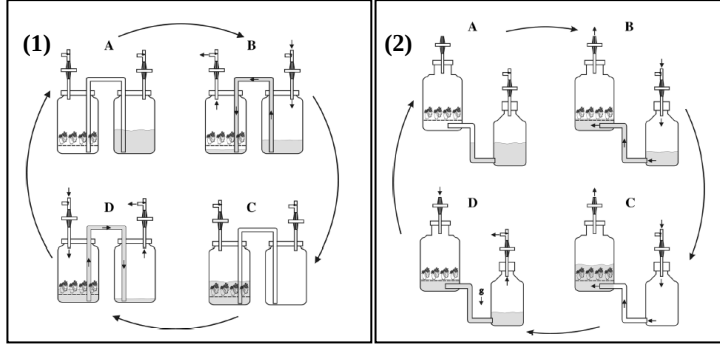
Geçici Daldırma Sistemi Tipi	Güç Girişi	Tank Materyali	Sterilizasyon Tipi	Avantajları	Dezavantajları
Çift Balon (Twin-flask) Sistemi (Şekil 2.3)	Pnömatik	Cam	Otoklav	-Tasarımı basittir. -Uygulaması kolaydır. -Sterilitenin uzun süre sürdürülebilir. - Yatırım maliyetleri düşüktür.	-Otomasyonu zordur. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygun değildir. -Besin ortamı aynı tank içinde yenilenemez.
Gel-git (Ebb and Flow) Sistemi (Şekil 2.3)	Pnömatik ve gravite	Cam	Otoklav	-Tasarımı basittir. -Büyük hacimler için kolay uygulanabilir. -Otomasyonu ve kullanımı kolaydır. -Besin ortamı aynı tank içinde yenilenebilir. -Enerji maliyetleri düşüktür.	-Kültürün büyümesi ile besin ortamı drenaj süresi artar. -Büyüme odasında ışık kaynağından uniform yarananma mümkün değildir. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygun değildir.
RITA Biyoreaktör (Şekil 2.4)	Pnömatik ve gravite	Polipropilen	Otoklav	-Otomasyon ile işletme kolay ve emniyetlidir. -Kompakt yapıdadır.	-Besin ortamı aynı tank içinde yenilenemez. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygun değildir.
Termo-foto biyoreaktör (Şekil 2.4)	Pnömatik ve gravite	Isıya dayanıklı cam	Otoklav	-Hassas sıcaklık kontrolü yapılabilir. -Entegre ışık kaynağı ile ışıktan optimum yararlanılabilir. -Otomasyonu kolaydır.	-Tasarımı karmaşıktır. -Besin ortamı aynı tank içinde yenilenemez. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygun değildir.
Gel-git sistem ile entegre doyurulmuş tübüler konvektif akış-Hibrit (Şekil 2.5)	Hidrolik ve pnömatik	Cam, paslanmaz çelik	Otoklav	-Yüksek yoğunluklu saçaklı kök kültürleri için dizayn edilmiştir -Tam otomatiktir. -Kök biyokütlesinin uniform dağılımını sağlar. -Oksijen transfer verimliliği yüksektir.	-Sadece saçaklı kök kültürleri için geliştirilmiştir. - Tasarımı karmaşıktır. İki aşamalı işletme gerektirir. -Biyokütlenin hasadı zordur.

Çizelge 2. 1 (Devam) En sık kullanılan geçici daldırma sistemlerinin genel özellikleri, avantajları ve dezavantajları (Georgiev et al., 2014)

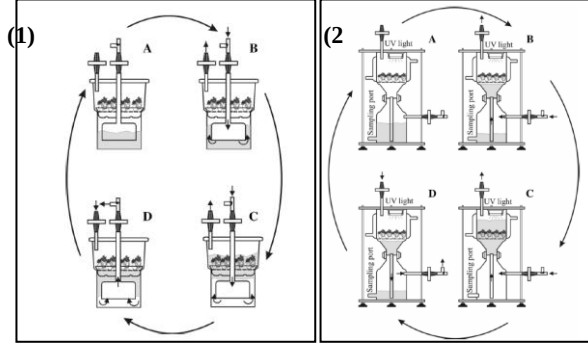
Geçici Daldırma Sistemi Tipi	Güç Girişi	Tank Materyali	Sterilizasyon Tipi	Avantajları	Dezavantajları
Kabarcık güdümlü immersiyon biyoreaktör (Şekil 2.6)	Pnömatik ve gravite	Cam, paslanmaz çelik	Otoklav	-Tasarımı kolaydır. -Büyüme odasında az yer kaplar. - Kayma gerilimi düşüktür. -Etkin gaz değişimi yapılabilir.	-Besin ortamı drenaj süresinin kontrolü zordur. -Yüksek maliyetlidir. -Besin ortamı aynı tank içinde yenilenemez. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygun değildir.
Beşik (rock) sistemi (Şekil 2.6)	Mekanik	Polikarbon	Otoklav	-Tasarımı ve işletimi kolaydır. -Dış hava kaynağı gerekli değildir. -Işık kaynağından etkin yararlanılabilir. -Büyük ölçekte kullanım için uygundur.	-Eğimli bir platforma ihtiyaç vardır. -Büyüme odasında çok yer kaplar. -Eksplantlar sıvı ortamdan tamamen ayıramaz. -Enerji maliyetleri yüksektir. -Besin ortamı aynı tank içinde yenilenemez. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygun değildir.
Döner tamburlu biyoreaktör (Şekil 2.7)	Mekanik	Cam ya da plastik	Otoklav	-Tasarımı ve kullanımı kolaydır. -Yatırım maliyetleri düşüktür. -Embriyo, sürgün ve saçaklı kök kültürleri için uygundur.	-Dönüş platformuna ihtiyaç vardır. -Eksplantlar sıvı ortamdan tamamen ayıramaz. -Daldırma zamanının kontrolü zordur. -Hava değişimi mümkün değildir. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygun değildir. -Büyüme odasında çok yer kaplar.
Bio-Mint (Şekil 2.6)	Mekanik	Polikarbon	Otoklav	-Tasarımı ve işletimi kolaydır. -Eksplantlar sıvı ortamdan tamamen ayıramaz. -Büyük ölçekte kullanıma uygundur. -Besin ortamı aynı tank içinde yenilenebilir. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygundur.	-Eğimli bir platforma ihtiyaç vardır. -Enerji maliyetleri yüksektir. -Büyüme odasında çok yer kaplar.

Çizelge 2. 1 (Devam) En sık kullanılan geçici daldırma sistemlerinin genel özellikleri, avantajları ve dezavantajları (Georgiev et al., 2014)

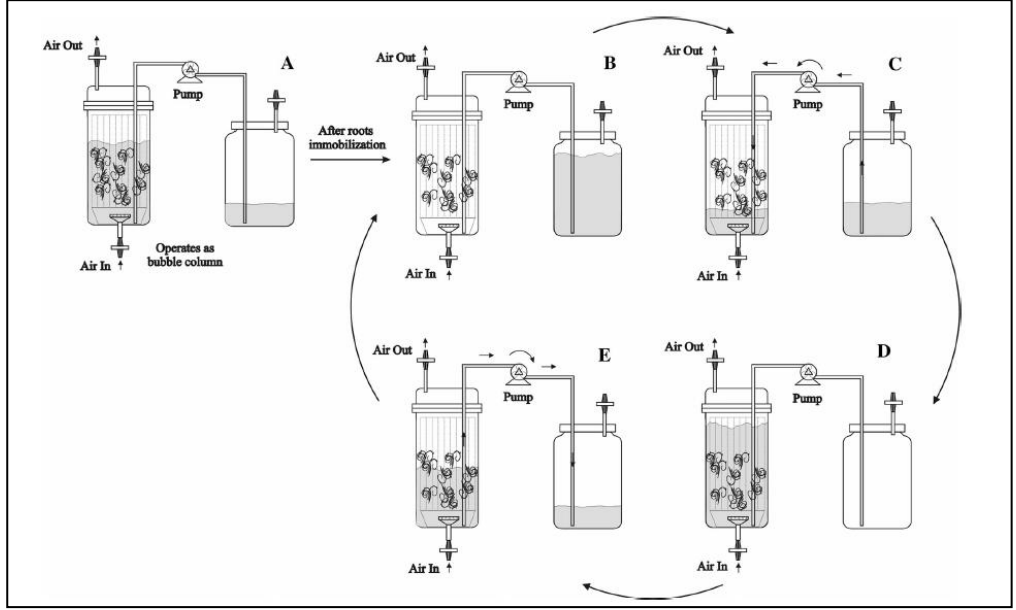
Geçici Daldırma Sistemi Tipi	Güç Girişi	Tank Materyali	Sterilizasyon Tipi	Avantajları	Dezavantajları
RALM biyoreaktör (Şekil 2.8)	Pnömatik	Polikarbon ve polipropilen	Otoklav	-Kullanımı kolaydır. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygundur. -Besin ortamı aynı tank içinde yenilenebilir. - Yatırım maliyetleri düşüktür.	-Tasarımı ve otomasyonu karmaşıktır.
SETIS (Şekil 2.8)	Pnömatik ve gravite	Polipropilen	Otoklav, gama sterilizasyonu	-Tasarımı, kullanımı ve otomasyonu kolaydır. - Işık kaynağından etkin yararlanılabilir. -Besin ortamının drenajı kolaydır. -Yatırım ve enerji maliyeti düşüktür. -Büyüme odasında az yer kaplar.	-Besin ortamı aynı tank içinde yenilenemez. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygun değildir.
Plantima (Şekil 2.8)	Pnömatik ve gravite	Polikarbon	Otoklav	-Otomasyonu ile kullanımı kolay ve emniyetlidir. - Yatırım maliyetleri düşüktür.	-Besin ortamı aynı tank içinde yenilenemez. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygun değildir.
Plantform Biyoreaktör (Şekil 2.8)	Pnömatik ve gravite	Polikarbon	Otoklav	-Otomasyonu ile kullanımı kolay ve emniyetlidir. -Işık kaynağından etkin yararlanılabilir. -Yatırım maliyetleri düşüktür. -Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygundur.	-Besin ortamının aynı tank içinde yenilenmesi mümkün değildir.
Box in Bag (Şekil 2.8)	Pnömatik ve gravite	Polikarbon, polietilen ve naylon	Gama sterilizasyonu tek kullanımlık	-İşletimi emniyetlidir. -Hacim yüzey oranı yüksektir. -Işık kaynağından etkin yararlanılabilir. -Besin ortamı aynı tank içinde yenilenebilir. -Yatırım maliyetleri düşüktür.	-Kültürün büyümesi ile drenaj süresi artar. -İnokülasyon portunun çapı küçüktür. Basınçlı havalandırma ve CO ₂ besleme için uygun değildir.
Dalga (Wave Biyoreaktör) (Şekil 2.8)	Mekanik	Biyouyumlu ve transparan plastik	Ön sterilize edilmiş, tek kullanımlık	-Tasarımı ve kullanımı kolaydır. -pH, çözünmüş oksijen, karbondioksit ve sıcaklığın kesin görüntülenmesi ve kontrolü mümkündür. - İşçilik maliyetleri düşüktür.	-Özelleştirilmiş ve pahalı kontrol sistemi ile eğimli bir platforma ihtiyaç vardır. -İnokülasyon portunun çapı küçüktür. -Sıvı ortam ile eksplantların tamamen ayrılması mümkün değildir. -Besin ortamı değişimi mümkün değildir. -Yatırım maliyetleri yüksektir.



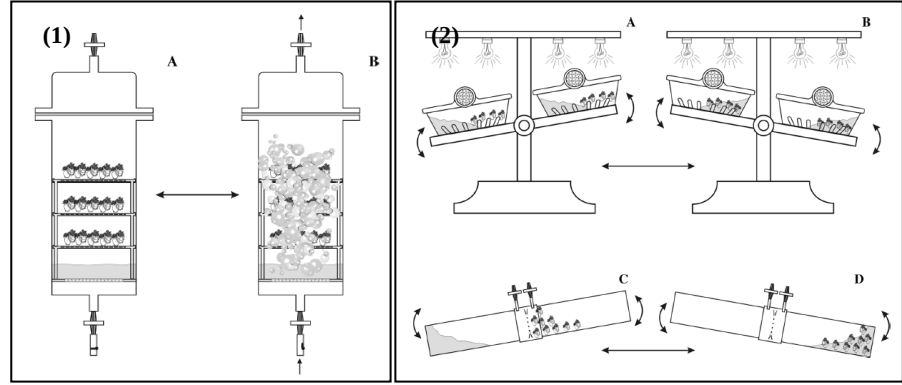
Şekil 2.3 (1) Twin-Flask sisteminin tasarımı ve çalışma prensibi; (A) Bekleme fazı: Sıvı ortamın tamamı besin ortamı tankında bulunmaktadır. Her iki tankta hava girişi kapalıdır ve selonoid valfler atmosfere açıktır. (B) Besin ortamının kültür tankına transferi. Kültür tankının hava yolu kapalı, besin ortamı tankının hava yolu açıktır. Yüksek basınç besin ortamını kültür tankına hareket ettirir. (C) Daldırma periyodu: Sürgün demetleri sıvı ortama daldırılır. Besin ortamı tankı boştur. Her iki tankta hava yolları kapalıdır ve selonoid valfler atmosfere açıktır. (D) Besin ortamının kültür tankından drenajı: Kültür tankının hava yolu açıkken, besin ortamı tankının hava yolu kapalıdır. Yüksek basınç dolayısıyla besin ortamı tekrar besin ortamı tankına aktarılır. (2) Gel-git sisteminin tasarımı ve çalışma prensibi; (A) Bekleme periyodu; (B) Besin ortamının transferi. Besin ortamı tankına hava basıncı uygulanır ve sıvı ortam kültür tankına geçer. (C) Daldırma periyodu; (D) Besin ortamının drenajı. Hava basıncı durdurulur ve besin ortamı yerçekimi ile tekrar besin ortamı tankına aktarılır (Georgiev et al., 2014).



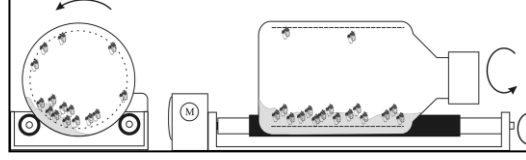
Şekil 2.4 (1) RITA sisteminin tasarımı ve çalışma prensibi; (A) Bekleme periyodu; (B) Sıvı ortamın transferi. Ana borudan biyoreaktörün tabanına hava basıncı uygulanır. Sıvı ortam üst bölüme doğru hareket eder. (C) Daldırma periyodu; (D) Besin ortamının drenajı. Hava akışı kesilir ve besin ortamı yer çekimi ile alt bölüme hareket eder. (2) Termo-fotobiyoreaktörün tasarımı ve çalışma prensibi; (A) Bekleme periyodu; (B) Sıvı ortamın transferi. (C) Daldırma periyodu; (D) Besin ortamının drenajı. Hava beslemesi durdurulur ve yerçekimi ile sıvı ortam tekrar besin ortamı tankına hareket eder (Georgiev et al., 2014).



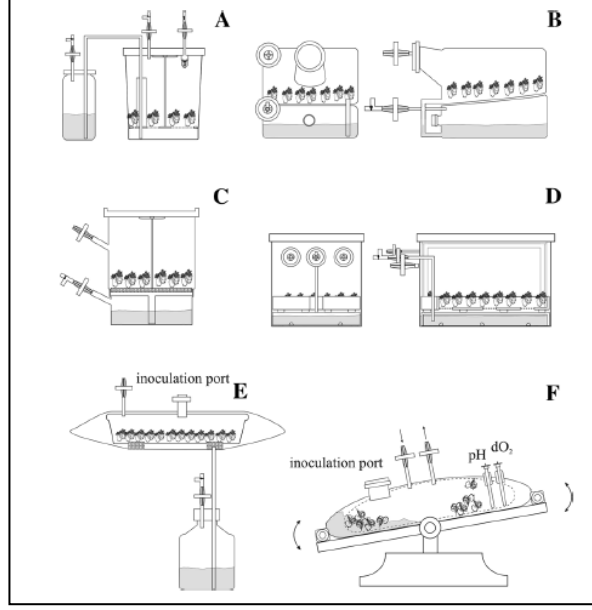
Şekil 2.5 Gel-git sistem ile entegre doyurulmuş tübüler konvektif akış-hibrit sistem tasarımı ve çalışma prensibi; (A) Transforme saçaklı köklerin immobilizasyonu ve uniform dağılımı elde edilinceye kadar kabarcık kolon prensibinde çalışma; (B-E) Şekil 2.3 (1)'de açıklanan biçimde Twin-flask sistemine benzer işlem adımları uygulanmaktadır (Georgiev et al., 2014).



Şekil 2.6 (1) Kabarcık güdümlü immersiyon biyoreaktör tasarımı ve çalışma prensibi: (A) Bekleme periyodu, (B) Daldırma periyodu. Reaktöre hava beslenir ve köpük oluşumu sağlanır. Eksplantlar besin ortamından oluşturulan köpük ile sarılır. Havalandırma durdurulduğunda, sıvı drenajı ile birlikte köpük yoğunluğu da azalır ve eksplantlar gazla zenginleştirilmiş ortama maruz bırakılırlar. (2) (A, B) Beşik (rocker) sistemi dizaynı ve çalışma prensibi, (C, D) BioMINT biyoreaktörün dizaynı ve çalışma prensibi (Georgiev et al., 2014)



Şekil 2.7 Döner tamburlu biyoreaktör sisteminin tasarımı ve çalışma prensibi (Georgiev et al., 2014)



Şekil 2.8 (A) RALM biyoreaktör, (B) SETIS geçici daldırma biyoreaktör sistemi, (C) PLANTIMA sistemi, (D) PLANTFORM biyoreaktör, (E) Box-in-Bag ve (F) WAVE biyoreaktör tasarımları (Georgiev et al., 2014)

Geçici daldırma sistemleri, genellikle küçük ölçekli düşük maliyetli kültür kabı kullanımı üzerine temellendirilmiştir. Kültür kaplarının hacmi artırıldığında, tüm sistemin performansı aynı oranda artış göstermez. Örneğin, 10L gel-git biyoreaktörde, ışık dağılımının uniform olmadığı gözlenmektedir. Işık kaynağı biyoreaktör tankının ortasına yerleştirilmediği için biyokütle arttıkça, ışık sınırlayıcı faktör haline gelmektedir. Ayrıca, daha geniş tanklarda oluşan kalın zonlar, oksijen ve besin transferlerini de güçleştirmektedir. Başarılı bir ölçek büyütme için tank hacminin artırılması yeterli olmadığından, büyük hacimli üretimler açısından, çok sayıda küçük ya da orta ölçekli geçici daldırma sistemlerinin kullanımına dayalı farklı bir strateji önerilmektedir. Geçici daldırma sistemleri büyüme odalarındaki ışık kaynağından yararlanacak şekilde raflara yerleştirildiğinde, hem işletme kolaylığı sağlanmakta, hem de büyüme odalarının

birim alanları daha verimli kullanıldığı için üretim maliyetleri düşürülmektedir (Georgiev et al., 2014).

2.3.2.1 Mikroçoğaltımda geçici daldırma sistemi uygulamaları

Geçici daldırma sistemine benzer bir yapıdan ilk kez 1965 yılında Heller bahsetmiştir. 1985 yılında Tisserat ve Vandercook, geçici daldırma sistemini bitki doku kültürüne ilk olarak uygulamışlardır. Aitken-Christie, 1988 yılında besin ortamının periyodik olarak hareket ettiği yarı otomatik bir sistem geliştirmiştir. Ardından Simonton, sıvı ortamın planlanan sürede bitkicikler ile temas ettiği programlanabilir bir sistem kurmuştur. 1993 yılında, biyoreaktörlerdeki fizyolojik ve teknik kısıtların üstesinden gelmek için CIRAD (Fransa) tarafından RITA biyoreaktörleri geliştirilmiştir. Bu yeni teknik muz, kahve, kauçuk, turunçgil, ananas, patates, sükrozpancarı, M26 elma anacı, *Curcuma zedoaria*, *Zingiber zerumbet*, *Siraitia grosvenorii*, *Dioscorea fordii* ve *D. alata* ve diğer birçok bitki türünde mikroçoğaltımın geliştirilmesi ve üretim maliyetlerinin düşürülmesi amacıyla kullanılmaktadır (Albany et al.; 2005; Berthouly and Etienne, 2005; Zhu et al., 2005; Afreen, 2006; Akdemir et al., 2014). Bu sistem aynı zamanda *Citrus*, *Coffea arabica*, *Camellia sinensis*, *Bactris gasipaes* gibi farklı türlerde somatik embriyo kültürleri için ve *Digitalis lanata* ve *Leucojum aestivum* bitkilerinde sekonder metabolit üretimleri için de sıklıkla kullanılmaktadır (Akdemir et al., 2014).

Ananas bitkilerinin mikroçoğaltımı (*Ananas comosus* L. Merr) için sürgün oluşumu, tomurcuk farklılaşması ve uzatma fazlarında geçici daldırma tekniğinin uygulandığı çalışmada, yarı katı kültürlerle oranla daha yüksek çoğaltma katsayıları elde edilmiştir (Escalona et al., 1999). Gonzalez (2005), ananas mikroçoğaltımında geçici daldırma sistemi kullanılarak üretim maliyetlerinin %20 oranında düşürüldüğünü bildirmiştir.

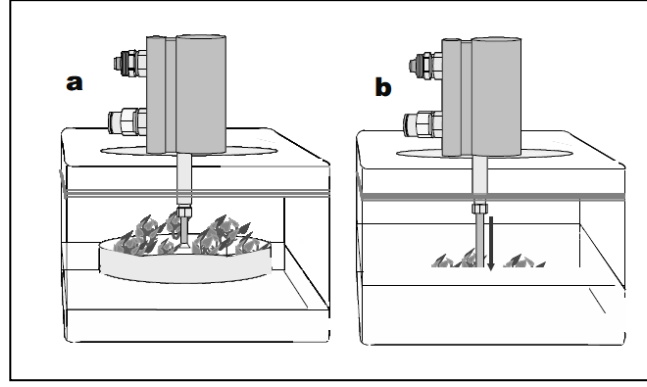
Camellia sinensis, *Citrus deliciosa*, *Coffea s.p.*, *Colocasia sp.*, *Eucalyptus sp.*, *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta*, *Musa sp.*, *Psidium guajava*, *Saccharum sp.*, *Solanum tuberosum*, *Pinus*, *Echinacea angustifolia*, *Aspen*, *Psidium*, *Aloe barbadensis*, *Stevia rebaudiana*, *Lessertia frutescens*, *Xanthosoma sagittifolium*, *Pueraria tuberosa*, *Digitalis lutea x purpurea*, *Echinacea purpurea*

'Magnus', *Rubus idaeus* 'Mormorshallon', tatlı patates, hıyar, çilek, elma, armut ve ahududu gibi birçok bitki türünün ticari mikroçoğaltımı için geçici daldırma sistemleri tanımlanmıştır (Konstas and Kintzios, 2003; Gonzalez, 2005; Farahani and Majd, 2012; Persson, 2012; Debnath, 2014; Mariateresa et al., 2014; Polzin et al., 2014).

Patates mikroyumru üretimi amacıyla yapılan bir çalışmada geçici daldırma sisteminde kültür başına ortalama 500-960 adet mikro-yumru oluşumu gözlenirken, yarı katı kültürlerde ortalama 220 adet yumru oluşumu bildirilmiştir. Geçici daldırma sisteminde toplam yumru ağırlığında da artış elde edilmiştir (Berthouly and Etienne, 2005).

Konvansiyonel mikroçoğaltımda karşılaşılan yüksek üretim maliyetlerinin düşürülmesi için yeni prosesler ve ekipmanlar geliştirilmektedir. Dey (2005), ticari olarak önemli bitkilerin mikroçoğaltımı için yeni Growtek biyoreaktör modelini bildirmiştir. Growtek biyoreaktörler, destek materyali ve besin ortamının değiştirilmesi ile reaktör içerisinde online görüntülenmesi için örnek portu bulunan, ışık geçirgenliği yüksek polikarbondan yapılmış, sıvı besin ortamının kullanıldığı küçük biyoreaktörlerdir. Ananas ve krizantem çoklu sürgünleri 4 hafta süreyle kavanoz, erlenmayer, life guard kültür kabı ve growtek biyoreaktörlerde altkültürlere alındıklarında en iyi sonuçlar growtek biyoreaktörlerden elde edilmiş ve cam kavanozlarda bulunan yarı katı kültürlerle göre 21.4 kat daha fazla sürgün oluşumu gözlenmiştir.

Vitro Hellas S. A. ticari laboratuvarında geliştirilen, eksplantların biyoreaktör içinde bir destek materyali üzerinde tutulduğu ve piston yardımıyla sıvı besin ortamına daldırılıp çıkarıldığı yeni geçici daldırma sistemi (Şekil 2.9), zeytin sürgünlerinin mikroçoğaltımında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Grigoriadou et al., 2005).



Şekil 2.9 Yeni geçici daldırma sisteminin çalışma prensibi a) Bitki materyali sıvı ortamın dışında iken pistonun konumu, b) Bitki materyali besin ortamına daldırıldığında pistonun konumu (Grigoriadou et al., 2005).

Nesli tehlikede olan tıbbi bitkilerden *Charybdis* bitkilerinde çiçek soğanı teşviki ya da adventif sürgün oluşumu için *in vitro* çalışmalar yapılmaktadır. Nodül olarak tanımlanan, yüksek rejeneratif potansiyele sahip hücre agregatları kullanılarak *Charybdis* bitkilerinin geçici daldırma sisteminde mikroçoğaltımları gerçekleştirilmiştir. Nodül kültürlerinin hiperhidrisite oranını azalttığı gözlenmiştir (Wawrosch et al., 2005).

Geçici daldırma sisteminde üretilen *Mitragyna inermis*, kaya armudu ve asma sürgünlerinin agarlı besin ortamındakilerden daha yapraklı, daha uzun olduğu ve daha iyi ve hızlı köklendikleri bildirilmiştir. Sürekli karıştırılan erlenmayerlerde ya da konvansiyonel biyoreaktörlerde kayma gerilimine bağlı oluşan gelişim problemleri de geçici daldırma yöntemi ile çözülmüştür. Geçici daldırma sistemlerinde üretilen bitkiciklerin kalitesinin, bitki dokusunun bu sisteme uyum sağlamasına bağlı olarak altkültür sayısı arttıkça arttığı gözlenmiştir. Ananas sürgünlerinin geçici daldırma sisteminde kültüre alınması ile elde edilen sürgünlerin ilk hasatında %41 oranında, sekizinci hasatında %93 oranında, dokuz-onikinci hasatlarında %97 oranında normal yapıda sürgünler elde edilmiştir (Berthouly and Etienne, 2005).

Dewir et al. (2006), ticari olarak önemli iç mekan süs bitkilerinden *Spathiphyllum* bitkiciklerinde, agarlı besin ortamı, sıvı ortam, destek materyali içeren sıvı ortam ile geçici daldırma sistemlerini karşılaştırmış, geçici daldırma sistemlerinde sürgün gelişimi ve çoğalmanın daha verimli olduğunu

gözlemlemişlerdir. Biyoreaktörlerde çoğaltılan sürgünlerde köklendirme ve aklimatizasyon başarısı da yüksek bulunmuştur.

Güney Afrika'ya özgü monokotiledon soğanlı ticari bir süs bitkisi olan *Ixia* bitkilerinin virüsten arı büyük ölçekli üretimleri için sıvı kültürler ümitvar bulunmuştur (Ruffoni et al., 2005). Hempfling and Preil (2005), iki adet 5L cam kültür kabından oluşan twin-flask geçici daldırma sisteminde kültüre alınan orkide eksplantlarında yüksek çoğaltım katsayıları elde etmişlerdir.

Krizantem bitkilerinden elde edilen 1 cm uzunluğunda tekli nod çeliklerinin eksplant olarak kullanıldığı yarı katı ve sıvı kültürlerde sürgün çoğaltım verimlilikleri karşılaştırılmıştır. Sıvı kültürlerde yaş ağırlık, kuru ağırlık, sürgün boyu, yaprak yüzey alanı gibi parametrelerin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sıvı kültürlerde üretilen sürgünlerde hiperhidrisite görülmemiş ve %100 oranında dış koşullara adaptasyon sağlanmıştır. Optimum inokulum miktarının belirlenmesi için 10 l kolon tip biyoreaktörde 20-40-60 ve 80 adet nodal eksplant kullanılmıştır. 80 adet eksplant içeren biyoreaktörde sürgün boyu en yüksek iken, dal sayısı en az bulunmuştur. 20 adet eksplant kullanıldığında çoklu sürgün oranının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar, köklendirme prosesi için yüksek inokülasyon yoğunluklarının, mikroçoğaltım fazı için ise düşük inokülasyon yoğunluklarının uygun olduğunu göstermiştir (Hahn and Paek, 2005). Üç farklı hosta bitki çeşidi, yarı katı agarlı besin ortamında ve bitki dokusunun kesikli olarak ıslatıldığı thinfilm sıvı kültür sisteminde, farklı inokulum yoğunluklarında (40. 80. 120. 200 eksplant/l) altkültüre alınmışlardır. Bitkilerin karıştırmalı thin-film sistemde agarlı ortamdan daha iyi çoğaldıkları gözlenmiştir (Adelbeg, 2005).

Ekonomik değeri yüksek misket gülü (kokulu gül) çeşitleri, *Rosa damascena* ve *Rosa bourboniana*'nın sürgün çoğaltımı ve kök teşviki için başlangıç materyali olarak nodal eksplantların kullanıldığı, sıvı kültür sistemleri tanımlanmıştır. Çalışmada sıvı kültürlerde yarı katı kültürlerden 8 kat fazla sürgün oluşumu gözlenmiştir. Önceki çalışmalarda misket güllerinde çok düşük köklendirme başarıları elde edilirken, bu çalışmada mikrosürgünler daha yüksek oranda köklendirilmişlerdir (Pati et al., 2005).

Üç farklı *Prunus* çeşidi ve bir elma kök anacının *in vitro* çoğaltımının geliştirilmesi amacıyla yarı katı ve durgun sıvı kültür yöntemleri ile günlük 30 ve 60 dakika daldırma sürelerinin uygulandığı geçici daldırma sistemleri karşılaştırılmıştır. 60 günlük kültür periyodunun sonunda eksplantların çoğaltma katsayısı ile su, klorofil, karotenoid ve fruktoz içerikleri incelenmiştir. Durgun sıvı kültür yöntemi, hiperhidrisite ve nekroza neden olduğu için bitki büyümesini olumsuz etkilemiştir. Bunun sonucunda çoğaltma katsayıları, klorofil ve fruktoz içerikleri de azalmıştır. Yarı katı ortam ile geçici daldırma sistemlerinden elde edilen çoğaltma katsayıları farklı olmamakla birlikte, yarı katı ortamda hiperhidrisite varlığı tespit edilirken, geçici daldırma sisteminde bu problem ile karşılaşılmamıştır. Diğer taraftan, klorofil, karotenoid ve fruktoz geçici daldırma sistemlerinde artış göstermiştir (Damiano et al., 2005).

Leucophyllum frutescens sürgün çoğaltımının geliştirilmesi için 5 l balon tip, sürekli ve geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin karşılaştırıldığı çalışmada, yaklaşık 2 cm boyunda 40 adet eksplant 30g/l süktroz, 2.22 μM BA ve 0.54 μM NAA içeren 1.500 ml MS besin ortamının bulunduğu biyoreaktörlerde kültüre alınmıştır. Reaktörlere ultra filtre edilen 1.0 vvm hava beslemesi yapılmış ve geçici daldırma sisteminde daldırma süresi 4 saatte bir 30 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Biyoreaktörler 55 $\mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$ ışık şiddetinde beyaz ışık altında 18 saat fotoperiyotta 25°C’de bekletilmiştir. Biyoreaktör denemelerinde, en yüksek sürgün çoğaltım oranı geçici daldırma sistemlerinden elde edilmiştir. Geçici daldırma sistemleri sürekli daldırma ya da yarı katı kültür ortamları ile kıyaslandığında, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve taze ağırlık bakımından daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Geçici daldırma sistemi *Artemisia judaica* ve *Hydrastis canadensis* gibi birçok tıbbi bitki türünde başarıyla uygulanmaktadır (Shaik et al., 2010).

Fotoototrofik kültürlerde CO₂ zenginleştirilmesi, hızlı çoğaltım, *in vitro* bitkiciklerin daha iyi gelişimi ve *ex vitro* canlılık için önemlidir. Farahani and Majd (2012), gel-git biyoreaktörlerde, CO₂ zenginleştirmesinin tatlı patates, krizantem ve yüksük otunda, büyümenin artırılması, sağlıklı bitkilerin üretimi ve tek sürgünden çok sayıda sürgün elde edilmesi gibi avantajlar sağladığını bildirmiştir. Arencibia et al. (2013a) *Rubus chamaemorus* ve *Rubus idaeus*’un

RITA biyoreaktörlerinde CO₂ ile zenginleştirilmiş kontrollü çevre altında, yüksek ışık şiddetinde ve sükrozi azaltılmış besin ortamında iyi gelişim gösterdiğini, daha sonraki aklimatizasyon ve köklendirme aşamaları için de bitkiyi hazırladığını ortaya koymuşlardır. Bazı geçici daldırma sistemlerinde reaktörün üst kısmı CO₂ gazı ile zenginleştirilmektedir. CO₂ oranının artışı, kültüre alınan bitki dokusunun çoğaltımı, fotosentetik aktivite, organ morfolojisi ve sekonder metabolit akümüasyonu üzerinde olumlu etkiye sahiptir (Georgiev et al., 2014).

Farahani and Majd (2012), farklı sıvı kültür metotlarının bodur muz bitkiciklerinin mikroçoğaltımına etkilerini karşılaştırmışlardır. 6 haftalık kültür sonucunda, sıvı ortama daldırılan ya da havalandırılan sürgün demetlerinde düşük mikroçoğaltım katsayısı elde edilirken, sıvı ortamda pamuk destek materyali üzerinde bulunan ya da yarı katı ortamda altkültüre alınan sürgün demetlerinde daha yüksek çoğaltma katsayıları elde edilmiştir. Basit daldırma ya da havalandırma sistemindeki eksplantlar birçok nekrotik bölgeye sahip olup yapraksızdırlar. Destek materyali olarak pamuk üzerine yerleştirilen eksplantlarda çok küçük yaprak oluşumları gözlenmiştir. Bazı dış yaprak kınları hiperhidrik görünümde ve kırılığandır. Geçici daldırma sisteminde ise yaprak gelişimi dikkate değer derecede daha sağlıklı bulunmuştur. Geçici daldırma sisteminde kültüre alınan muz eksplantlarında, bitkiciklerin morfolojik karakterleri değişmeden çoğaltım katsayılarının arttığı gözlenmiştir (Albany et al., 2005; Roels et al., 2005). Aragon et al. (2014), muz bitkiciklerinin mikroçoğaltımı için geçici daldırma sistemi ile yarı katı kültür sistemlerinin mikroçoğaltım, köklendirme ve aklimatizasyon fazlarını karşılaştırmışlardır. Geçici daldırma sistemlerinde bitkiciklerin daha iyi kök gelişimi ile daha uzun sürgünler oluşturdukları ve kuru ağırlıklarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Geçici daldırma sistemlerinde çoğaltma verimliliğinin artırılması için sükroz konsantrasyonu ve pH değeri gibi parametreler ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Niemenak et al. (2013), 10, 15, 20, 25 g/l sükroz içeren farklı sıvı besin ortamlarında kültüre alınan *Xanthosoma sagittifolium* eksplantlarında en yüksek çoğaltma katsayısının 20 g/l sükroz içeren ortamda elde edildiğini bildirmişlerdir.

Ananas için farklı mikroçoğaltım protokolleri geliştirilmiş olmasına rağmen, mikroçoğaltılmış bitkilerin maliyeti çok yüksek olduğu için klasik çoğaltım yöntemleri ile rekabet edememektedir. Anaç damızlıklarından çelik alınarak yapılan üretime göre mikroçoğaltımın maliyeti beş kat daha yüksektir. Ananas mikroçoğaltımı için iki fazlı geçici daldırma sistemleri ile RITA biyoreaktörleri kullanılmıştır. Geçici daldırma sistemleri ile nodül demeti kültürlerinin birlikte kullanıldığı mikroçoğaltım prosesi klasik yöntemlere göre daha ekonomik bulunmuştur (Scherer et al., 2013).

Tıbbi bitkilerde morfolojik, fitokimyasal ve genetik olarak uniform üretim materyallerinin kullanımı önemlidir. Sürgün, yumru, kök ve somatik embriyo gibi organlar ile hücrelerin biyoreaktörlerde kültüre alınması büyük ölçekli tıbbi bitki üretimlerine olanak sağlamaktadır. *Leucojum aestivum* sürgün kültürü için RITA biyoreaktörleri başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Ptak, 2013).

Antep fıstığı ve anaçlarının biyoreaktör sistemlerinde mikroçoğaltımı ile ilgili çalışmada RITA biyoreaktörlerinde, yarı katı kültürlerden daha verimli sürgün çoğaltımı gerçekleştirilmiş ve daldırma süresi ile inokülasyon yoğunluğunun optimize edilmesi sonucunda vitrifikasyon probleminin azaldığı gözlenmiştir (Akdemir et al., 2014).

Endemik Çin orkidesinin (*Cymbidium sinense*) ticari mikroçoğaltımı için protokorm benzeri yapıların ve sürgünlerin biyoreaktörlerde kültüre alındığı sıvı kültür yöntemleri önerilmiştir. Biyoreaktörler ile yapılan çalışmalar; rizom, protokorm benzeri yapılar ve soğanlar gibi yapraksız sürgün demetlerinin mikroçoğaltımı için sürekli kültürlerin, sürgün oluşumu ve bitkicik rejenerasyonu için de geçici daldırma sistemlerinin daha uygun olduğunu göstermiştir (Gao et al., 2014).

Büyük ölçekli geçici daldırma sistemlerine örnek olarak, 40 m² büyüme odasında her biri 10 l hacimli 100 adet gel-git biyoreaktör sisteminde yıllık 2.5 milyon adet *Coffea canephora* var. somatik embriyo üretimi ile box-in-bag geçici daldırma sisteminde 600.000 adet somatik *Coffea canephora* bitkiciği üretimi verilebilir (Georgiev et al., 2014).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan Myrobolan B erik klon anacı çoğaltım materyalleri, Bademli Fidancılık Kooperatifi tarafından Yunanistan'dan ithal edilen ve Bademli Fidancılık Kooperatifine ait araziye dikililen 1 yaşlı bitkiler (Şekil 3.1) ile Dikili Çiftlik A.Ş.'ye ait gölge evinde (screenhouse) muhafaza edilen 1 yaşlı bitkilerden elde edilmiştir (Şekil 3.2).

Myrobolan B erik anaçlarının taze sürgünlerinden 2., 3. ve 4. nodları ile tepe sürgünleri kullanılmıştır (Şekil 3.3). Materyal alımı ve tekerrürlerin kurulması 2009 yılı Nisan ayı içinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 2009 yılı Nisan ayında kurulan denemelerde kullanılan Bademli Fidancılık Kooperatifi'ne ait arazide bulunan Myrobolan B anaçlarının görünümü



Şekil 3.2 2009 yılı Nisan ayında kurulan denemelerde kullanılan Dikili Çiftlik A.Ş. gölgeevinde bulunan Myrobolan B anaçlarının görünümü



Şekil 3.3 Eksplant olarak kullanılan tek yıllık Myrobolan B sürgünleri

3.2 Metot

3.2.1 Eksplantların sterilizasyonu ve kültürlerin başlatılması

Çalışmada Myrobolan B anaçlarından alınan eksplantların yüzey sterilizasyonları farklı yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Hem sera, hem de arazi koşullarında bulunan bitkilerden genç sürgünleri içeren çelikler alınmıştır. Bitki materyallerinin öncelikle yaprakları uzaklaştırılmış ve ardından eksplantların yüzeyinde bulunan büyük kontaminant partiküllerin uzaklaştırılarak ön sterilizasyonun sağlanması amacıyla 15 dakika süreyle bulaşık deterjanı ile muamele edilmişlerdir. Materyallerin sterilizasyonu için 4 farklı sterilizasyon prosedürü uygulanmıştır (Çizelge 3.1). Fungusit solüsyonuna (%3 benomil) batırılarak 1 gece +4°C’de bekletilen ya da fungusit solüsyonu ile muamele edilmeyen yapraksız çelikler (Şekil 3.4a), her bir eksplantta bir nod olacak şekilde 1-2 cm büyüklüğünde parçalara ayrılmıştır (Şekil 3.4b). UV ile steril edilmiş ve alkolle silinmiş steril kabin içerisinde eksplantlar, %70’lik alkol ile 1 dakika muamele edildikten sonra 2 damla Tween-20 eklenmiş %1 sodyum hipoklorit (NaOCl) içeren solüsyonda 20 ve 30 dakika süreyle bekletilmişlerdir. Ardından sterilantların eksplantlardan uzaklaştırılması için eksplantlar steril distile su ile 4 kez çalkalanarak durulanmışlardır.



Şekil 3.4 (a) Ön sterilizasyon için yaprakları uzaklaştırılan Myrobolan B çelikleri (b) Tek nodlu eksplantlar

Sterilizasyonu yapılan materyaller, daha önceden hazırlanıp kültür tüplerine paylaştırılan ortamlarda kültüre alınmışlardır. Her bir deneme için tekrar başına

20 eksplant kullanılmış ve denemeler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kùltürler, floresan aydınlatma altında 2500-3000 lüks ışık şiddetinde, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyotta, $24 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.1 Eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemleri

Uygulama	I	II	III	IV
Fungusit (%1 Benomil)	-	-	15 saat	15 saat
Etil Alkol (%70)	1 dakika	1 dakika	1 dakika	1 dakika
NaOCl (%1)	20 dakika	30 dakika	20 dakika	30 dakika

3.2.2 Besin ortamlarının hazırlanması

Çalışmada mineral maddeler, vitaminler, bitki büyüme düzenleyicileri ve jelleştiriciler (agar/gelrite) içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve WPM (Lloyd ve Mccown, 1981) besin ortamları kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Nod kùltürlerinin oluşturulmasında kullanılan yarı katı besin ortamlarını hazırlarken, öncelikle 1 l besin ortamı için gerekli makro bileşikler ve karbon kaynağı tartılarak içerisinde 500 ml steril saf su bulunan behere aktarılmıştır. Ardından mikroelementler için önceden yapılmış stok çözeltilerden 1 litre için gerekli olan miktarlar alınarak behere eklenip, gerekli miktarlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmiştir. Son olarak hacim saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Katı bileşikler iyice çözüldükten sonra 1N NaOH (sodyum hidroksit) ve HCl (hidrojen klorür) kullanılarak pH=5.85'e ayarlanmıştır. Besin ortamı, 8 g/l Plant Agar (Duchefa) ilave edildikten sonra devamlı karıştırılarak her birine 10 ml olacak şekilde cam tüplere (23/24x140 mm) doldurulmuştur. Ağızları kapatılan kùltür tüpleri, otoklavda 121°C 'de, 1 atm basınçta 15 dakika süre ile steril edilmişlerdir. Otoklavdan çıkarılan tüpler, besin ortamının donması için düz zeminde oda sıcaklığında soğumaya bırakılmışlardır.

Araştırmada kullanılan diğer besin ortamlarının hazırlanmasında da aynı işlemler uygulanmıştır. Çalışmada kùltürlerin başlatılması için rejenerasyon

ortamı olarak 1.0 mg/l 6-benzilaminopürin (BAP) içeren MS besin ortamı kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Tüm çalışmalar süresince kullanılan temel besin ortamları

Bileşikler	Kültür ortamlarındaki bileşiklerin konsantrasyonları (mg/l)	
	MS	WPM
KNO ₃	1900	-
K ₂ SO ₄	-	999
NH ₄ NO ₃	1650	400
MgSO ₄	-	180.7
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	-
CaCl ₂	-	72.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	-
Ca(NO ₃) ₂	-	386
KH ₂ PO ₄	170	170
MnSO ₄ .H ₂ O	-	22.3
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	-
KI	0.83	-
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.9
Tritriplex (Na ₂ EDTA)	37.3	37.3
Nikotinik asit	0.5	0.5
Pridoksin-HCl	0.5	0.5
Thiamin-HCl	0.1	1.0
myo-inositol	100	100
Glisin	2.0	-
Sukroz	30000	30000

3.2.3 Yarı katı kültürlerde mikroçoğaltım uygulamaları

3.2.3.1 Yarı katı kültürlerde sürgün çoğaltma ortamının belirlenmesi ile ilgili uygulamalar

Ocak-Haziran 2009 döneminde yapılan çalışmalarda steril nod eksplantlarının rejenerasyonu sonucu edilen *in vitro* sürgünler, mikroçoğaltım ortamının belirlenmesi amacı ile farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyicileri içeren MS ve WPM besin ortamlarına aktarılmışlardır. Sürgün gelişimi için 17 farklı besin ortamı kullanılmıştır. Yarı katı besin ortamlarının sükröz, bitki büyüme düzenleyicileri ve jelleştirici madde içerikleri Çizelge 3.3’de verilmiştir. Kullanılan temel besin ortamlarının içerikleri Çizelge 3.1’de belirtilmiştir. Besin ortamlarının hazırlığı ise “3.2.2” altbaşlığında anlatılmıştır.

Çizelge 3.3 Mikroçoğaltım ortamının belirlenmesi amacıyla kullanılan besin ortamlarının içerikleri

Besin Ortamı Kodu	Besin ortamları	Sükröz miktarı (g/l)	Bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarları (mg/l)	Kullanılan jelleştirici madde ve miktarı (g/l)
M1	MS	30 g/l	1 mg/l BAP	2.5 g/l gelrite
M2	MS	20 g/l	1 mg/l BAP	8 g/l agar
M3	MS	20 g/l	1 mg/l BAP+0.01 mg/l IAA+0.1 mg/l GA3	8 g/l agar
M4	WPM	20 g/l	1 mg/l BAP+0.01 mg/l IAA+0.1 mg/l GA3	8 g/l agar
M5	MS	20 g/l	0.5 mg/l BAP+0.01 mg/l IAA+0.1 mg/l GA3	8 g/l gelrite
M6	MS	20 g/l	1 mg/l BAP+0.01 mg/l IAA+0.1 mg/l GA3	2.5 g/l gelrite
M7	MS	20 g/l	0.75 mg/l BAP+0.01 mg/l IAA+0.1 mg/l GA3	2.5 g/l gelrite
M8	MS	20 g/l	0.5 mg/l BAP+0.01 mg/l IAA+0.1 mg/l GA3	2.5 g/l gelrite
M9	MS	20 g/l	1 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA+0.1 mg/l GA3	8 g/l agar
M10	MS	20 g/l	0.5 mg/l BAP+0.02 mg/l IAA+0.1 mg/l GA3	8 g/l agar
M11	MS	20 g/l	1 mg/l BAP+0.01 mg/l NAA+0.1 mg/l GA3	8 g/l agar
M12	MS	20 g/l	0.5 mg/l BAP+0.01 mg/l NAA+0.1 mg/l GA3	8 g/l agar
M13	MS	20 g/l	1 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA+0.1 mg/l GA3	8 g/l agar
M14	MS	20 g/l	0.75 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA+0.1 mg/l GA3	8 g/l agar
M15	MS	20 g/l	0.5 mg/l BAP+0.02 mg/l NAA+0.1 mg/l GA3	8 g/l agar
M16	MS	20 g/l	1 mg/l BAP+0.01 mg/l NAA+0.3 mg/l GA3	8 g/l agar
M17	MS	20 g/l	0.5 mg/l BAP+0.01 mg/l NAA+0.3 mg/l GA3	8 g/l agar

Rejenere sürgünler bağlı bulundukları ana dokudan ayrılarak, yaklaşık 0.5 cm uzunluğunda kesilip Çizelge 3.3’de verilen besin ortamlarını içeren cam kavanozlarda (60 ml besin ortamı) kültüre alınmışlardır. Her bir deneme için 20 eksplant kullanılmış ve denemeler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültürler, floresan aydınlatma altında 2500 - 3000 lüks ışık şiddetinde, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyotta, $24\pm4^{\circ}\text{C}$ ’de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.3.2 Yarı katı kültürlerde sürgün uzatma ortamının belirlenmesi ile ilgili uygulamalar

Mikroçoğaltım uygulamalarından elde edilen sürgünlerin boylarının uzatılması ve vitrifikasyon oluşumunun engellenmesi amacıyla, 15 günlük mikroçoğaltım altkültür süresinin sonunda sürgün demetlerinden yaklaşık 0.5 cm uzunluğunda sürgünler kesilip Çizelge 3.4’de verilen besin ortamlarını içeren cam kavanozlarda (60 ml besin ortamı) kültüre alınmışlardır. Her bir deneme için 20 eksplant kullanılmış ve denemeler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültürler, flüoresan aydınlatma altında 2500 - 3000 lüks ışık şiddetinde, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyotta, $24 \pm 4^{\circ}\text{C}$ ’de muhafaza edilmişlerdir.

Çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere yeterli sayıda sağlıklı *in vitro* deneme materyalinin sürdürülebilirliğinin sağlanabilmesi için, yarı katı kültür sisteminde sırasıyla sürgün çoğaltım (M17) ve sürgün uzatma besin ortamlarında (E5) mikroçoğaltım işlemine devam edilmiştir.

Çizelge 3.4 Sürgün uzatma ortamının belirlenmesi amacıyla kullanılan besin ortamlarının içerikleri

Besin Ortamı Kodu	Besin ortamları	Sükroz miktarı (g/l)	Bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarları (mg/l)	Kullanılan jelleştirici madde ve miktarı (g/l)
E1	MS	20 g/l	0.1 mg/l IBA	8 g/l agar
E2	MS	20 g/l	0.25 mg/l IBA	8 g/l agar
E3	MS	20 g/l	0.5 mg/l IBA	8 g/l agar
E4	MS	20 g/l	0.75 mg/l IBA	8 g/l agar
E5	MS	20 g/l	0.5 mg/l IBA+0.01 mg/l IAA	8 g/l agar

3.2.3.3 Sürgünlerin yarı katı kültürlerde köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması ile ilgili uygulamalar

Mikroçoğaltım prosesi eksplantların ilk 15 gün sürgün çoğaltma ortamında kültüre alınmasının ardından, 10 gün süreyle uzatma ortamında kültüre alınması şeklinde 4 ay sürdürülerek istenen sayıda *in vitro* bitkicik üretimi sağlanmıştır. Elde edilen bitkicikler son uzatma ortamlarından alınarak köklendirme için 20 g/l süktroz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş ½ MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. Kùltürler, floresan aydınlatma altında 2500 - 3000 lüks ışık şiddetinde, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyotta, 24±4°C’de muhafaza edilmişlerdir.

Köklendirilmiş *in vitro* bitkicikler, aklimatizasyon amacıyla serada %100 cocopeat ortamlarına alınmışlardır. İlk 7 gün yüksek nem (%90) koşullarında ve gölge altında (6000-8000 lüks) yetiştirilen bitkicikler, ardından 33 gün boyunca düşük nem (%40) ve yüksek ışık (20.000 lüks) koşullarında büyütölmüştür. Denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve her bir tekrar için 60 adet eksplant kullanılmıştır.

3.2.4 Küçük ölçekte sıvı kùltürlerin kurulması ile ilgili uygulamalar

3.2.4.1 *In vitro* sürgünlerin küçük ölçekte sıvı kùltürlere alıştırılması ile ilgili uygulamalar

Sıvı kùltürlere alıştırma denemelerinde yarı katı kùltür koşullarında mikroçoğaltımı sağlanan *in vitro* Myrobolan B sürgün demetlerinin ayrılması ile elde edilen 2-3 sürgün içeren eksplantlar kullanılmıştır. Sıvı kùltür denemeleri, ilk olarak 2010 yılı Ocak ayında kurulmuş olup Nisan ayında ikinci altkùltür denemeleri oluşturulmuştur.

Sıvı kùltüre alıştırma denemelerinde, *in vitro* sürgünlerin mikroçoğaltımı ve uzatılması amacıyla yarı katı kùltür çalışmalarında kullanılan besin ortamlarından, 20 g/l süktroz, 1 mg/l BAP, 0.01 mg/l NAA ve 0.3 mg/l GA₃ içeren sıvı MS (M16-Sıvı) ortamı, 20 g/l süktroz, 0.5 mg/l BAP, 0.01 mg/l NAA ve 0.3 mg/l GA₃ içeren

sıvı MS (M17-Sıvı) ortamı ile 0.5 mg/l IBA, 0.01 mg/l IAA içeren sıvı MS (E5-Sıvı) ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Sıvı kültür denemelerinde mikroçoğaltım ve sürgün uzatma ortamlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan besin ortamlarının içerikleri

Besin Ortamı Kodu	Besin ortamları	Sükroz miktarı (g/l)	Bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarları (mg/l)
M16-sıvı	MS	20 g/l	1 mg/l BAP+0.01 mg/l NAA+0.3 mg/l GA3
M17-sıvı	MS	20 g/l	0.5 mg/l BAP+0.01 mg/l NAA+0.3 mg/l GA3
E5-sıvı	MS	20 g/l	0.5 mg/l IBA+0.01 mg/l IAA

2-3 sürgün içeren *in vitro* eksplantlar öncelikle 10 ml sıvı besin ortamı içeren, filtre ile köprü oluşturulmuş kültür tüplerine aktarılmışlardır. Her bir deneme için 20 eksplant kullanılmış ve deneme 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültürler, floresan ışığında 2500-3000 lüks aydınlatma altında, 16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyotta, $24\pm 4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmişlerdir. Her bir altkültür süresi 30 günlük periyodu kapsamaktadır.

Sıvı kültürlerle alıştırma çalışmalarında, ölçek büyütme uygulamaları için yarı katı kültür sistemlerinden elde edilen 2-3 sürgünlü eksplantlar, 100 ml sıvı besin ortamı içeren, içinde filtre kağıdı ile köprü oluşturulmuş ve oluşturulmamış 250 ml hacmindeki erlenlerde kültüre alınmışlardır. Her bir erlen 2 eksplant kültüre alınmış olup, karıştırmalı ve karıştırmaz kültür sistemleri olmak üzere iki farklı deneme kurulmuştur. Her bir deneme için 20 eksplant kullanılmış ve deneme 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültürler, floresan ışığında 2500-3000 lüks aydınlatma altında, 16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyotta, $24\pm 4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmişlerdir. Karıştırmalı kültürler için erlen çalkalayıcısında 100 rpm çalkalama hızı uygulanmıştır. Her bir altkültür süresi 30 günlük periyodu kapsamaktadır.

3.2.4.2 Küçük ölçekte sıvı kültürlerde *in vitro* sürgünlerin çoğaltımının geliştirilmesi ile ilgili uygulamalar

Çalışmanın sonraki aşamalarında, RITA biyoreaktörlerinde ve balon tip cam biyoreaktörde mikroçoğaltımın optimizasyonu denemelerinde kullanılmak üzere sıvı kültürlerle alıştırılmış *in vitro* sürgünlerin, çoğaltımının geliştirilmesi için uygun besin ortamlarının belirlenmesi amacıyla 2-3 sürgünlü eksplantlar, 10 ml farklı sıvı besin ortamları (Çizelge 3.6) içeren, filtre ile köprü oluşturulmuş kültür tüplerine aktarılmışlardır. Her bir deneme için 20 eksplant kullanılmış ve deneme 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Kültürler, floresan ışığında 2500-3000 lüks aydınlatma altında, 16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyotta, $22\pm4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmişlerdir. Her bir altkültür süresi 30 günlük periyodu kapsamaktadır.

Çizelge 3.6 Sıvı kültür denemelerinde mikroçoğaltımın geliştirilmesi amacıyla kullanılan besin ortamlarının içerikleri

Besin Ortamı Kodu	Besin ortamları	Sükroz miktarı (g/l)	Bitki büyüme düzenleyicileri ve miktarları (mg/l)
M18-sıvı	MS	30 g/l	0.6 mg/l BAP+0.01 mg/l NAA
M19-sıvı	MS	30 g/l	0.7 mg/l BAP+0.01 mg/l NAA
M20-sıvı	MS	30 g/l	0.8 mg/l IBA+0.01 mg/l NAA

3.2.4.3 Sıvı kültür koşullarında elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi ve dış koşullara adaptasyonu ile ilgili uygulamalar

Filtre köprülü tüplerde M19 sıvı besin ortamında altkültüre alınan sürgünlerden elde edilen sağlıklı çoklu sürgünler kabin altında tekli sürgünlere ayrılarak, köklendirme için 20 g/l sükroz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş yarı katı $\frac{1}{2}$ MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. Deneme 3 tekrarlı olarak yapılmış ve her bir tekrar için 100 adet *in vitro* sürgün kullanılmıştır. Kültürler, floresan ışığında 2500-3000 lüks aydınlatma altında, 16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyotta, $22\pm4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmişlerdir. Her bir altkültür süresi 20 günlük periyodu kapsamaktadır.

Köklendirilmiş *in vitro* bitkicikler, serada torf perlit (4:1) ortamına alınmışlardır. İlk 7 gün yüksek nem (%90) koşullarında ve gölge altında (6000-8000 lüks) yetiştirilen bitkicikler, 33 gün boyunca normal sera ortamında düşük nem (%40) ve yüksek ışık (20000 lüks) koşullarında geliştirilmişlerdir. Denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve her bir tekrar için 60 adet eksplant kullanılmıştır.

3.2.5 RITA biyoreaktörlerinde mikroçoğaltım parametrelerinin optimizasyonu ve mikroçoğaltılan bitkiciklerin aklimatizasyonu ile ilgili uygulamalar

Sıvı kültür koşullarında, filtre köprülü erlenlerde kültüre alınan Myrobolan B sürgün demetlerinden elde edilen 2-3 sürgünlü eksplantlar geçici daldırma sisteminin kullanıldığı RITA biyoreaktörlerinde M19 sıvı besin ortamlarında altkültürlere alınarak üretim parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Optimum inokulasyon yoğunluğunun hesaplanabilmesi için 4, 6 ve 8 adet eksplant altkültüre alınmıştır. Daldırma süresinin optimizasyonu için 1 saatte 20 sn, 2 saatte 20 sn ve 3 saatte 20 sn olmak üzere farklı daldırma süreleri, altkültür süresinin optimizasyonu için 40, 50 ve 60 gün altkültür süreleri ile ışık şiddetinin optimizasyonu için 3000, 4000 ve 5000 lüks ışık şiddetleri uygulanmıştır. Ölçüm parametreleri olarak, çoğaltma katsayısı, sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), gövde kalınlığı (mm), yaprak sayısı (adet), yaş ağırlık (mg), kuru ağırlık (mg) ve vitrifikasyon yüzdeleri incelenmiştir.

RITA biyoreaktörlerde çoğaltılan mikrosürgünlerin *in vitro* köklendirme ve dış koşullara adaptasyon çalışmaları yapılmıştır. Sağlıklı çoklu sürgünlerin kabin altında ayrılması ile elde edilen tekli mikrosürgünler köklendirme için 20 g/l süktroz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş yarı katı ½ MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. Denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve her bir tekrar için 100 adet *in vitro* sürgün kullanılmıştır.

Kültürler 16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyotta, $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmişlerdir.

Köklendirilmiş *in vitro* bitkicikler serada torf perlit (4:1) ortamına alınmıştır. İlk 7 gün yüksek nem (%90) koşullarında ve gölge altında (6000-8000 lüks) yetiştirilen bitkicikler, 33 gün boyunca normal sera ortamında düşük nem (%40) ve yüksek ışık (20000 lüks) koşullarında geliştirilmişlerdir. Denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve her bir tekrar için 60 adet eksplant kullanılmıştır.

3.2.6 5 l balon tip biyoreaktörde mikroçoğaltım parametrelerinin ölçümü ve mikroçoğaltılan bitkiciklerin aklimatizasyonu ile ilgili uygulamalar

RITA biyoreaktörlerinde üretilen *in vitro* sürgün demetlerinden elde edilen 2-3 sürgünlü eksplantlar pH'ı 5.9 değerinde sabit tutulan, 750 ml M19 sıvı besin ortamı içeren balon tip biyoreaktörde kültüre alınmıştır. 20 adet eksplant inokülasyon yoğunluğu, 1 saatte 20 sn daldırma süresi ile 3000 lüks ışık şiddetinin uygulandığı kültür koşullarında 40 günlük altkültür süresinin sonunda çoğaltma katsayısı, sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), gövde kalınlığı (mm), yaprak sayısı (adet), yaş ağırlık (mg), kuru ağırlık (mg) ve vitrifikasyon yüzdeleri incelenmiştir. Biyoreaktörde besin ortamı tankı sürekli havalandırılarak, besin ortamı karıştırılmış ve 1 saatte 20 sn daldırma süresince %10 O₂, %50 CO₂ ve %40 N₂ içeren gaz karışımı biyoreaktöre beslenmiştir. Mikroçoğaltım denemeleri 3 tekrarlı olarak yapılmış ve her bir tekrar için 20 adet *in vitro* sürgün kullanılmıştır.

Balon tip biyoreaktörde çoğaltılan mikrosürgünlerin *in vitro* köklendirme ve dış koşullara adaptasyon çalışmaları yapılmıştır. Sağlıklı çoklu sürgünlerin kabin altında ayrılması ile elde edilen tekli mikrosürgünler köklendirme için 20 g/l süktroz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş yarı katı ½ MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. Denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve her bir tekrar için 20 adet *in vitro* sürgün kullanılmıştır.

Kültürler 16 saat aydınlık /8 saat karanlık fotoperiyotta, 22±4°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Köklendirilmiş *in vitro* bitkicikler serada torf perlit (4:1) ortamına alınmıştır. İlk 7 gün yüksek nem (%90) koşullarında ve gölge altında (6000-8000 lüks) yetiştirilen bitkicikler, 33 gün boyunca normal sera ortamında düşük nem (%40) ve yüksek ışık (20000 lüks) koşullarında geliştirilmişlerdir.

Denemeler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve her bir tekrar için 60 adet eksplant kullanılmıştır.

3.3 Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmalar süresince yapılan uygulamalar tesadüf parselleri deneme deseni esas alınarak üç tekerrürlü olarak düzenlenmiştir. Elde edilen veriler, TARİST istatistik programı (Açıkgöz ve ark., 2004) kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Eksplantların Sterilizasyonu ve Kültürlerin Başlatılması Denemelerinden Elde Edilen Veriler

Çalışmada 4 farklı prosedür (Çizelge 3.1) kullanılarak steril edilen eksplantlar, kültürlerin başlatılması için 1.0 mg/l BAP içeren MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Uygulanan sterilizasyon yöntemlerine göre 30 gün sonunda kültürde kontamine olan eksplant sayısı (adet) ve yüzdesi (%) ile ilgili bilgiler Çizelge 4.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 Arazi koşulları ve sera koşullarındaki Myrobolan B bitkilerinden alınan nod eksplantlarında, kültüre alındıktan 30 gün sonra kontamine eksplant sayısı (adet)* ve yüzdesi (%)

Donör Bitki	Uygulamalar	Kontamine eksplant sayısı (adet)				Kontamine eksplant yüzdesi (%)			
		T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
Arazi Koşulları	I	20	20	20	20	100	100	100	100
	II	20	20	20	20	100	100	100	100
	III	16	14	18	16	80	70	90	80
	IV	16	19	13	16	80	95	65	80
Sera Koşulları	I	0	0	1	0.3	0	0	5	1.7
	II	0	2	1	1	0	10	5	5.0
	III	0	0	2	0.7	0	0	10	3.3
	IV	0	1	0	0.3	0	5	0	1.7

* Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.

Uygulanan I. ve II. sterilizasyon yöntemleri sonucunda arazi koşullarındaki bitkilerden alınan eksplantların tamamında fungal kontaminasyonların olduğu saptanmıştır. III. ve IV. uygulamalarda bu kontaminasyonların eliminasyonu için %1 benomil içeren fungusit çözeltisi kullanılmıştır. Ancak bu durumda da kontaminasyon oluşumunun oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan istatistiki değerlendirmeye göre, donör bitki %1 seviyesinde önemli bulunurken, uygulama ve donör bitki*uygulama interaksyonu önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Arazi koşulları ve sera koşullarındaki donör bitkilerden alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon yöntemlerine göre 30 gün sonunda gözlenen kontamine eksplant yüzdeleri ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Donör bitki	1	4.509	4.509	625.344**	5.120	10.560
Uygulamalar	3	0.058	0.019	2.695ns	3.860	6.990
Donör bitki*uygulamalar	3	0.036	0.012	1.642ns	3.860	6.990
Hata	9	0.065	0.007			
Genel	16	4.668	0.292			

ns=not significant (önemsiz)

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi

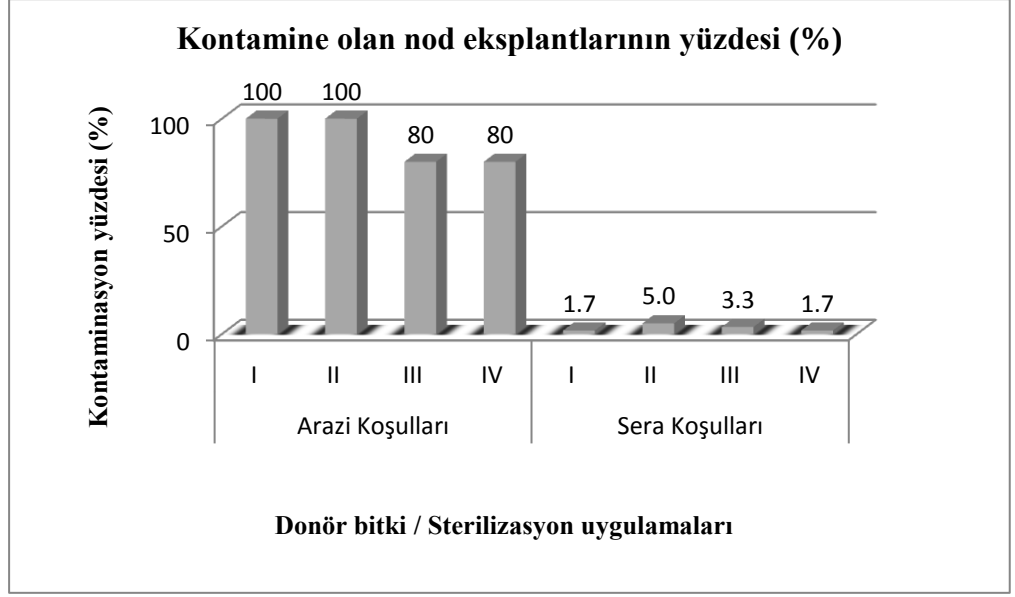
LSD değerlendirmesinden elde edilen sonuçlara göre, donör bitki açısından arazi koşullarında ortalama kontamine eksplant yüzdesi %90'lık değerle ilk grupta yer almıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Arazi koşulları ve sera koşullarındaki donör bitkilerden alınan eksplantlara uygulanan farklı sterilizasyon yöntemlerine göre elde edilen kontamine eksplant yüzdeleri ile ilgili LSD gruplandırması*

Donör Bitki	Uygulamalar				
	I	II	III	IV	Ortalama
Arazi koşulları	100	100	80	80	90.00 a
Sera koşulları	1.7	5	3.3	1.7	2.93 b
Ortalamalar	50.85 a	52.5 a	41.65 a	40.85 a	

*Donör bitki için HKO 0.007; LSD 0.113'dür.

Arazi koşullarından elde edilen az sayıda steril eksplantta da ilerleyen altkültürlerde fungal kontaminasyonlar oluşmuştur. Sera koşullarındaki bitkilerden alınan eksplantların sterilizasyonunda ise tüm uygulamalarda yüksek sterilizasyon başarısı elde edilmiştir (Şekil 4.1). Sera koşullarındaki donör bitkilerden izole edilen ve 1 mg/l BAP içeren MS besin ortamında (M1) kültüre alınan nodal eksplantlardan, steril olanların tümünde rejenerasyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Sera ve arazi koşullarındaki donör bitkilerden alınan ve farklı sterilizasyon yöntemleri uygulanan nod eksplantlarında gözlenen kontaminasyon oranları (%)



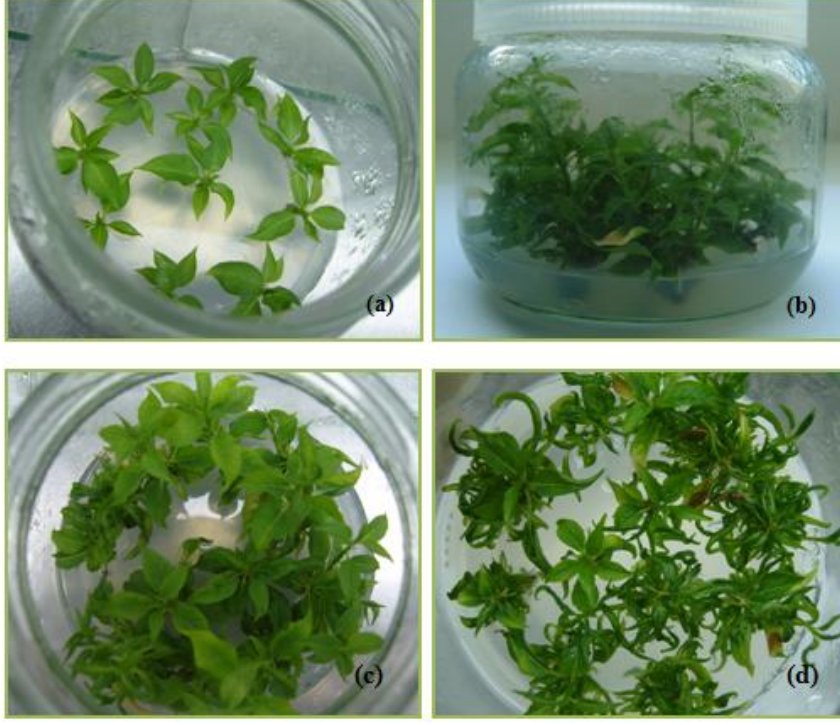
Şekil 4.2 Sera koşullarındaki donör bitkilerden alınan ve sterilize edilen nodal eksplantta gözlenen rejenerasyon

4.2 Yarı Katı Kültürlerde Mikroçoğaltım Uygulamalarından Elde Edilen Sonuçlar

4.2.1 Yarı katı kültürlerde sürgün çoğaltma ortamının belirlenmesi ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar

Ocak-Haziran 2009 döneminde yapılan çalışmalarda steril nod eksplantlarının rejenerasyonu sonucu edilen *in vitro* sürgünler, mikroçoğaltım ortamının belirlenmesi amacı ile Çizelge 3.3'de belirtilen besin ortamlarında

altkültüre alınmışlardır. Eksplantlar, bağlı bulundukları ana dokudan kesilerek yaklaşık 0.5 cm uzunluğunda ve 4-5 yapraklı tekli sürgünler halinde kültüre alınmışlardır. 17 farklı ortamda kültüre alınan eksplantlarda 30 gün sonunda sürgün sayılarında artışlar ve vitrifikasyon oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 (a) Yarı katı kültür koşullarında mikroçoğaltıma alınan Myrobolan B eksplantları, (b) 30 günlük altkültür sonrasında gözlenen yeni sürgün oluşumları, (c) Hafif vitrifikasyon oluşumu, (d) Yapraklarda ağır vitrifikasyon oluşumu

Sürgün çoğaltımı amacıyla kullanılan besin ortamlarında *in vitro* sürgün eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet), eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet), toplam vitrifiye olan eksplant sayısı (adet) ve vitrifikasyon oranları (%) verileri incelenmiş ve bunlara ait bilgiler Çizelge 4.4; Çizelge 4.5; Çizelge 4.6; Çizelge 4.7; Şekil 4.4; Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da verilmiştir. İstatistiki değerlendirmeye göre incelenen parametreler için besin ortamları %1 seviyesinde önemli bulunmuş, ekplant başına sürgün sayıları için en iyi sonuçlar M6 ve M17 besin ortamlarında, vitrifikasyon oranı için en iyi sonuçlar M9, M11, M15 ve M17 besin ortamlarında elde edilmiştir.

Çizelge 4.4 Farklı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)**

Besin Ortamları	In vitro sürgün eksplantlarının oluşturdukları toplam sürgün sayıları (adet)				In vitro sürgün eksplantı başına düşen ortalama sürgün sayıları (adet)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ortalama
M1	85	88	87	260.00	4.25	4.40	4.35	4.33 ab
M2	89	83	88	260.00	4.45	4.15	4.40	4.33 ab
M3	63	55	62	180.00	3.15	2.75	3.10	3.00 cde
M4	42	52	46	140.00	2.10	2.60	2.30	2.33 f
M5	83	71	66	220.00	4.15	3.55	3.30	3.67 bcd
M6	88	103	89	280.00	4.40	5.15	4.45	4.67 a
M7	81	93	86	260.00	4.05	4.65	4.30	4.33 ab
M8	79	70	71	220.00	3.95	3.50	3.55	3.67 bcd
M9	58	59	63	180.00	2.90	2.95	3.15	3.00 def
M10	60	52	48	160.00	3.00	2.60	2.40	2.67 ef
M11	91	81	88	260.00	4.55	4.05	4.40	4.33 ab
M12	40	53	47	140.00	2.00	2.65	2.35	2.33 f
M13	87	92	81	260.00	4.35	4.60	4.05	4.33 ab
M14	55	52	53	160.00	2.75	2.60	2.65	2.67 ef
M15	49	45	47	141.00	2.45	2.25	2.35	2.35 f
M16	87	93	60	240.00	4.35	4.65	3.00	4.00 abc
M17	103	83	94	280.00	5.15	4.15	4.70	4.67 a

* Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.

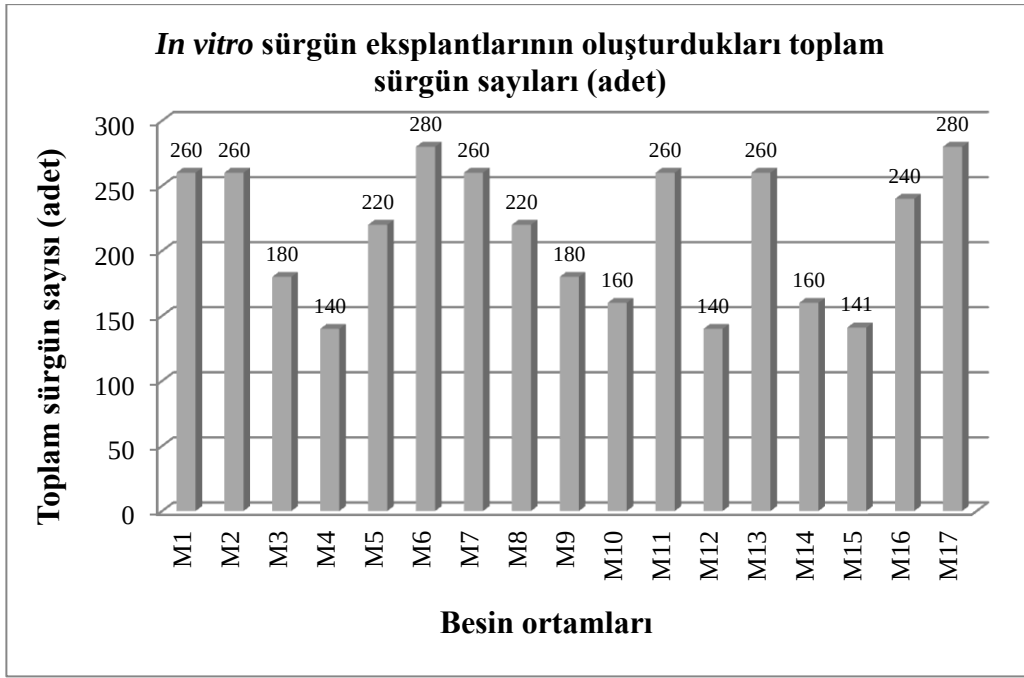
**Testte kullanılan HKO değeri 0.122; LSD değeri 0.779'dur.

Çizelge 4.5 Farklı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet) ile ilgili varyans analiz sonuçları

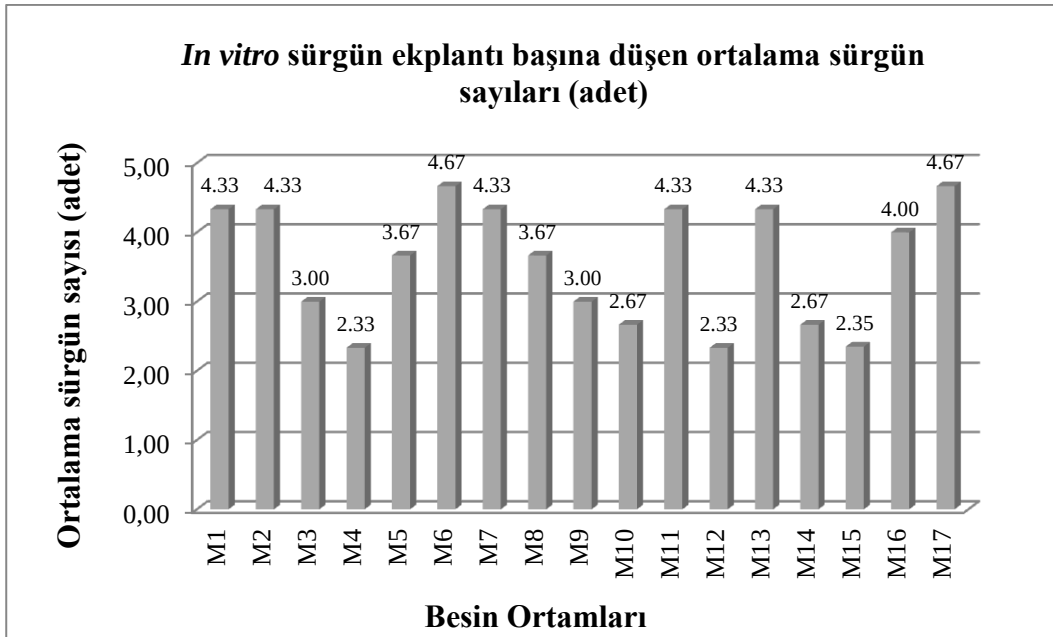
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	16	36.343	2.271	18.639**	1.790	2.290
Hata	34	4.143	0.122			
Genel	50	40.486	0.810			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.4 Farklı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)



Şekil 4.5 Farklı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)

Çizelge 4.6 Farklı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam vitrifiye bitkicik sayıları (adet)* ve vitrifikasyon oranları (%)**

Besin Ortamları	In vitro sürgün eksplantlarından rejenere olan vitrifiye bitkicik sayıları (adet)				In vitro sürgün eksplantlarından rejenere olan bitkiciklerde vitrifikasyon oluşum oranları (%)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ortalama
M1	18	19	17	54.00	90	95	85	90.00 a
M2	15	14	15	44.00	75	70	75	73.33 b
M3	8	4	6	18.00	40	20	30	30.00 de
M4	10	12	12	34.00	50	60	60	56.67 c
M5	7	5	4	16.00	35	25	20	26.67 def
M6	9	5	8	22.00	45	25	40	36.67 d
M7	6	7	9	22.00	30	35	45	36.67 d
M8	2	3	4	9.00	10	15	20	15.00 fg
M9	2	3	1	6.00	10	15	5	10.00 g
M10	2	3	4	9.00	10	15	20	15.00 fg
M11	3	2	2	7.00	15	10	10	11.67 g
M12	1	3	4	8.00	5	15	20	13.33 fg
M13	2	4	3	9.00	10	20	15	15.00 fg
M14	4	3	1	8.00	20	15	5	13.33 fg
M15	4	2	2	8.00	20	10	10	13.33 g
M16	5	1	4	10.00	25	5	20	16.67 efg
M17	3	2	2	7.00	15	10	10	11.67 g

* Eksplant sayısı tekrerrür başına 20 adettir.

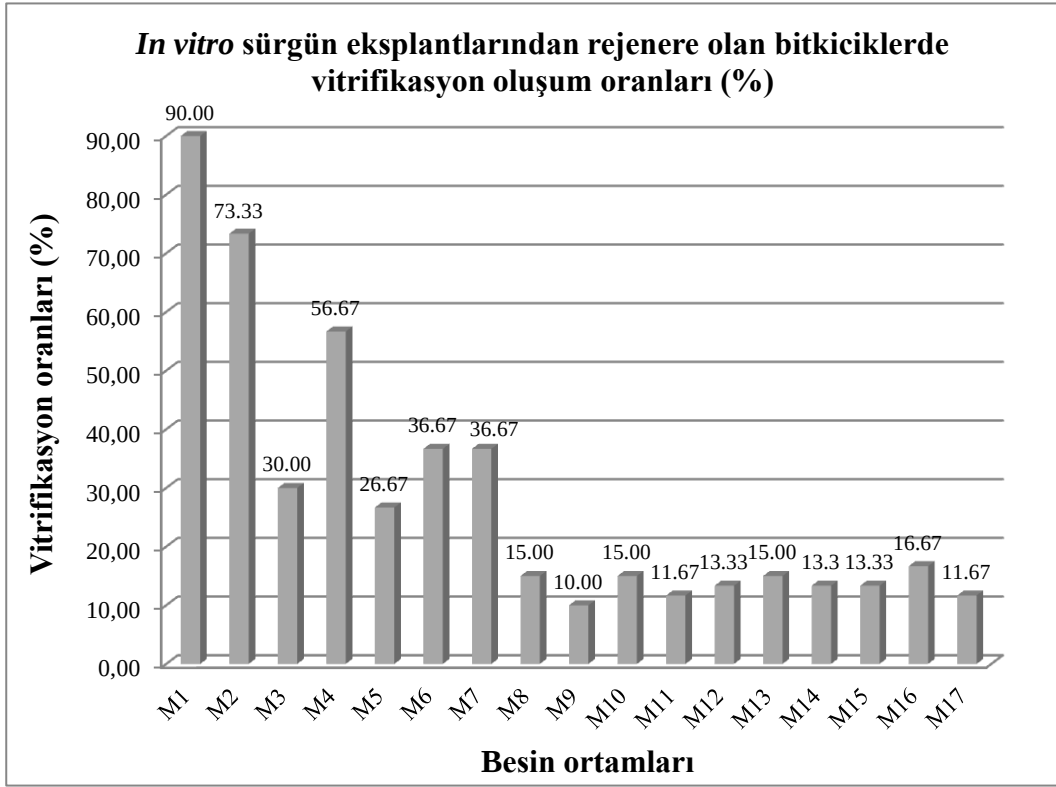
**Testte kullanılan HKO değeri 45.098 ; LSD değeri 14.986'dır.

Çizelge 4.7 Farklı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında oluşan vitrifikasyon oranları (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	16	27031.373	1689.461	37.462**	1.790	2.290
Hata	34	1533.333	45.098			
Genel	50	28564.706	571.294			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

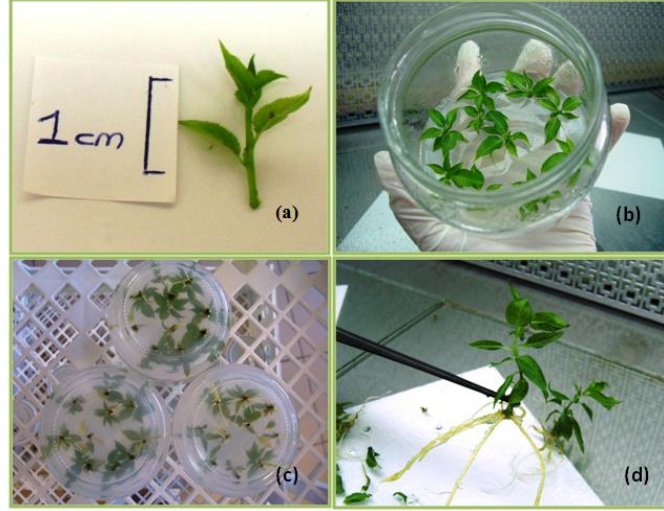
**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.6 Farklı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda vitrifikasyon oluşum oranları (%)

4.2.2 Yarı katı kültürlerde sürgün uzatma ortamının belirlenmesi ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar

Sürgün çoğaltımı amacıyla farklı besin ortamlarında altkültüre alınan eksplantlarda, düşük oranda sitokinin içeren besin ortamlarında vitrifikasyon sorunu çözülmüş, ancak rozet şeklinde, kısa boylu ve düşük çoğaltma katsayısına sahip bitkicikler elde edilmiştir. Hem bitkiciklerin sürekli sitokininler ile temasını engelleyerek vitrifikasyon oluşma olasılığını düşürmek, hem de rozet yapıdaki eksplantların boylarını uzatmak için çoğaltma ortamında kültüre alınan eksplantlar kültürlerin 15. günü sonunda uzatma ortamlarına (Çizelge 3.4) aktarılmışlardır. Eksplantlar bağlı bulundukları ana dokudan ayrılarak, yaklaşık 1 cm boyunda tekli sürgünler şeklinde kültüre alınmışlardır (Şekil 4.7). 5 farklı ortamda kültüre alınan eksplantlarda 30 gün sonunda sürgün boyları ölçülmüştür.



Şekil 4.7 (a) Yarı katı kültür koşullarında sürgün uzaması amacıyla altkültüre alınan Myrobolan B eksplantı, (b) Uzatma ortamına alınan rozet şeklinde eksplantlar, (c) Uzatma ortamında kök oluşumu, (d) Uzatma ortamında sürgün boylarında uzama ve kök oluşumları

Rozet şeklinde kısa sürgünlerin uzatma besin ortamlarında 30 günlük altkültürleri sonunda sürgün boyları (cm) incelenmiş ve bunlara ait bilgiler Çizelge 4.8; Çizelge 4.9 ve Şekil 4.8’de verilmiştir. İstatistiki değerlendirmeye göre sürgün boyları açısından besin ortamları %1 seviyesinde önemli bulunmuş ve en uzun boylu bitkiler 20 g/l süzkroz, 0.5 mg/l IBA, 0.01 mg/l IAA ve 8 g/l agar içeren E5 besin ortamında elde edilmiştir.

Çizelge 4.8 Farklı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda ölçülen sürgün boyları (cm)*

Besin Ortamları	In vitro sürgün eksplantlarının boyları (cm)			
	T1	T2	T3	Ortalama
E1	1.20	1.40	1.10	1.23 b
E2	1.30	1.20	1.20	1.23 b
E3	1.50	1.70	2.00	1.73 b
E4	1.60	1.90	2.00	1.83 b
E5	4.20	3.10	3.70	3.67 a

Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.

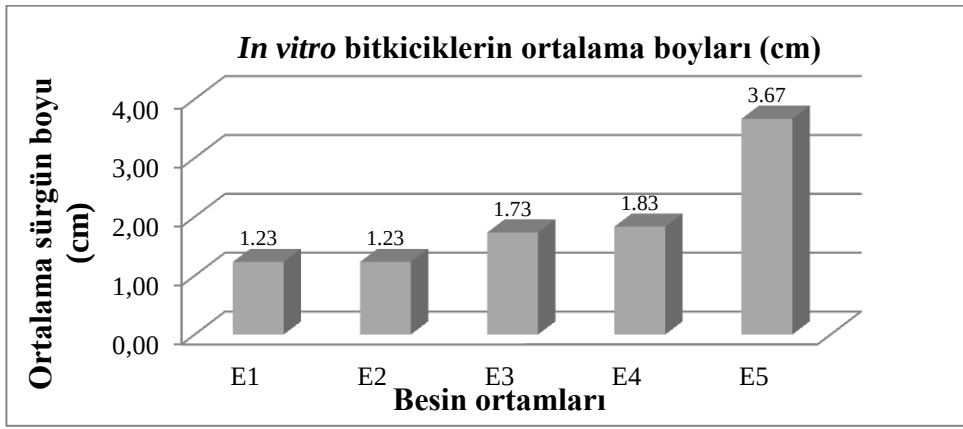
*Testte kullanılan HKO değeri 0.087; LSD değeri 0.765’dir.

Çizelge 4.9 Farklı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında sürgün boyları (cm) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	4	12.103	3.026	34.645**	3.480	5.990
Hata	10	0.873	0.087			
Genel	14	12.976	0.927			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

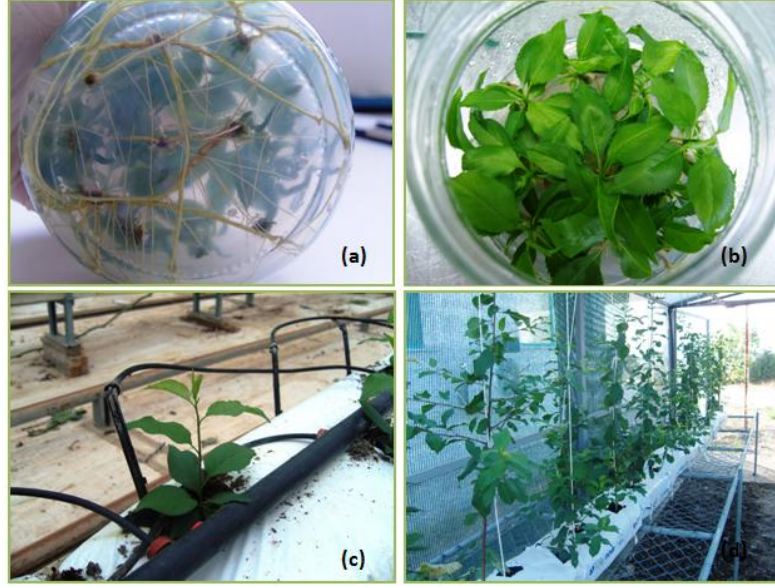
**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.8 Farklı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen boyları (cm)

4.2.3 *In vitro* sürgünlerin yarı katı kültürlerde köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar

Mikroçoğaltım prosesi, eksplantların ilk 15 gün sürgün çoğaltma ortamında kültüre alınmasının ardından 10 gün uzatma ortamında kültüre alınması şeklinde 4 ay sürdürülerek istenen sayıda *in vitro* bitkicik üretimi sağlanmıştır. Elde edilen bitkicikler son uzatma ortamlarından alınarak köklendirme için 20 g/l sükröz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş ½ MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. 20 gün sonunda, bitkiciklerde %95 oranında köklenme başarısı elde edilmiştir. Köklendirilmiş *in vitro* bitkicikler, %90 aklimatizasyon başarısı ile serada cocopeat ortamlarına alınmışlardır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 (a) Yarı katı kültür koşullarında köklendirme ortamında kültüre alınan Myrobolan B bitkiciklerinde kök oluşumları, (b) Köklendirme ortamındaki *in vitro* bitkicikler, serada cocopeat ortamına alınan erik kök anacının (c) 30 gün sonundaki gelişimi, (d) 90 gün sonundaki gelişimi

4.3 Küçük Ölçekte Sıvı Kültürlerin Kurulması ile İlgili Uygulamalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.3.1 *In vitro* sürgünlerin küçük ölçekte sıvı kültürlerle alıştırılması ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar

Yarı katı kültür koşullarında çoğaltılan *in vitro* sürgün demetleri, sıvı kültür koşullarına alıştırılmak amacıyla yaklaşık 1cm uzunluğunda tekli sürgünlere ayrılarak, farklı sıvı besin ortamları (Çizelge 3.5) içeren ve içinde eksplantın üzerinde duracağı filtre kağıdı bulunan tüplerde altkültürlere alınmışlardır. 30 günlük altkültür süresinin sonunda *in vitro* sürgün eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet), eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet), sürgün boyları (cm), toplam vitrifiye olan eksplant sayıları (adet) ve vitrifikasyon oranları (%) verileri incelenmiş ve bunlara ait bilgiler Çizelge 4.10; Çizelge 4.11; Çizelge 4.12; Çizelge 4.13; Çizelge 4.14; Şekil 4.10; Şekil 4.11; Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de verilmiştir.

İstatistiki değerlendirmeye göre besin ortamları, incelenen parametrelerden sürgün boyu için önemsiz bulunurken, diğer parametreler için %1 seviyesinde önemli bulunmuştur. Eksplant başına en yüksek ortalama sürgün sayısı (5.67 adet) M17 sıvı besin ortamında, en yüksek ortalama sürgün boyu (3.4 cm) ve en düşük vitrifikasyon oranı (%5) E5 sıvı besin ortamında elde edilmiştir. Tüm parametreler değerlendirildiğinde ortalama sürgün sayısının en yüksek, sürgün boyu ve vitrifikasyon oranlarının da nispeten düşük olduğu M17 sıvı besin ortamı mikroçoğaltım için optimum besin ortamı olarak seçilmiştir.

Çizelge 4.10 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)**

Besin Ortamları	In vitro sürgün eksplantlarının oluşturdukları toplam sürgün sayıları (adet)				In vitro sürgün eksplantı başına düşen ortalama sürgün sayıları (adet)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ortalama
M16-sıvı	85	77	78	240.00	4.25	3.85	3.90	4.00 a
M17-sıvı	125	118	97	340.00	6.25	5.90	4.85	5.67 a
E5-sıvı	43	38	19	100.00	2.15	1.90	0.95	1.67 b

* Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.

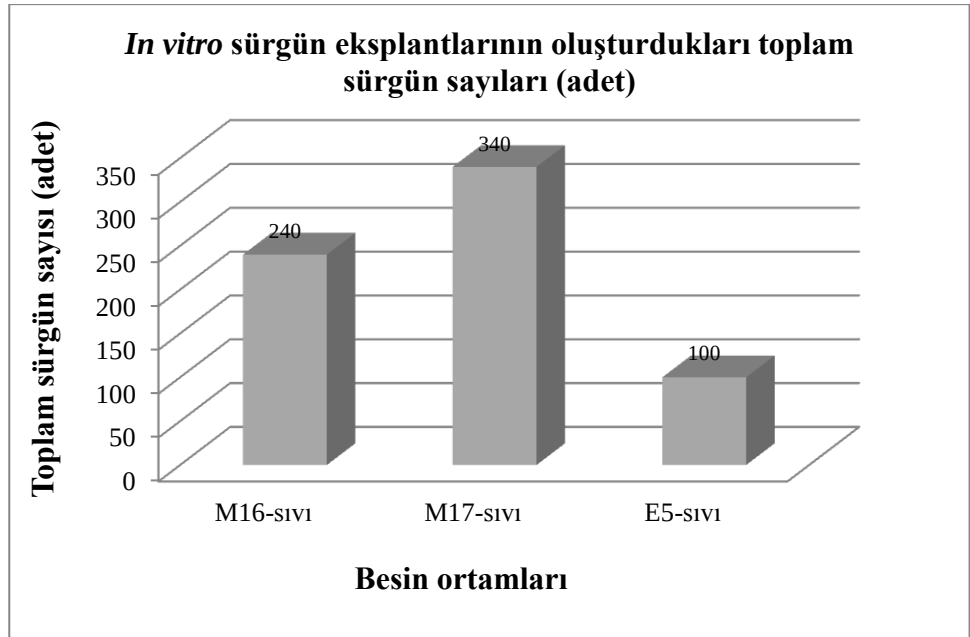
**Testte kullanılan HKO değeri 0.326; LSD değeri 1.729'dur.

Çizelge 4.11 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları (adet) ile ilgili varyans analiz sonuçları

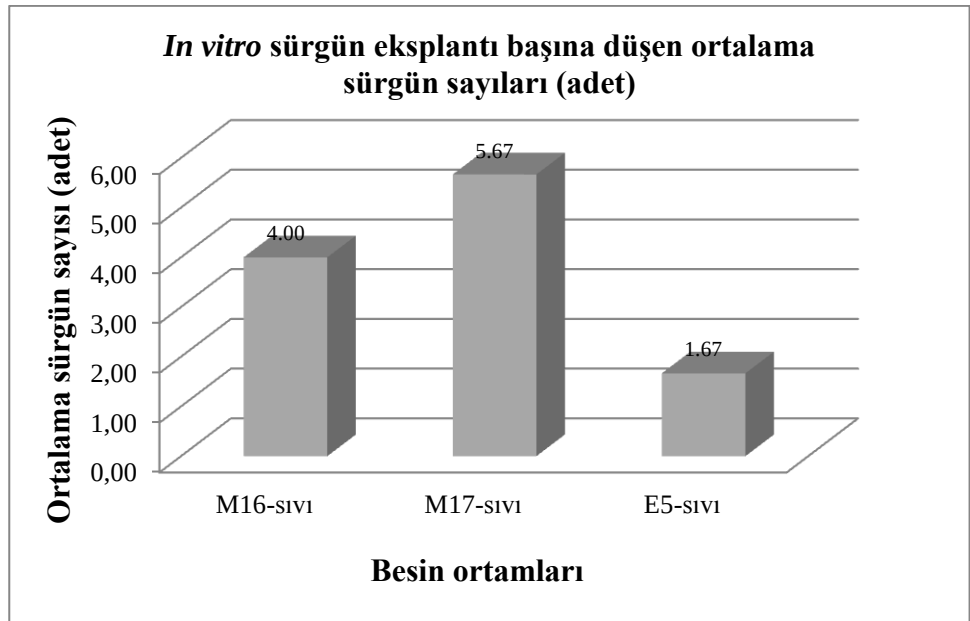
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	2	24.222	12.111	37.106**	5.140	10.920
Hata	6	1.958	0.326			
Genel	8	26.181	3.273			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.10 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)

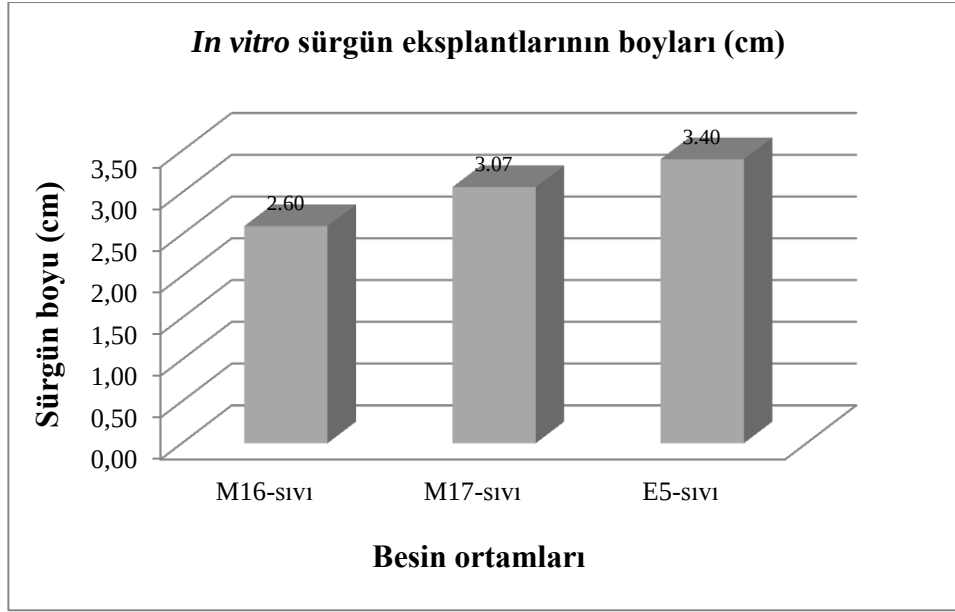


Şekil 4.11 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)

Çizelge 4.12 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen sürgün boyları (cm)*

Besin Ortamları	In vitro sürgün eksplantlarının boyları (cm)			
	T1	T2	T3	Ort.
M16-sıvı	2.50	2.20	3.10	2.60
M17-sıvı	3.20	2.70	3.30	3.07
E5-sıvı	3.10	4.20	2.90	3.40

*Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.



Şekil 4.12 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen boyları (cm)

Çizelge 4.13 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam vitrifiye bitkicik sayıları (adet)* ve vitrifikasyon oranları (%)**

Besin Ortamları	In vitro sürgün eksplantlarından rejenere olan toplam vitrifiye bitkicik sayıları (adet)				In vitro sürgün eksplantlarından rejenere olan bitkiciklerde vitrifikasyon oluşum oranları (%)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ortalama
M16-sıvı	5	4	4	13.00	25	20	20	21.67 a
M17-sıvı	2	1	2	5.00	10	5	10	8.33 b
E5-sıvı	1	1	1	3.00	5	5	5	5.00 b

* Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.

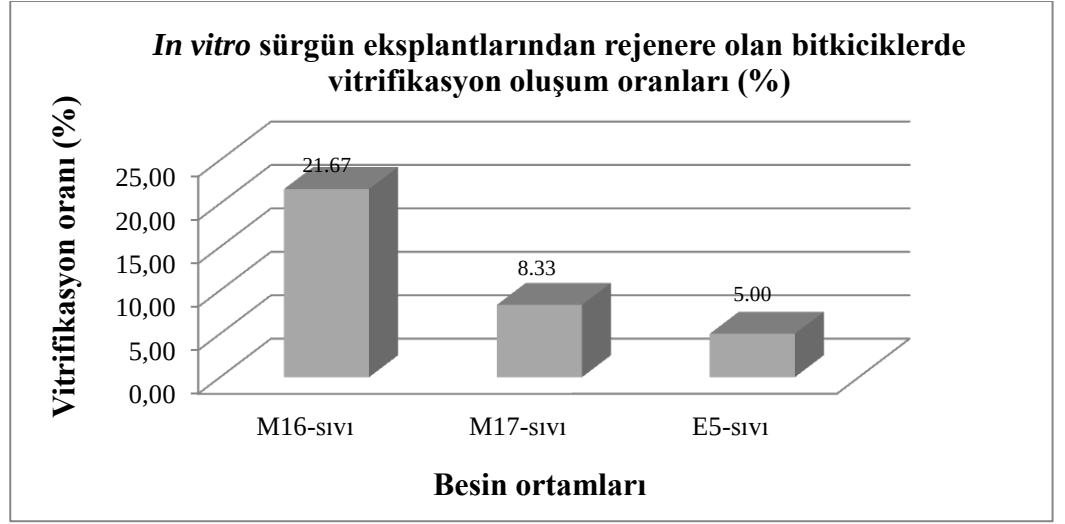
**Testte kullanılan HKO değeri 5.556 ; LSD değeri 7.134'dır.

Çizelge 4.14 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında oluşan vitrifikasyon oranları (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

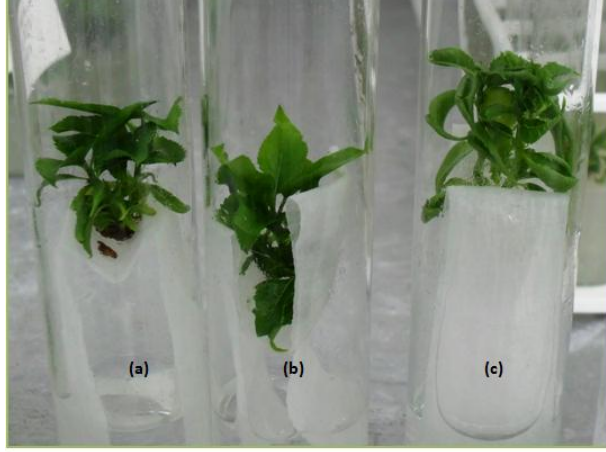
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı	2	466.667	233.333	42.000**	5.140	10.920
Hata	6	33.333	5.556			
Genel	8	500.000	62.500			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.13 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda vitrifikasyon oluşum oranları (%)



Şekil 4.14 Filtre köprülü tüplerde Myrobolan B bitkilerinde 30 günlük altkültür sonunda (a) M17 sıvı besin ortamında sürgün çoğaltımı, (b) E5 sıvı besin ortamında sürgün uzaması, (c) M16 sıvı besin ortamında vitrifikasyon oluşumu

Sıvı kültürlerle alıştırma çalışmalarında, ölçek büyütme uygulamaları için 100 ml sıvı besin ortamı içeren, içinde filtre kağıdı ile köprü oluşturulmuş ve oluşturulmamış 250 ml hacmindeki erlenlerde karıştırmalı ve karıştırmamasız kültür sistemleri kurulmuştur. Bir önceki denemede sıvı kültür sistemleri için optimum besin ortamı olarak belirlenen M17 sıvı besin ortamında 30 günlük altkültür süresinin sonunda *in vitro* sürgün eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet), eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet), sürgün boyları (cm), toplam vitrifiye olan eksplant sayıları (adet) ve vitrifikasyon oranları (%) verileri incelenmiş ve bunlara ait bilgiler Çizelge 4.15; Çizelge 4.16; Çizelge 4.17; Çizelge 4.18; Çizelge 4.19; Çizelge 4.20; Şekil 4.14; Şekil 4.15; Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verilmiştir.

İstatistiki değerlendirmeye göre kültür tipleri, incelenen parametreler için %1 seviyesinde önemli bulunmuştur. En iyi sürgün gelişimi, filtre köprülü erlenlerde karıştırmalı kültür sistemlerinde elde edilmiştir. Vitrifikasyon oluşum durumlarına bakıldığında, en düşük vitrifikasyon oluşumu filtre köprülü tüplerde kültüre alınan bitkiciklerde gözlenmiştir. Sürgün gelişimine karıştırmanın olumlu etkisinin yanında, filtre köprüsü oluşturmanın vitrifikasyon oranını azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.18).

Çizelge 4.15 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)**

Besin Ortamı	Sıvı Kültür Tipi	In vitro sürgün eksplantlarının oluşturdukları toplam sürgün sayıları (adet)				In vitro sürgün eksplantı başına düşen ortalama sürgün sayıları (adet)			
		T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ort.
M17-sıvı	Filtre Köprülü Tüp	125	118	97	340.00	6.25	5.90	4.85	5.67 c
	Filtre Köprüsüz Karıştırmasız Erlen	137	124	159	420.00	6.85	6.20	7.95	7.00 bc
	Filtre Köprüsüz Karıştırmalı Erlen	20	22	21	63.00	1.00	1.10	1.05	1.05 c
	Filtre Köprülü Karıştırmasız Erlen	154	189	177	520.00	7.70	9.45	8.85	8.67 ab
	Filtre Köprülü Karıştırmalı Erlen	178	215	167	560.00	8.90	10.75	8.35	9.33 a

* Eksplant sayısı tekrerr başına 20 adettir.

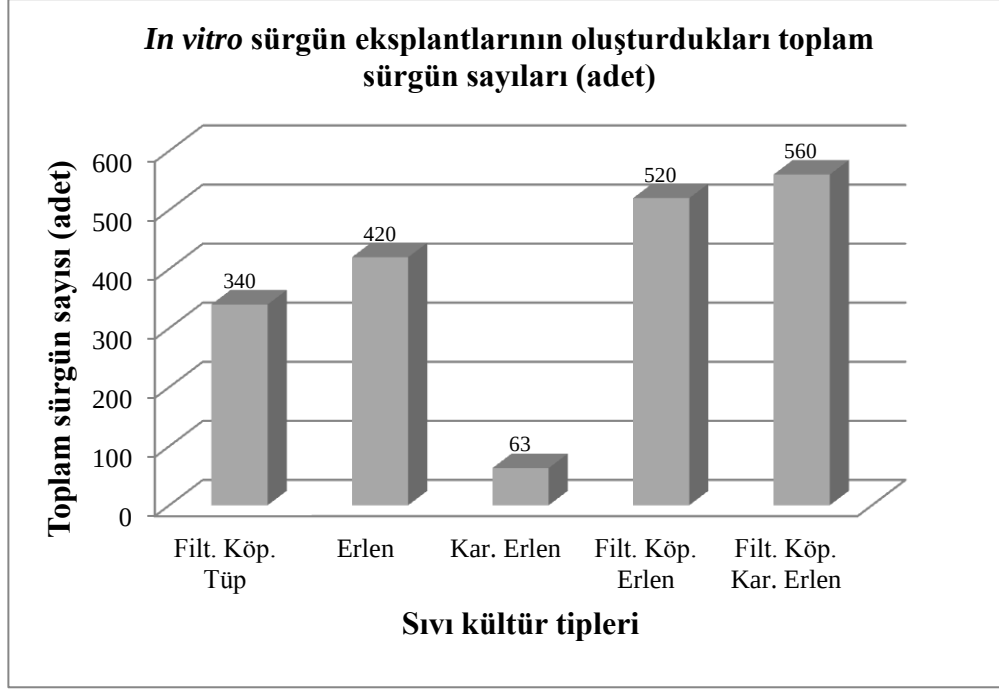
**Testte kullanılan HKO değeri 0.738; LSD değeri 2.222'dir.

Çizelge 4.16 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları (adet) ile ilgili varyans analiz sonuçları

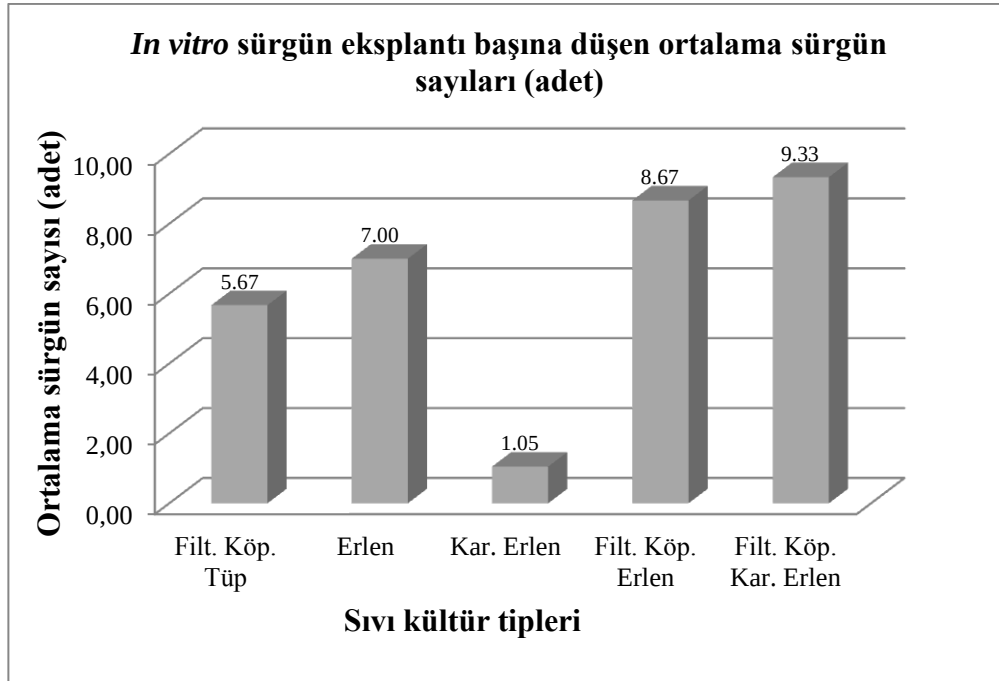
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Sıvı kültür tipi	4	129.739	32.435	43.979**	3.480	5.990
Hata	10	7.375	0.738			
Genel	14	137.114	9.794			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.15 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet) (Filt. Köp. Tüp: Filtre köprülü tüp; Kar. Erlen: Karıştırmalı erlen; Filt. Köp. Erlen: Filtre köprülü erlen; Filt. Köp. Kar. Erlen: Filtre köprülü karıştırmalı erlen)



Şekil 4.16 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)

Çizelge 4.17 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen sürgün boyları (cm)*

Besin Ortamları	Sıvı Kültür Tipi	In vitro sürgün eksplantlarının boyları (cm)			
		T1	T2	T3	Ort.
M17-sıvı	Filtre Köprülü Tüp	3.20	2.70	3.30	3.07 a
	Filtre Köprüsüz Karıştırmasız Erlen	4.00	3.80	4.40	4.07 a
	Filtre Köprüsüz Karıştırmalı Erlen	1.20	1.60	1.50	1.43 c
	Filtre Köprülü Karıştırmasız Erlen	4.30	4.70	4.10	4.37 a
	Filtre Köprülü Karıştırmalı Erlen	4.50	4.20	4.90	4.53 a

* Eksplant sayısı tekrerr başına 20 adettir.

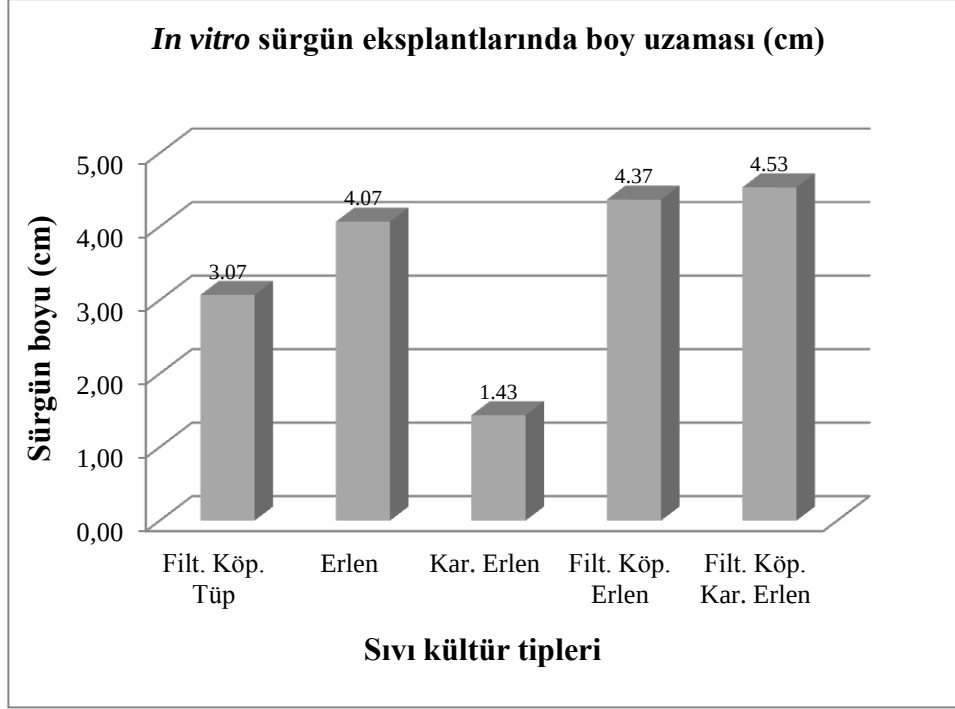
Testte kullanılan HKO değeri 0.091 ; LSD değeri 0.782'dir.

Çizelge 4.18 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarının boyları (cm) ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Sıvı kültür tipi	4	19.796	4.949	54.186**	3.480	5.990
Hata	10	0.913	0.091			
Genel	14	20.709	1.479			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.17 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen boyları (cm)

Çizelge 4.19 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam vitrifiye bitkicik sayıları (adet)* ve vitrifikasyon oranları (%)**

Besin Ortamları	Sıvı Kültür Tipi	<i>In vitro</i> sürgün eksplantlarından rejenere olan vitrifiye bitkicik sayıları (adet)				<i>In vitro</i> sürgün eksplantlarından rejenere olan bitkiciklerde vitrifikasyon oluşum oranları (%)			
		T1	T2	T3	Top.	T1	T2	T3	Ort.
M17-sıvı	Filtre Köprülü Tüp	2	1	2	5.00	10	5	10	8.33 d
	Filtre Köprüsüz Karıştırmasız Erlen	20	20	20	60.00	100	100	100	100.00 a
	Filtre Köprüsüz Karıştırmalı Erlen	20	20	20	60.00	100	100	100	100.00 a
	Filtre Köprülü Karıştırmasız Erlen	14	11	13	38.00	70	55	65	63.33 b
	Filtre Köprülü Karıştırmalı Erlen	8	5	6	19.00	40	25	30	31.67 c

* Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.

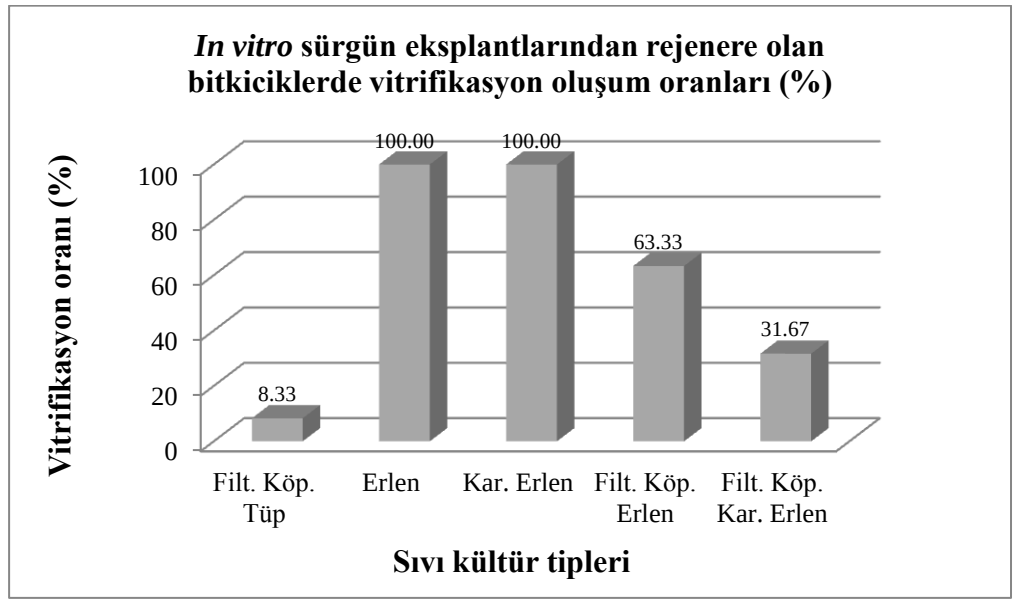
**Testte kullanılan HKO değeri 25.000 ; LSD değeri 12.950'dır.

Çizelge 4.20 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında oluşan vitrifikasyon oranları (%) ile ilgili varyans analiz sonuçları

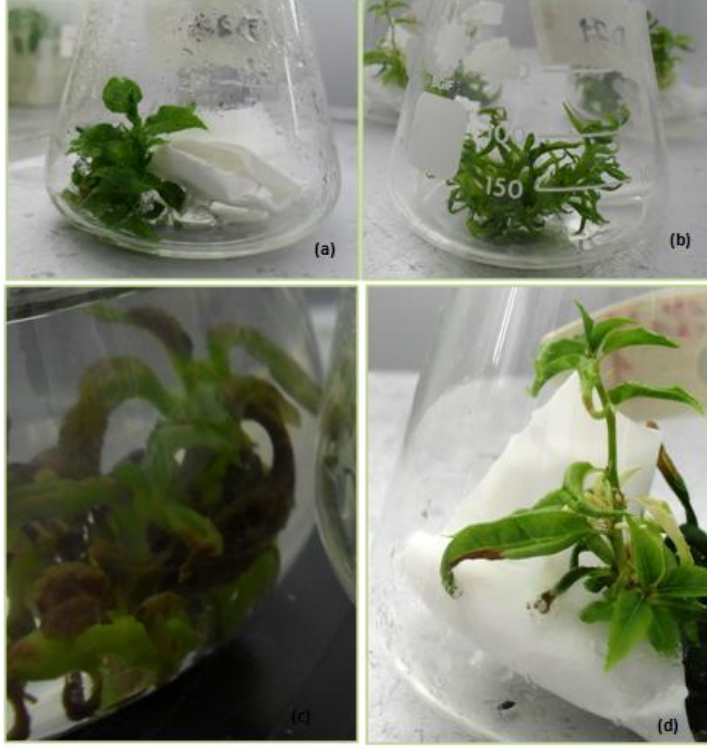
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Sıvı kültür tipi	4	20043.333	5010.833	200.433**	3.480	5.990
Hata	10	250.000	25.000			
Genel	14	20293.333	1449.524			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.18 Farklı sıvı kültür tiplerinde altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda vitrifikasyon oluşum oranları (%)



Şekil 4.19 M17 sıvı besin ortamı içeren erlenlerde, (a) Filtre köprülü karıştırmasız, (b) Filtre köprüsüz karıştırmasız, (c) Filtre köprüsüz karıştırmalı ve (d) Filtre köprülü karıştırmalı kültür tiplerinde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarında 30 günlük altkültür sonunda sürgün gelişimleri ve vitrifikasyon oluşumları

4.3.2 Küçük ölçekte sıvı kültürlerde *in vitro* sürgünlerin çoğaltımının geliştirilmesi ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar

Sıvı kültürlerde ölçek büyütme denemelerinde sürgün çoğaltımı, boy uzaması ve düşük vitrifikasyon oranları bakımından optimum kültür tipi olarak belirlenen karıştırmalı filtre köprülü erlenlerde, karıştırma esnasında sürgünlerin büyük kısmının köprü üzerinden düştükleri ve direkt sıvı besin ortamıyla temas halinde kaldıkları gözlenmiştir. Çalışmanın sonraki aşamalarında RITA biyoreaktörleri ve balon tip geçici daldırma sistemleri ile ilgili denemelerde kullanılmak üzere sıvı kültürlerde çok sayıda *in vitro* materyalin çoğaltılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla, mikroçoğaltımın geliştirilmesi için Myrobolan B tek sürgünleri farklı sıvı besin ortamları (Çizelge 3.6) içeren filtre köprülü tüplerde altkültürlere alınmışlardır. 30 günlük altkültür süresinin sonunda *in vitro* sürgün eksplantlarından elde edilen toplam sürgün sayıları (adet), eksplant başına

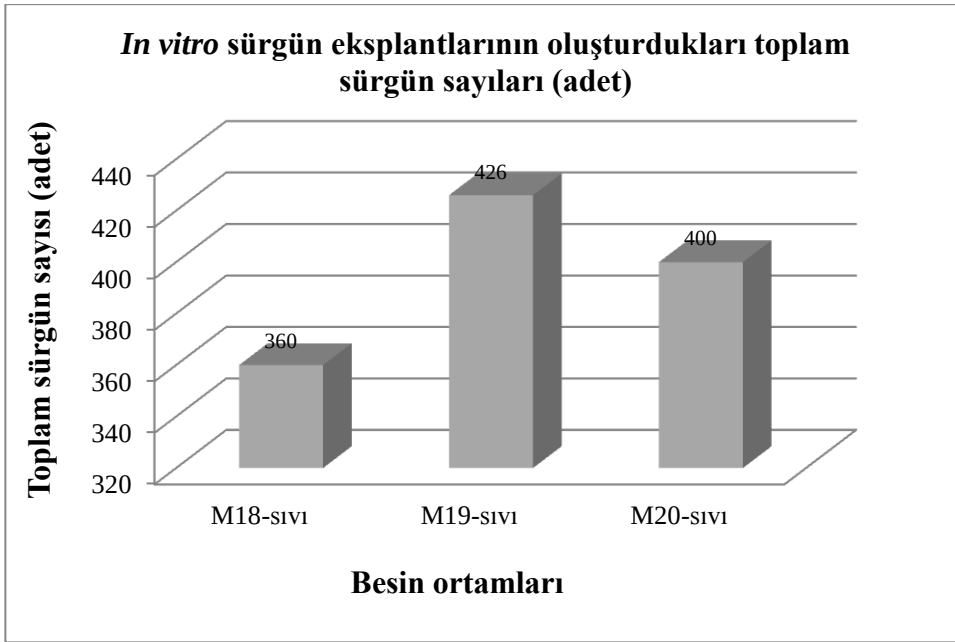
düşen sürgün sayısı (adet), sürgün boyları (cm), toplam vitrifiye olan eksplant sayıları (adet) ve vitrifikasyon oranları (%) verileri incelenmiş ve bunlara ait bilgiler Çizelge 4.21; Çizelge 4.22; Çizelge 4.23; Şekil 4.20; Şekil 4.21; Şekil 4.22 ve Şekil 4.23’de verilmiştir.

İstatistiki değerlendirmeye göre kullanılan sıvı besin ortamları, incelenen tüm parametreler için önemsiz bulunmuştur. Ancak yapılan gözlemler neticesinde sürgün gelişimi, sürgün boyu ve düşük vitrifikasyon oranlarının sağlandığı besin ortamının M19 sıvı besin ortamı olduğu saptanmıştır. Biyoreaktör denemelerinde kullanılmak üzere, sıvı kültür denemelerinden elde edilen sürgünlerin, M19 sıvı besin ortamında filtre köprülü tüplerde her biri 30 gün süren altkültürlere alınarak mikroçoğaltımları yapılmıştır.

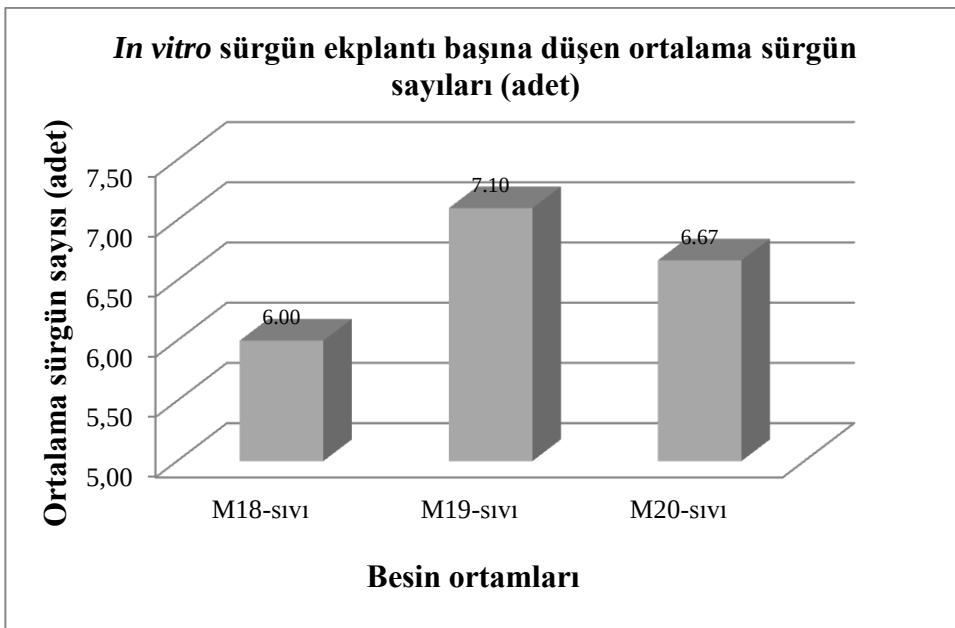
Çizelge 4.21 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)**

Besin Ortamları	In vitro sürgün eksplantlarının oluşturdukları toplam sürgün sayıları (adet)				In vitro sürgün eksplantı başına düşen ortalama sürgün sayıları (adet)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ort.
M18-sıvı	98	143	119	360.00	4.90	7.15	5.95	6.00
M19-sıvı	123	155	148	426.00	6.15	7.75	7.40	7.10
M20-sıvı	92	141	167	400.00	4.60	7.05	8.35	6.67

* Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.



Şekil 4.20 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)

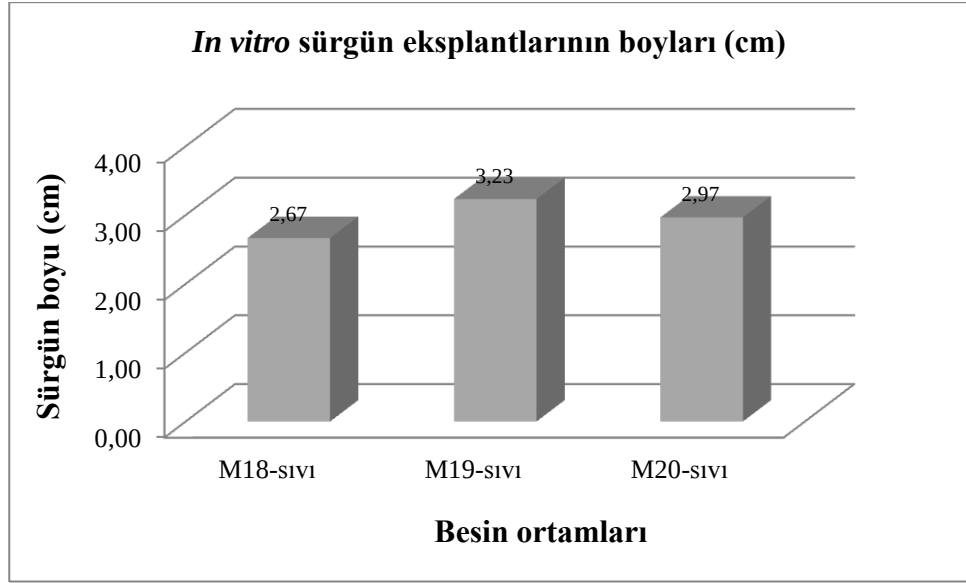


Şekil 4.21 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarından 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)

Çizelge 4.22 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen sürgün boyları (cm)*

Besin Ortamları	In vitro sürgün eksplantlarının boyları (cm)			
	T1	T2	T3	Ortalama
M18-sıvı	2.50	2.30	3.20	2.67
M19-sıvı	3.10	3.30	3.30	3.23
M20-sıvı	3.20	3.00	2.70	2.97

*Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.

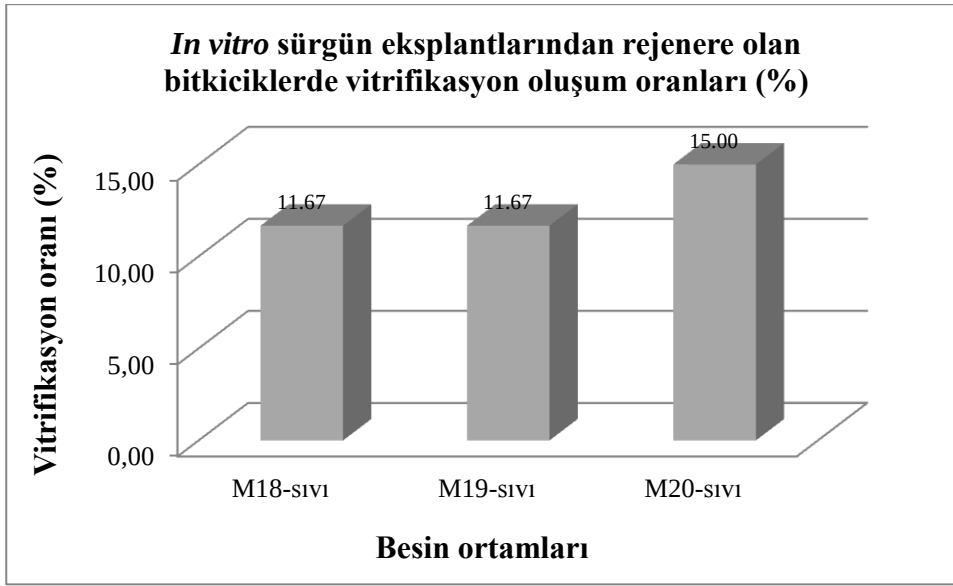


Şekil 4.22 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarının 30 gün sonunda ölçülen boyları (cm)

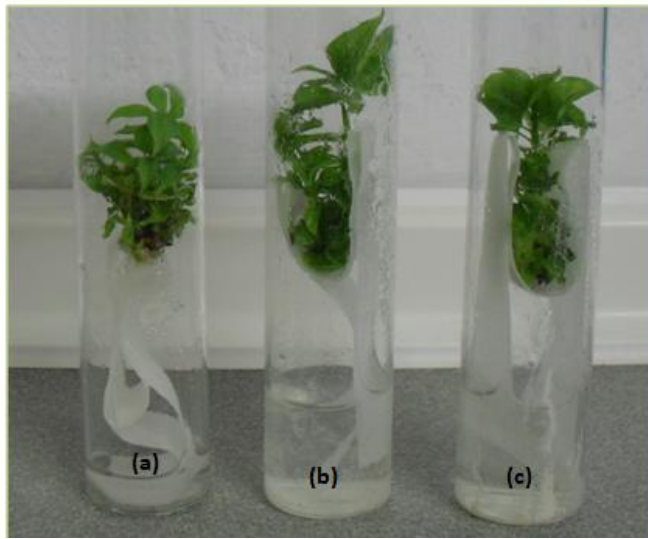
Çizelge 4.23 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam vitrifiye bitkicik sayıları (adet)* ve vitrifikasyon oranları (%)

Besin Ortamları	In vitro sürgün eksplantlarından rejenere olan vitrifiye bitkicik sayıları (adet)				In vitro sürgün eksplantlarından rejenere olan bitkiciklerde vitrifikasyon oluşum oranları (%)			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Ortalama
M18-sıvı	2	3	2	7.00	10	15	10	11.67
M19-sıvı	3	2	2	7.00	15	10	10	11.67
M20-sıvı	2	4	3	9.00	10	20	15	15.00

* Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.



Şekil 4.23 Filtre köprülü tüplerde farklı sıvı besin ortamlarında altkültüre alınan *in vitro* Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda vitrifikasyon oluşum oranları (%)



Şekil 4.24 Filtre köprülü tüplerde Myrobolan B bitkilerinde 30 günlük altkültür sonunda (a) M18 (b) M19 ve (c) M20 sıvı besin ortamında sürgün çoğaltımları

4.3.3 Sıvı kültür koşullarında elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi ve dış koşullara adaptasyonu ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar

Filtre köprülü tüplerde sıvı kültürlerde mikroçoğaltım prosesinden elde edilen tekli sürgünler köklendirme için 20 g/l sükroz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş yarı katı ½ MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. 20 gün sonunda, bitkiciklerde %96.67 oranında köklenme başarıları elde edilmiştir. Köklendirilmiş *in vitro* bitkicikler, %90 aklimatizasyon başarıları ile serada torf:perlite (4:1) ortamlarına alınmışlardır (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 Sıvı kültür koşullarında mikroçoğaltılan sürgün demetlerinden elde edilen tekli eksplantların (a) Yarı katı kültür koşullarında köklendirilmesi (b) Köklendirme ortamında kök gelişimleri, (c) Sera alıştırma ortamına alınmaya hazır köklü bitkicik, (d) Serada torf perlit ortamına alınan erik kök anacınının 15 gün sonunda kök ve yaprak gelişimi

4.4 RITA Biyoreaktörlerinde Mikroçoğaltım Parametrelerinin Optimizasyonu ve Mikroçoğaltılan Bitkiciklerin Aklimatizasyonu ile İlgili Uygulamalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.4.1 RITA biyoreaktörlerinde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu

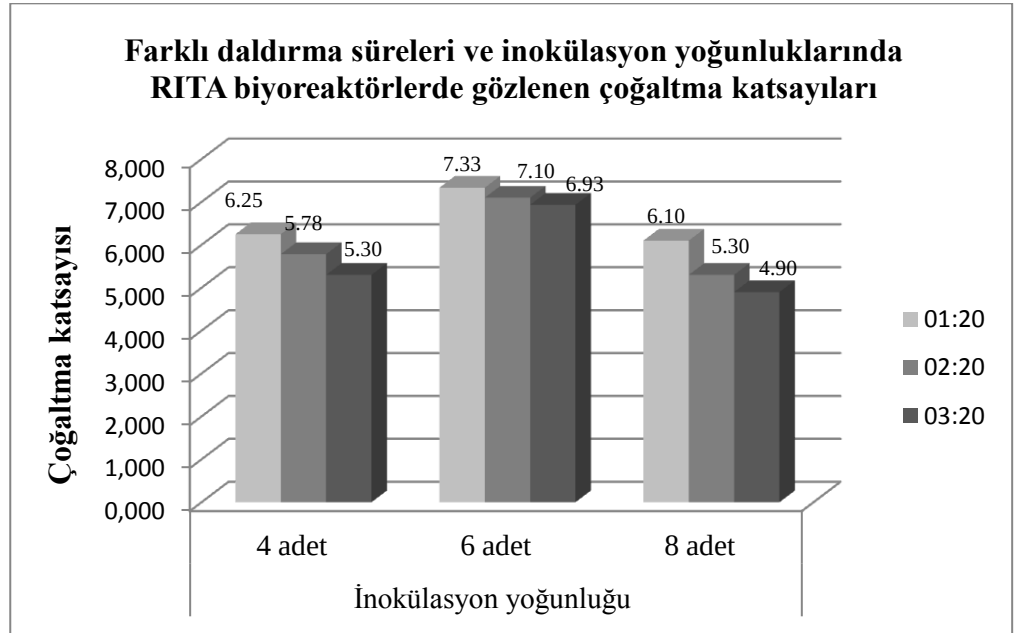
Filtre köprülü tüplerde sıvı kültür koşullarında elde edilen *in vitro* sürgün demetleri, yaklaşık 1cm uzunluğunda iki uç sürgünlü eksplantlara ayrılarak, inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla RITA biyoreaktörlerde altkültürlere alınmışlardır. RITA biyoreaktörlerinde besin ortamı olarak daha önceki çalışmalarda sıvı kültürler için optimum olarak belirlenen, 30 g/l süzkroz, 0.7 mg/l BAP ve 0.01 mg/l NAA içeren 250 ml sıvı MS besin ortamı (M19) kullanılmıştır. Daldırma süresi olarak 1sa: 20sn, 2sa: 20sn ve 3sa: 20 sn, inokülasyon yoğunluğu olarak 4, 6 ve 8 adet eksplantın kullanıldığı denemelerde 30 günlük altkültür süresinin sonunda *in vitro* sürgün eksplantlarından elde edilen çoğaltma katsayıları, toplam sürgün sayıları (adet), eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet), ortalama sürgün boyları (cm), ortalama yaprak sayıları (adet), ortalama gövde kalınlıkları (mm), ortalama yaş ağırlık (mg), ortalama kuru ağırlık (mg), toplam vitrifiye olan eksplant sayıları (adet) ve vitrifikasyon oranları (%) verileri incelenmiştir.

İstatistiki değerlendirmeye göre, inokülasyon yoğunluğu çoğaltma katsayısı, toplam sürgün sayıları, eksplant başına ortalama sürgün sayısı, ortalama yaprak sayısı, ortalama yaş ağırlık, ortalama kuru ağırlık ve vitrifikasyon oranı için %1 seviyesinde önemli, incelenen diğer parametreler için önemsiz, daldırma süresi, yaş ağırlık ve kuru ağırlık için %1 seviyesinde önemli, vitrifikasyon oranı için %5 seviyesinde önemli, diğer parametreler için önemsiz ve daldırma süresi*inokülasyon yoğunluğu interaksyonu, yaş ağırlık ve kuru ağırlık için %1 seviyesinde önemli, diğer parametreler için önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.24 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında* 30 gün sonunda elde edilen çoğaltma katsayıları

Daldırma Süreleri	Çoğaltma katsayıları											
	4 adet eksplant				6 adet eksplant				8 adet eksplant			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
01:20	6.25	7.30	5.20	6.25	7.10	7.80	7.10	7.33	5.80	5.60	6.90	6.10
02:20	6.50	5.70	5.15	5.78	8.10	7.60	5.60	7.10	5.60	6.10	4.20	5.30
03:20	5.10	5.60	5.20	5.30	6.80	7.60	6.40	6.93	3.70	5.30	5.70	4.90

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



Şekil 4.26 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen çoğaltma katsayıları

Inokülasyon yoğunluklarına göre çoğaltma katsayıları incelendiğinde, tüm daldırma sürelerinde düşük inokülasyon yoğunluğunda (4 adet eksplant) ortalama çoğaltma katsayıları 5.78 iken, yüksek inokülasyon yoğunluğunda (8 adet eksplant) 5.43'e düşmüştür. Daldırma süreleri açısından değerlendirildiğinde, en yüksek çoğaltma katsayısı (6.56) saatte 20 sn daldırma yapılan denemelerde, en düşük çoğaltma katsayısı (5.71) ise 3 saatte 20 sn daldırma uygulanan denemelerde gözlenmiştir. İkili interaksiyon açısından bakıldığında, en yüksek

çoğaltma katsayısı (7.33) 6 adet eksplantın kullanıldığı ve saatte 20 sn daldırma sıklığının uygulandığı çalışmadan elde edilmiştir (Çizelge 4.24; Çizelge 4.25; Çizelge 4.26 ve Şekil 4.26).

Çizelge 4.25 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen çoğaltma katsayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
İnokülasyon Yoğunluğu	2	14.336	7.168	9.925**	3.550	6.010
Daldırma Süresi	2	3.285	1.643	2.274ns	3.550	6.010
İ. Yoğ.* D. Sür.	4	0.551	0.138	0.191ns	2.930	4.580
Hata	18	13.000	0.722			
Genel	26	31.172	1.199			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi

ns= α :önemsiz

Çizelge 4.26 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen çoğaltma katsayıları ile ilgili LSD gruplandırması*

Daldırma süreleri	Çoğaltma katsayıları			
	4 adet eksplant	6 adet eksplant	8 adet eksplant	İnokülasyon yoğ. ort.
01:20	6.250	7.333	6.100	6.561
02:20	5.783	7.100	5.300	6.061
03:20	5.300	6.933	4.900	5.711
Daldırma sürelerinin ort.	5.778 b	7.122 a	5.433 b	
*İnokülasyon yoğunluğu için HKO değeri 0.722; LSD değeri 0.801'dir.				

İnokülasyon yoğunluklarına göre toplam sürgün sayıları ve eksplant başına sürgün sayısı incelendiğinde, tüm daldırma sürelerinde düşük inokülasyon yoğunluğunda (4 adet eksplant) toplam sürgün sayıları ve eksplant başına ortalamalama sürgün sayısı sırasıyla 833 ve 11.569 adet iken, yüksek inokülasyon yoğunluğunda (8 adet eksplant) 783 ve 10.884'e düşmüştür. Daldırma süreleri

açısından değerlendirildiğinde, en yüksek toplam sürgün sayısı (946 adet) ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı (12.22 adet) saatte 20 sn daldırma yapılan denemelerde, en düşük toplam sürgün sayısı (824 adet) ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı (9.82 adet) ise 3 saatte 20 sn daldırma yapılan uygulamalarda gözlenmiştir. İkili interaksiyon açısından bakıldığında, en yüksek toplam sürgün sayısı (1057 adet) ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı (14.68 adet) 6 adet eksplantın kullanıldığı ve saatte 20 sn daldırma sıklığının uygulandığı çalışmadan elde edilmiştir (Çizelge 4.27; Çizelge 4.28; Çizelge 4.29; Çizelge 4.30; Şekil 4.27 ve Şekil 4.28).

Çizelge 4.27 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)*

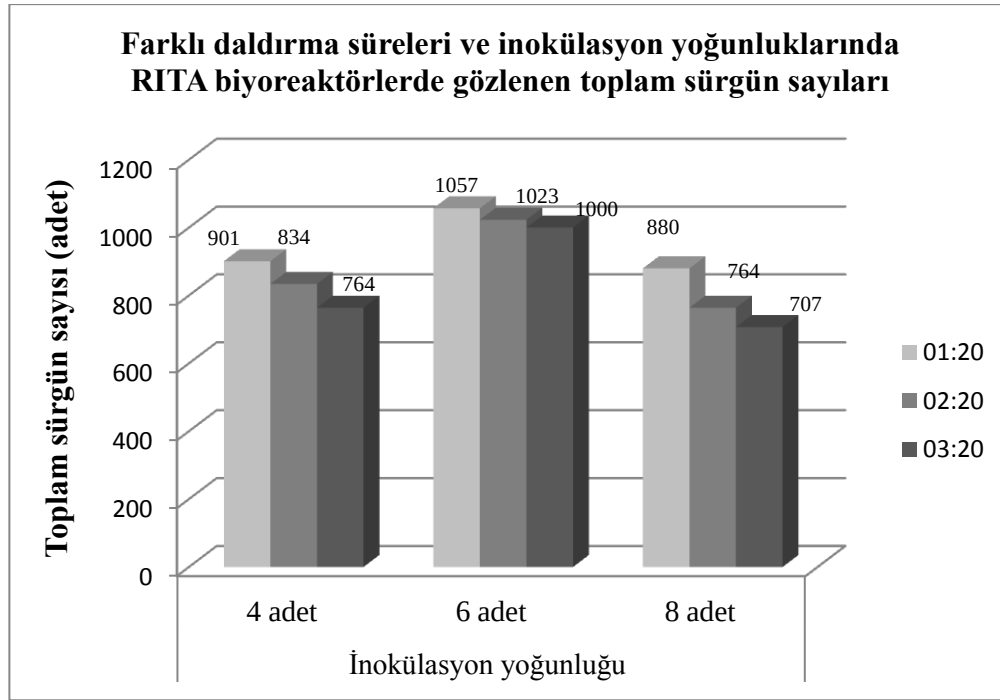
Daldırma süreleri	Toplam sürgün sayıları (adet)											
	4 adet eksplant				6 adet eksplant				8 adet eksplant			
	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Toplam	T1	T2	T3	Toplam
01:20	300	351	250	901	341	375	341	1057	279	269	332	880
02:20	312	274	248	834	389	365	269	1023	269	293	202	764
03:20	245	269	250	764	327	365	308	1000	178	255	274	707

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.

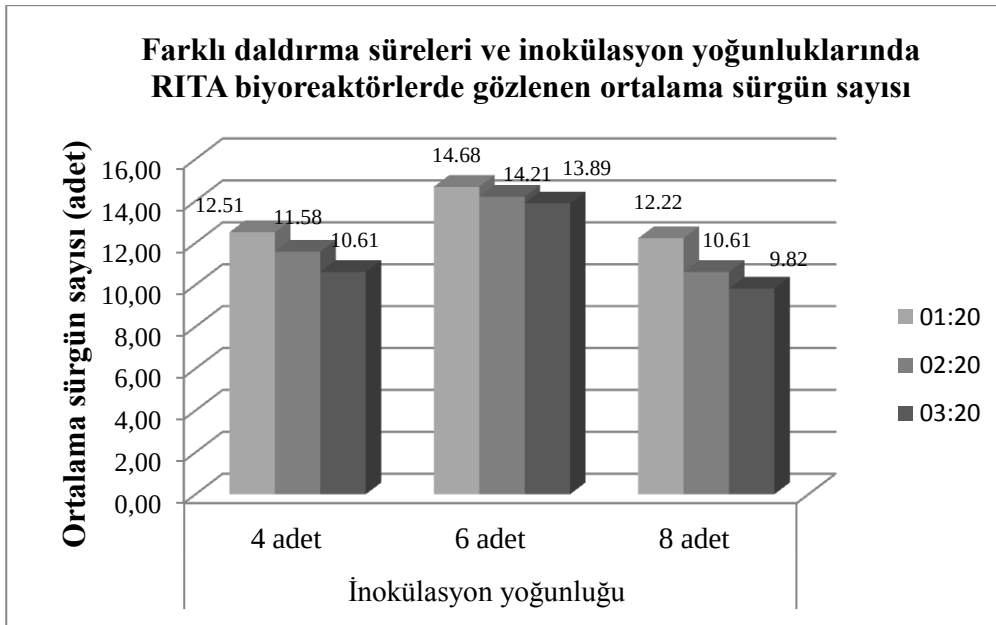
Çizelge 4.28 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)*

Daldırma süreleri	Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)											
	4 adet eksplant				6 adet eksplant				8 adet eksplant			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
01:20	12.50	14.63	10.42	12.51	14.21	15.63	14.21	14.68	11.63	11.21	13.83	12.22
02:20	13.00	11.42	10.33	11.58	16.21	15.21	11.21	14.21	11.21	12.21	8.42	10.61
03:20	10.21	11.21	10.42	10.61	13.63	15.21	12.83	13.89	7.42	10.63	11.42	9.82

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



Şekil 4.27 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)



Şekil 4.28 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları (adet)

Çizelge 4.29 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
İnokülasyon Yoğunluğu	2	57.274	28.637	9.922**	3.550	6.010
Daldırma Süresi	2	13.134	6.567	2.275ns	3.550	6.010
İ. Yoğ.* D. Sür.	4	2.232	0.558	0.193ns	2.930	4.580
Hata	18	51.953	2.886			
Genel	26	124.594	4.792			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi

ns= α :önemsiz

Çizelge 4.30 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları ile ilgili LSD gruplandırması*

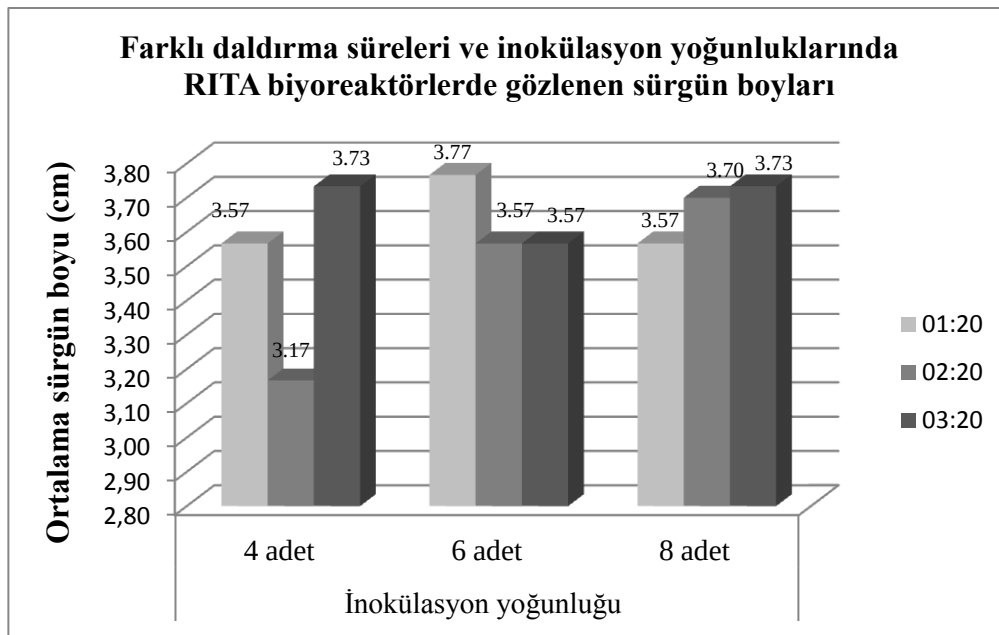
Daldırma süreleri	Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)			
	4 adet eksplant	6 adet eksplant	8 adet eksplant	İnokülasyon yoğ. ort.
01:20	12.514	14.681	12.222	13.139
02:20	11.583	14.208	10.611	12.134
03:20	10.611	13.889	9.819	11.440
Daldırma sürelerinin ort.	11.569 b	14.259 a	10.884 b	
*İnokülasyon yoğunluğu için HKO değeri 2.886; LSD değeri 1.602'dir.				

İnokülasyon yoğunlukları, daldırma süreleri ve ikili interaksiyon açısından sürgün boylarının istatistiki olarak önemli olmadığı saptanmış olmakla birlikte, en fazla ortalama sürgün boyu (3.77 cm) 6 adet eksplantın kullanıldığı ve saatte 20 sn daldırma sıklığının uygulandığı çalışmadan elde edilmiştir (Çizelge 4.31. Şekil 4.29).

Çizelge 4.31 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama sürgün boyları (cm)*

Daldırma Süreleri	Sürgün boyu (cm)											
	4 adet eksplant				6 adet eksplant				8 adet eksplant			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
01:20	3.50	3.80	3.40	3.57	3.30	4.10	3.90	3.77	3.30	4.30	3.10	3.57
02:20	3.10	3.30	3.10	3.17	3.70	3.70	3.30	3.57	3.50	4.30	3.30	3.70
03:20	3.90	4.20	3.10	3.73	3.40	4.10	3.20	3.57	4.40	3.70	3.10	3.73

* Eksplant sayısı tekerrür başına 24 adettir.



Şekil 4.29 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama sürgün boyları (cm)

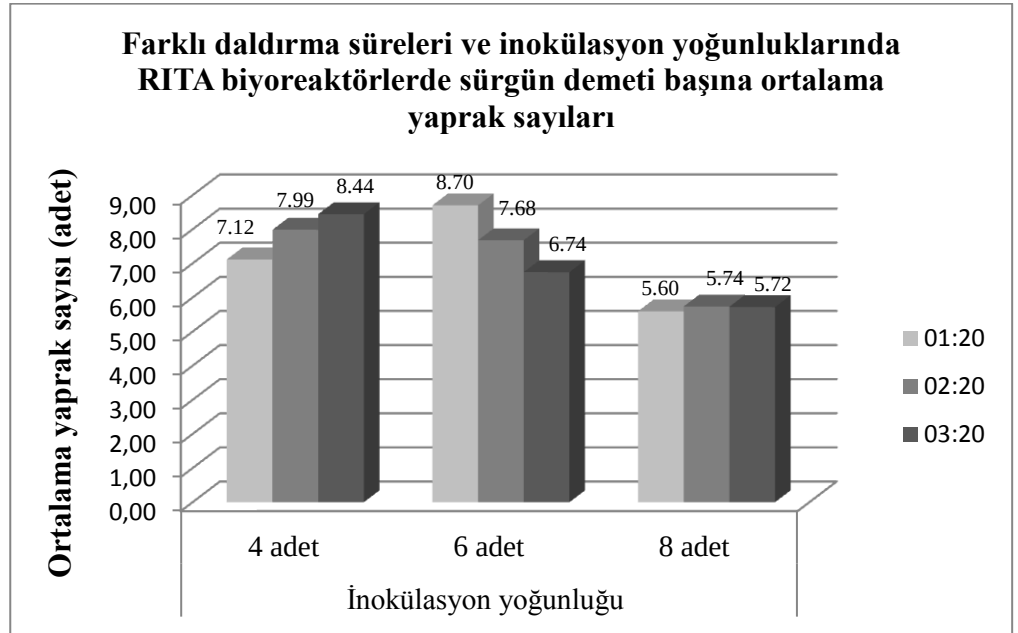
Inokülasyon yoğunluklarına göre eksplant başına ortalama yaprak sayıları incelendiğinde tüm daldırma sürelerinde düşük inokülasyon yoğunluğunda (4 adet eksplant) ortalama yaprak sayıları 7.85 adet iken, yüksek inokülasyon yoğunluğunda (8 adet eksplant) 5.68 adete düşmüştür. Daldırma süreleri açısından değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama yaprak sayısı (7.14 adet) saatte 20 sn daldırma yapılan denemelerde, en düşük ortalama yaprak sayısı (6.97 adet) ise 3 saatte 20 sn daldırma yapılan uygulamalarda gözlenmiştir. İkili interaksiyon

açısından bakıldığında, en yüksek ortalama yaprak sayısı (8.70 adet) 6 adet eksplantın kullanıldığı ve saatte 20 sn daldırma sıklığının uygulandığı çalışmadan elde edilmiştir (Çizelge 4.32; Çizelge 4.33; Çizelge 4.34 ve Şekil 4.31).

Çizelge 4.32 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen sürgün demeti başına ortalama yaprak sayıları (adet)*

Daldırma Süreleri	Sürgün demeti başına ortalama yaprak sayısı (adet)											
	4 adet eksplant				6 adet eksplant				8 adet eksplant			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
01:20	6.66	5.75	8.95	7.12	9.51	8.53	8.07	8.70	5.62	5.62	5.55	5.60
02:20	7.36	7.68	8.93	7.99	6.92	6.48	9.64	7.68	5.71	5.63	5.87	5.74
03:20	8.96	7.70	8.67	8.44	6.37	6.49	7.36	6.74	5.75	5.71	5.70	5.72

* Eksplant sayısı tekerrür başına 24 adettir.



Şekil 4.30 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen sürgün demeti başına ortalama yaprak sayıları (adet)

Çizelge 4.33 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde elde edilen Myrobolan B sürgün demetlerinin ortalama yaprak sayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
İnokülasyon Yoğunluğu	2	26.427	13.213	15.602**	3.550	6.010
Daldırma Süresi	2	0.173	0.087	0.102ns	3.550	6.010
İ. Yoğ.* D. Sür.	4	8.361	2.090	2.468ns	2.930	4.580
Hata	18	15.244	0.847			
Genel	26	50.205	1.931			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi

ns= α :önemsiz

Çizelge 4.34 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B sürgün demetlerinin ortalama yaprak sayıları ile ilgili LSD gruplandırması*

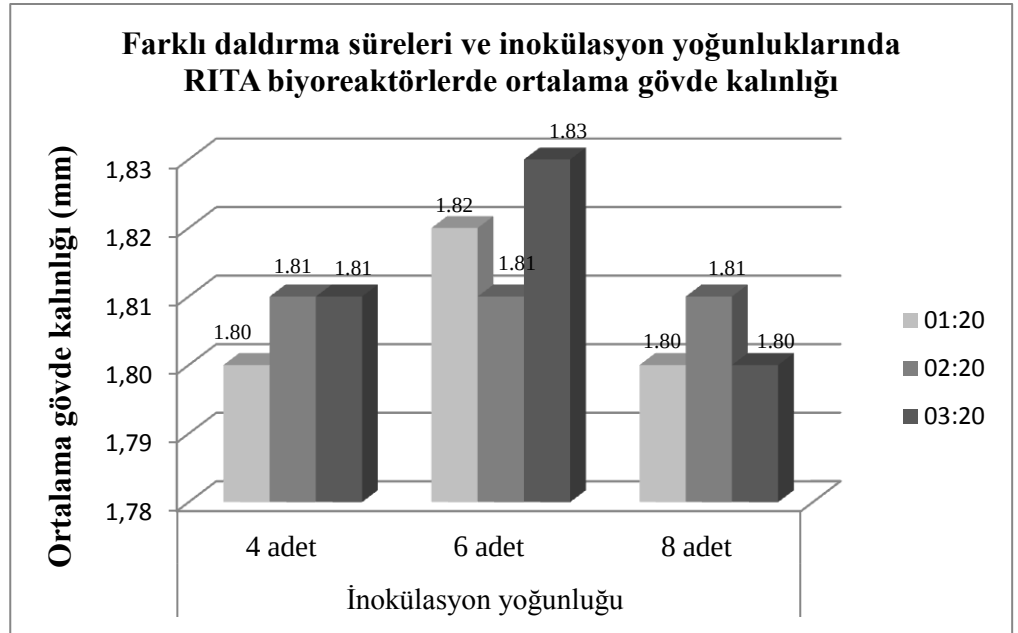
Daldırma süreleri	Sürgün demeti başına ortalama yaprak sayıları (adet)			
	4 adet eksplant	6 adet eksplant	8 adet eksplant	İnokülasyon yoğ. ort.
01:20	7.118	8.703	5.596	7.139
02:20	7.988	7.679	5.737	7.135
03:20	8.443	6.744	5.720	6.969
Daldırma sürelerinin ort.	7.850 a	7.709 a	5.685 b	
*İnokülasyon yoğunluğu için HKO değeri 0.847; LSD değeri 0.868'dir.				

İnokülasyon yoğunlukları, daldırma süreleri ve ikili interaksiyon açısından gövde kalınlıklarının istatistiki olarak önemli olmadığı saptanmış olmakla birlikte en fazla ortalama gövde kalınlığı (1.83 mm) 6 adet eksplantın kullanıldığı ve 3 saatte 20 sn daldırma sıklığının uygulandığı çalışmadan elde edilmiştir (Çizelge 4.35. Şekil 4.31).

Çizelge 4.35 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama gövde kalınlıkları (mm)*

Daldırma Süreleri	Ortalama gövde kalınlığı (mm)											
	4 adet eksplant				6 adet eksplant				8 adet eksplant			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
01:20	1.63	1.82	1.96	1.80	1.81	1.79	1.86	1.82	1.63	1.86	1.91	1.80
02:20	1.76	1.85	1.83	1.81	1.95	1.66	1.83	1.81	1.98	1.83	1.62	1.81
03:20	1.78	1.71	1.93	1.81	1.84	1.89	1.75	1.83	1.93	1.68	1.79	1.80

* Eksplant sayısı tekerrür başına 24 adettir.



Şekil 4.31 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama gövde kalınlıkları (mm)

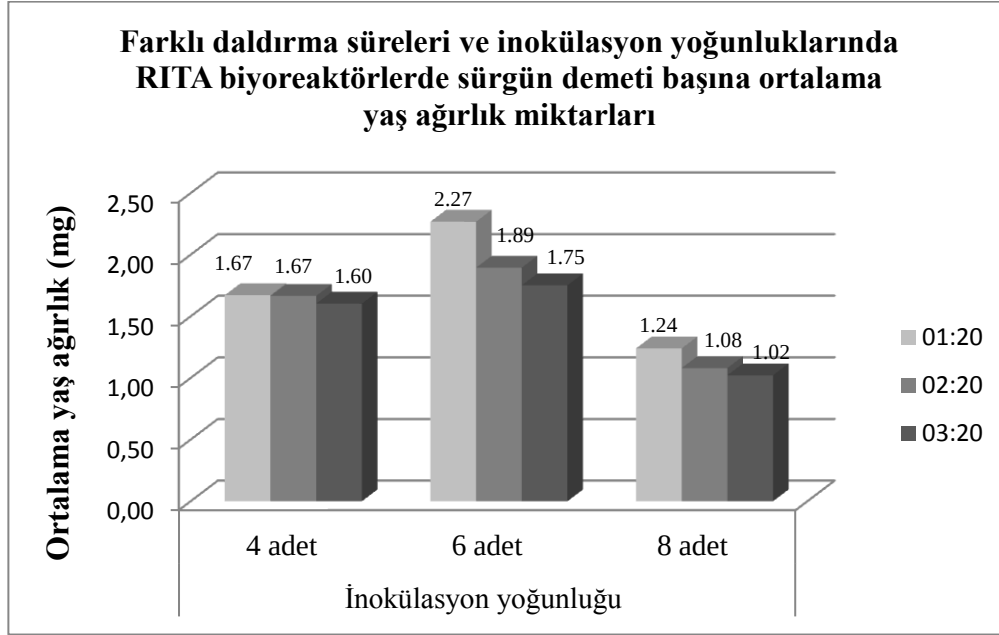
İnokülasyon yoğunluklarına göre yaş ağırlık miktarları incelendiğinde, tüm daldırma sürelerinde düşük inokülasyon yoğunluğunda (4 adet eksplant) ortalama yaş ağırlık 1.647 mg iken, yüksek inokülasyon yoğunluğunda (8 adet eksplant) 1.114 mg'a düşmüştür. Daldırma süreleri açısından değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama yaş ağırlık (1.727 mg) saatte 20 sn daldırma yapılan denemelerde, en düşük ortalama yaş (1.459 mg) ise 3 saatte 20 sn daldırma yapılan uygulamalarda gözlenmiştir. İkili interaksiyon açısından bakıldığında, en

yüksek ortalama yaş ağırlık (2.268 mg) 6 adet eksplantın kullanıldığı ve saatte 20 sn daldırma sıklığının uygulandığı çalışmadan elde edilmiştir (Çizelge 4.36; Çizelge 4.37; Çizelge 4.38 ve Şekil 4.32).

Çizelge 4.36 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları (mg)*

Daldırma Süreleri	Ortalama yaş ağırlık miktarı (mg)											
	4 adet eksplant				6 adet eksplant				8 adet eksplant			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
01:20	1.672	1.682	1.663	1.672	2.259	2.125	2.421	2.268	1.274	1.231	1.215	1.240
02:20	1.752	1.633	1.612	1.666	1.933	1.853	1.900	1.895	1.077	1.069	1.096	1.081
03:20	1.596	1.612	1.601	1.603	1.762	1.796	1.698	1.752	1.025	0.987	1.054	1.022

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



Şekil 4.31 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları (mg)

Çizelge 4.37 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
İnokülasyon Yoğunluğu	2	3.369	1.685	442.829**	3.550	6.010
Daldırma Süresi	2	0.338	0.169	44.489**	3.550	6.010
İ. Yoğ.* D. Sür.	4	0.175	0.044	11.479**	2.930	4.580
Hata	18	0.068	0.004			
Genel	26	3.951	0.152			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi

ns= α :önemsiz

Çizelge 4.38 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları ile ilgili LSD gruplandırması*

Daldırma süreleri	Ortalama yaş ağırlık miktarı (mg)							
	4 adet	Gruplar	6 adet	Gruplar	8 adet	Gruplar	İnokülasyon yoğ. ort.	Gruplar
01:20	1.672	a	2.268	A	1.240	a	1.727	A
02:20	1.666	a	1.895	B	1.081	B	1.547	B
03:20	1.603	a	1.752	C	1.022	B	1.459	C
Daldırma sürelerinin ort.	1.647	b	1.972	A	1.114	C		
*İnokülasyon yoğunluğu için HKO değeri 0.004; LSD değeri 0.058'dir. *Daldırma süreleri için HKO değeri 0.004; LSD değeri 0.058'dir. *İnokülasyon yoğ.*Daldırma sür. için HKO değeri 0.004; LSD değeri 0.101'dir								

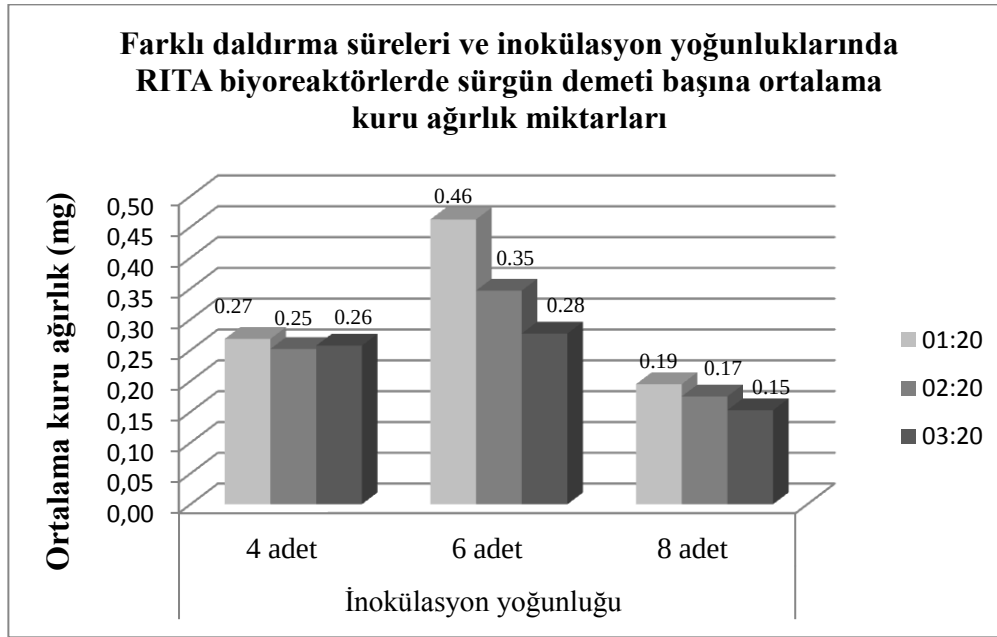
İnokülasyon yoğunluklarına göre kuru ağırlık miktarları incelendiğinde, tüm daldırma sürelerinde düşük inokülasyon yoğunluğunda (4 adet eksplant) ortalama kuru ağırlık 0.259 mg iken, yüksek inokülasyon yoğunluğunda (8 adet eksplant) 0.174 mg'a düşmüştür. Daldırma süreleri açısından değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama kuru ağırlık (0.309 mg) saatte 20 sn daldırma yapılan denemelerde, en düşük ortalama kuru ağırlık (0.229 mg) ise 3 saatte 20 sn daldırma yapılan uygulamalarda gözlenmiştir. İkili interaksiyon açısından bakıldığında, en yüksek ortalama kuru ağırlık (0.462 mg) 6 adet eksplantın

kullanıldığı ve saatte 20 sn daldırma sıklığının uygulandığı çalışmadan elde edilmiştir (Çizelge 4.39; Çizelge 4.40; Çizelge 4.41 ve Şekil 4.33).

Çizelge 4.39 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg)*

Daldırma Süreleri	Ortalama kuru ağırlık miktarı (mg)											
	4 adet eksplant				6 adet eksplant				8 adet eksplant			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
01:20	0.256	0.266	0.284	0.269	0.463	0.442	0.481	0.462	0.212	0.181	0.192	0.195
02:20	0.280	0.241	0.235	0.252	0.355	0.337	0.349	0.347	0.171	0.162	0.191	0.175
03:20	0.236	0.271	0.265	0.257	0.266	0.295	0.270	0.277	0.152	0.140	0.166	0.153

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



Şekil 4.33 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg)

Çizelge 4.40 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
İnokülasyon Yoğunluğu	2	0.159	0.080	287.076**	3.550	6.010
Daldırma Süresi	2	0.029	0.015	52.602**	3.550	6.010
İ. Yoğ.* D. Sür.	4	0.026	0.007	23.679**	2.930	4.580
Hata	18	0.005	0.000			
Genel	26	0.220	0.008			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi

ns= α :önemsiz

Çizelge 4.41 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları ile ilgili LSD gruplandırması*

Daldırma süreleri	Ortalama kuru ağırlık miktarı (mg)							
	4 adet	Gruplar	6 adet	Gruplar	8 adet	Gruplar	İnokülasyon yoğ. ort.	Gruplar
01:20	0.268	a	0.462	a	0.195	a	0.309	a
02:20	0.252	a	0.347	b	0.175	ab	0.258	B
03:20	0.257	a	0.277	c	0.153	b	0.229	C
Daldırma sürelerinin ort.	0.259	b	0.362	a	0.174	c		

*İnokülasyon yoğunluğu için HKO değeri 0.000; LSD değeri 0.016'dır.

*Daldırma süreleri için HKO değeri 0.000; LSD değeri 0.016'dır.

*İnokülasyon yoğ.*Daldırma sür. için HKO değeri 0.004; LSD değeri 0.027'dir

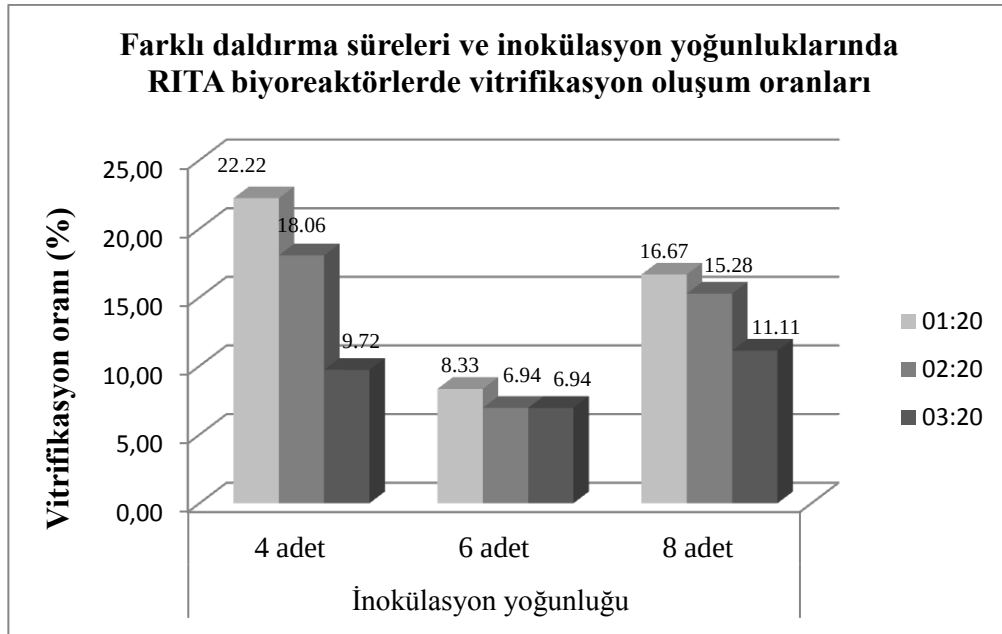
İnokülasyon yoğunluklarına göre vitrifikasyon oranları incelendiğinde, tüm daldırma sürelerinde düşük inokülasyon yoğunluğunda (4 adet eksplant) vitrifikasyon oranı %16.667 iken, yüksek inokülasyon yoğunluğunda (8 adet eksplant) %7.407'e düşmüştür. Daldırma süreleri açısından değerlendirildiğinde, en yüksek vitrifikasyon oranı (%15.741) saatte 20 sn daldırma yapılan denemelerde, en düşük vitrifikasyon oranı (%9.259) ise 3 saatte 20 sn daldırma yapılan uygulamalarda gözlenmiştir. İkili interaksiyon açısından bakıldığında, en düşük vitrifikasyon oranı (%6.94) 6 adet eksplantın kullanıldığı ve 2 saatte 20 sn

daldırma sıklığının uygulandığı çalışmadan, en yüksek vitrifikasyon oranı da 4 adet eksplantın kullanıldığı ve 1 saatte 20 sn daldırma sıklığının uygulandığı çalışmadan elde edilmiştir (Çizelge 4.42; Çizelge 4.43; Çizelge 4.44 ve Şekil 4.34).

Çizelge 4.42 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen vitrifikasyon oranları (%)*

Daldırma Süreleri	Vitrifikasyon oranı (%)											
	4 adet eksplant				6 adet eksplant				8 adet eksplant			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
01:20	25.00	20.83	20.83	22.22	12.50	8.33	4.17	8.33	8.33	25.00	16.67	16.67
02:20	16.67	20.83	16.67	18.06	8.33	4.17	8.33	6.94	20.83	12.50	12.50	15.28
03:20	8.33	8.33	12.50	9.72	4.17	4.17	12.50	6.94	12.50	12.50	8.33	11.11

* Eksplant sayısı tekerrür başına 24 adettir.



Şekil 4.34 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında 30 gün sonunda elde edilen vitrifikasyon oranları (%)

Çizelge 4.43 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
İnokülasyon Yoğunluğu	2	417.819	208.909	11.606**	3.550	6.010
Daldırma Süresi	2	194.168	97.084	5.393*	3.550	6.010
İ. Yoğ.* D. Sür.	4	102.940	25.735	1.430ns	2.930	4.580
Hata	18	324.009	18.001			
Genel	26	1038.936	39.959			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

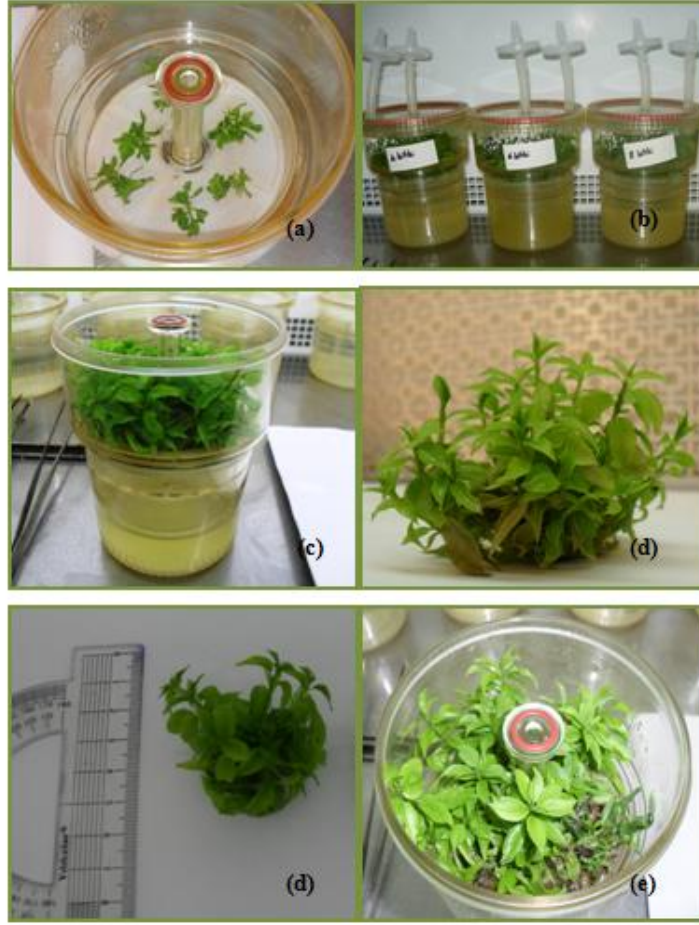
**= α :0.01 önemlilik düzeyi

ns= α :önemsiz

Çizelge 4.44 RITA biyoreaktörlerde inokülasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları ile ilgili LSD gruplandırması*

Daldırma süreleri	Vitrifikasyon oranı (%)			
	4 adet eksplant	6 adet eksplant	8 adet eksplant	İnokülasyon yoğ. ort.
01:20	22.222	8.333	16.667	15.741 a
02:20	18.056	6.944	15.278	13.426 ab
03:20	9.722	6.944	11.111	9.259 b
Daldırma sürelerinin ort.	16.667 a	7.407 b	14.352 a	
*İnokülasyon yoğunluğu için HKO değeri 18.001; LSD değeri 4.000'dir.				
*Daldırma süreleri için HKO değeri 18.001; LSD değeri 4.202'dir.				

RITA biyoreaktörlerinde inokülasyon yoğunlukları ve daldırma sürelerinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde, ölçülen üretim parametreleri açısından 1:20 daldırma süresi ile 6 adet eksplant inokülasyon yoğunluğunun optimum çalışma koşulları olduğu belirlenmiştir. Optimum koşullarda yüksek çoğaltma katsayıları ile çok sayıda kaliteli mikrosürgünlerin çoğaltımı sağlanmıştır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 (a) RITA biyoreaktörlerde kültüre alınan 6 adet 2-3 sürgünlü eksplant, (b) Farklı inokülasyon yoğunluklarında eksplantlar içeren RITA biyoreaktör tankları (c) 6 adet inokülasyon yoğunluğu içeren saatte 20 sn daldırma süresi uygulanan RITA biyoreaktör , (d) Biyoreaktörden hasat edilen Myrobolan B çoklu sürgün demeti ve (e) Hasat edilen çoklu sürgün demetinde boy durumu, (f) 8 adet eksplant içeren ve saatte 20 sn daldırma sıklığı uygulanan RITA biyoreaktörlerde vitrifikasyon ve morfofizyolojik bozukluk oluşumları

4.4.2 RITA biyoreaktörlerinde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu

RITA biyoreaktörlerinde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan çalışmalarda, besin ortamı olarak daha önceki çalışmalarda sıvı kültürler için optimum olarak belirlenen, 30 g/l süktroz, 0.7 mg/l BAP ve 0.01 mg/l NAA içeren içeren 250 ml sıvı MS besin ortamı (M19), inokülasyon yoğunluğu olarak 6 adet eksplant ve daldırma süresi olarak saatte 20

sn kullanılmıştır. Altkültür süresi olarak 40, 50 ve 60 gün, besin ortamı miktarı olarak 250, 300, 350 ml sıvı besin ortamının uygulandığı denemelerde *in vitro* sürgün eksplantlarından elde edilen çoğaltma katsayıları, toplam sürgün sayıları (adet), eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet), ortalama sürgün boyları (cm), ortalama yaprak sayıları (adet), ortalama gövde kalınlıkları (mm), ortalama yaş ağırlık (mg), ortalama kuru ağırlık (mg), toplam vitrifiye olan eksplant sayıları (adet) ve vitrifikasyon oranları (%) verileri incelenmiştir.

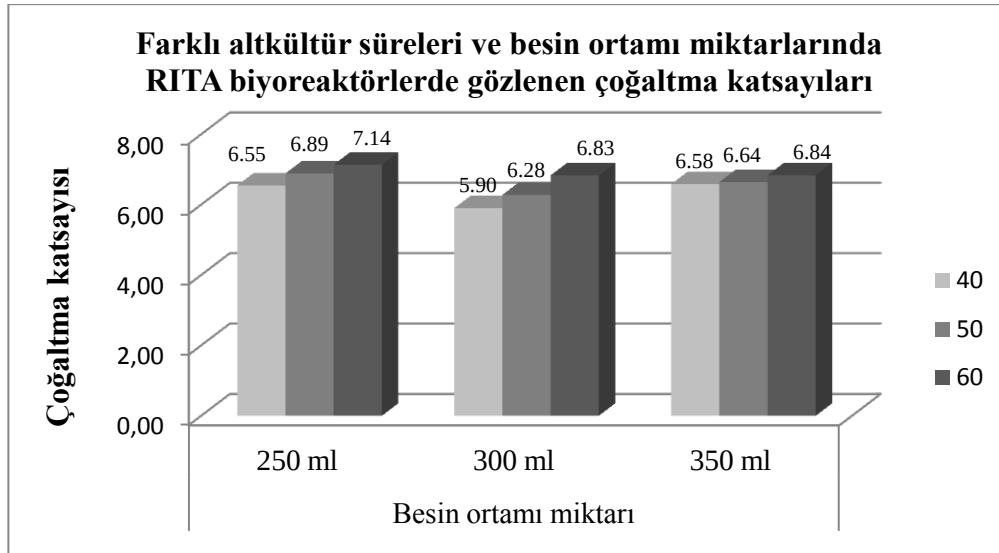
İstatistiki değerlendirmeye göre, besin ortamı miktarı vitrifikasyon oranı için %5 seviyesinde önemli, diğer tüm parametreler için önemsiz, altkültür süresi vitrifikasyon oranı için %5 seviyesinde önemli, diğer tüm parametreler için önemsiz ve besin ortamı miktarı*alkültür süresi interaksyonu, ölçülen tüm büyüme parametreleri için önemsiz bulunmuştur.

Besin ortamı miktarları, altkültür süreleri ve ikili interaksiyon açısından çoğaltma katsayılarının istatistiki olarak önemli olmadığı saptanmış olmakla birlikte en fazla çoğaltma katsayısı (7.14) 250 ml besin ortamının kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde 60 günlük altkültür süresinin sonunda, en düşük çoğaltma katsayısı (5.9) 300 ml besin ortamının kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde 40 günlük altkültür süresinin sonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.45. Şekil 4.36).

Çizelge 4.45 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında* elde edilen çoğaltma katsayıları

Altkültür süresi (gün)	Çoğaltma katsayısı											
	250 ml besin ortamı				300 ml besin ortamı				350 ml besin ortamı			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
40	6.46	7.53	5.65	6.55	6.29	6.28	5.13	5.90	6.73	7.65	5.37	6.58
50	6.95	6.25	7.47	6.89	4.16	6.27	8.41	6.28	6.27	5.77	7.89	6.64
60	6.38	6.47	8.56	7.14	7.69	6.58	6.23	6.83	8.49	6.23	5.79	6.84

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



Şekil 4.36 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarından elde edilen çoğaltma katsayıları

Toplam sürgün sayıları ve eksplant başına sürgün sayısı incelendiğinde, en yüksek toplam sürgün sayıları ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı (1029 ve 14.29 adet) 250 ml besin ortamının kullanıldığı biyoreaktörlerde 60 günlük altkültür süresinin sonunda, en düşük toplam sürgün sayıları ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı (851 ve 11.82 adet) 300 ml besin ortamının kullanıldığı biyoreaktörlerde 40 günlük altkültür süresinin sonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.46; Çizelge 4.47; Şekil 4.37 ve Şekil 4.38).

Çizelge 4.46 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)*

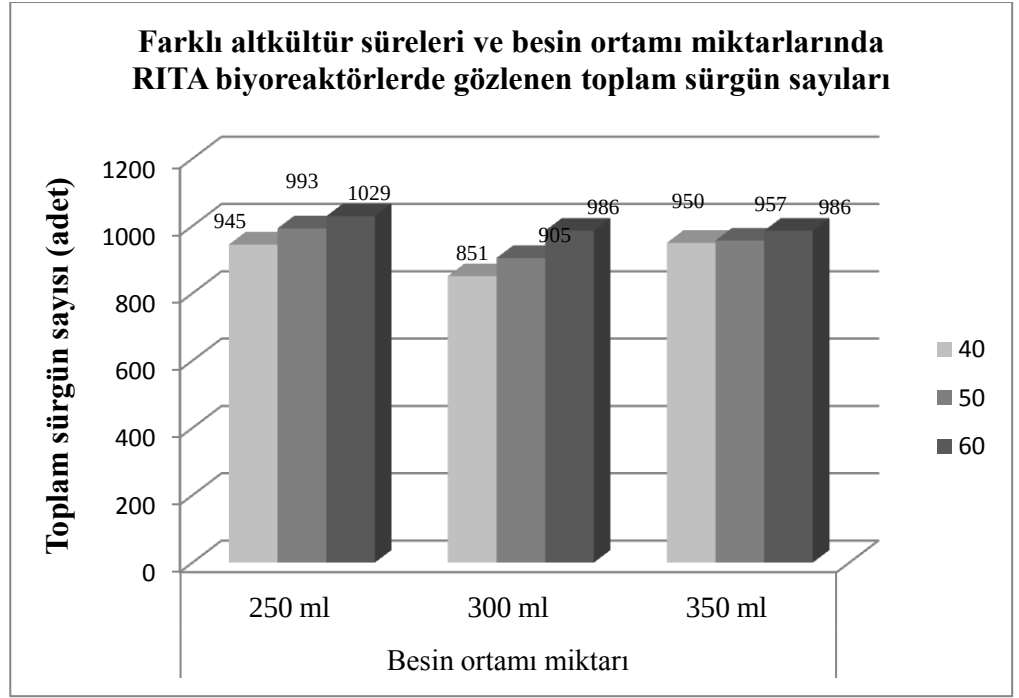
Altkültür süresi (gün)	Besin ortamı miktarları											
	250 ml besin ortamı				300 ml besin ortamı				350 ml besin ortamı			
	T1	T2	T3	Top.	T1	T2	T3	Top.	T1	T2	T3	Top.
40	311	362	272	945	302	302	247	851	324	368	258	950
50	334	300	359	993	200	301	404	905	301	277	379	957
60	307	311	411	1029	370	316	300	986	408	300	278	986

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.

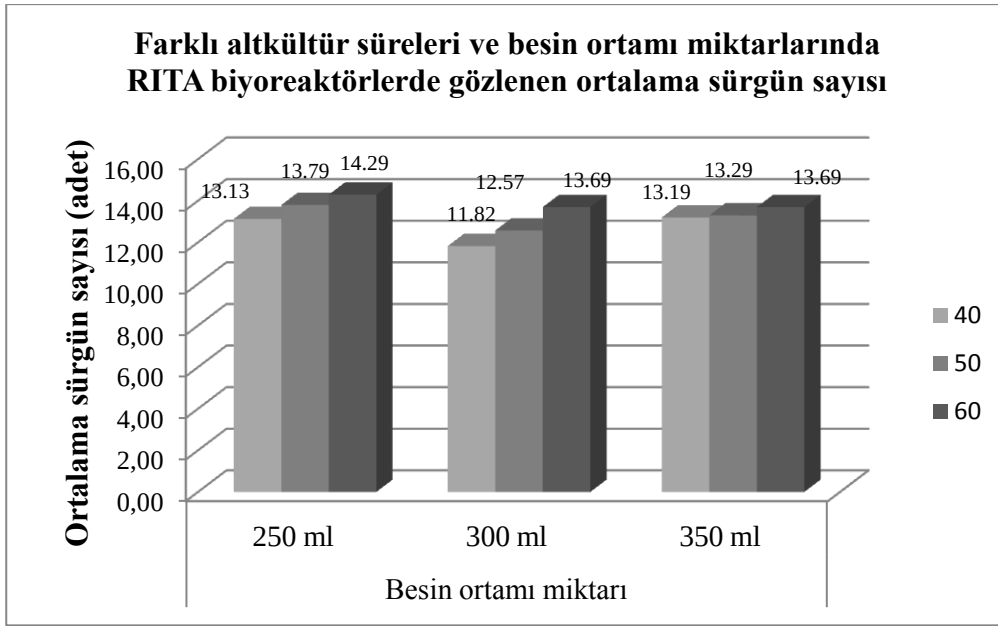
Çizelge 4.47 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)*

Altkültür süresi (gün)	Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)											
	250 ml besin ortamı				300 ml besin ortamı				350 ml besin ortamı			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
40	12.96	15.08	11.33	13.13	12.58	12.58	10.29	11.82	13.50	15.33	10.75	13.19
50	13.92	12.50	14.96	13.79	8.33	12.54	16.83	12.57	12.54	11.54	15.79	13.29
60	12.79	12.96	17.13	14.29	15.42	13.17	12.50	13.69	17.00	12.50	11.58	13.69

* Eksplant sayısı tekerrür başına 24 adettir.



Şekil 4.37 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)



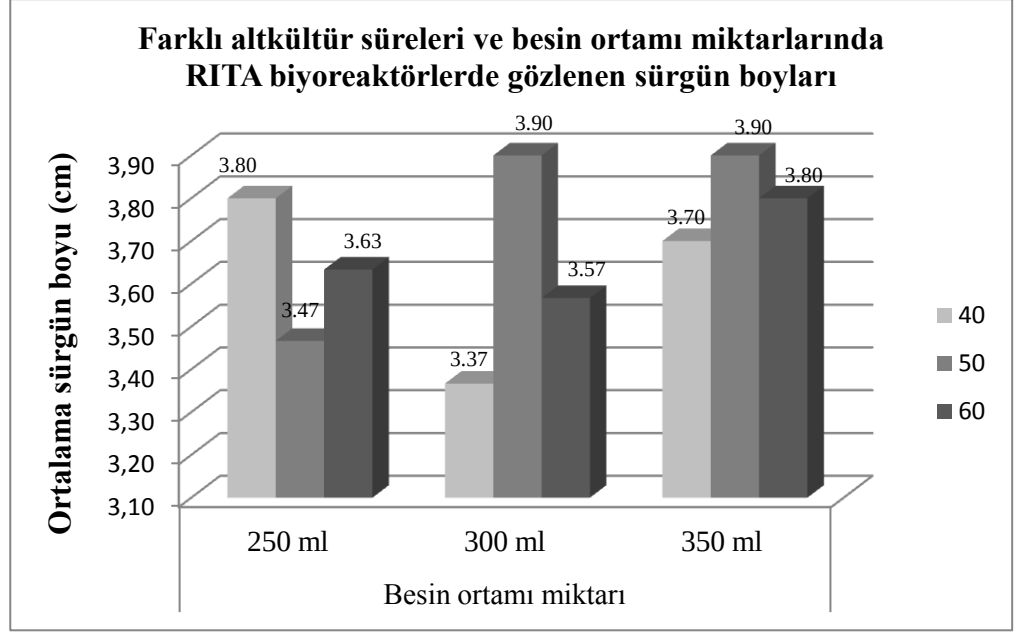
Şekil 4.38 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları (adet)

Besin ortamı miktarları, altkültür süreleri ve ikili interaksiyon açısından sürgün boylarının da istatistiki olarak önemli olmadığı saptanmış olmakla birlikte, en fazla ortalama sürgün boyu (3.90 cm) 300 ve 350 ml besin ortamlarının kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde 50 günlük altkültür süresinin sonunda, en düşük ortalama sürgün boyu (3.37 cm) 300 ml besin ortamının kullanıldığı denemelerde 40 günlük altkültür süresinin sonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.48. Şekil 4.39).

Çizelge 4.48 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama sürgün boyları (cm)*

Altkültür süresi (gün)	Ortalama sürgün boyları (cm)											
	250 ml besin ortamı				300 ml besin ortamı				350 ml besin ortamı			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
40	3.30	4.40	3.70	3.80	4.20	3.30	2.60	3.37	4.20	3.50	3.40	3.70
50	3.40	4.10	2.90	3.47	3.30	4.50	3.90	3.90	4.50	3.30	3.90	3.90
60	4.30	3.80	2.80	3.63	3.40	4.30	3.00	3.57	3.20	4.30	3.90	3.80

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



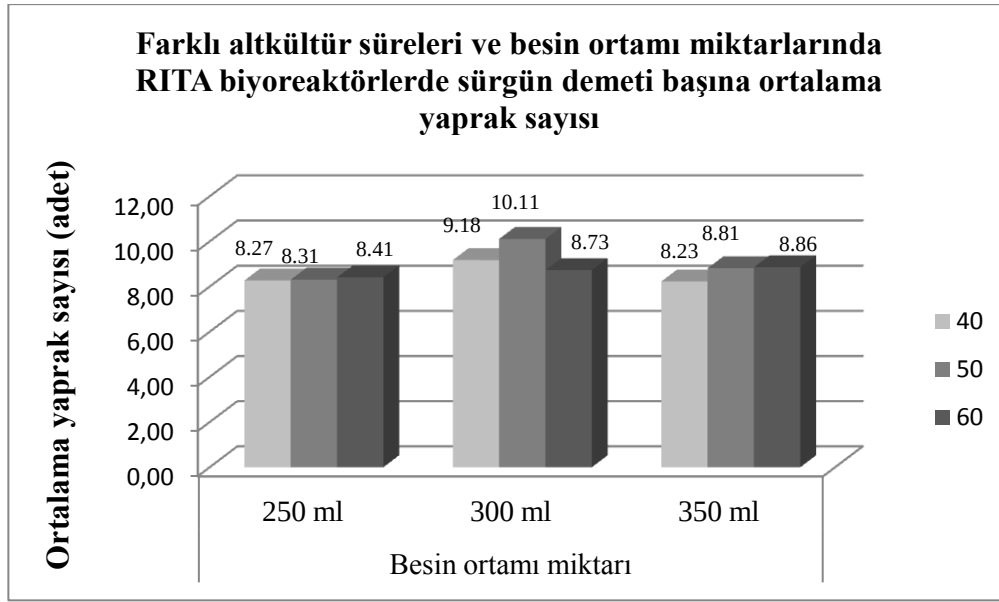
Şekil 4.39 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama sürgün boyları (cm)

Besin ortamı miktarları ve altkültür sürelerinin optimizasyonu denemelerinde en fazla ortalama yaprak sayısı (10.11 adet) 300 ml besin ortamının kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde 50 günlük altkültür süresinin sonunda, en düşük ortalama yaprak sayısı (8.23 adet) 350 ml besin ortamının kullanıldığı denemelerde 40 günlük altkültür süresinin sonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.49. Şekil 4.40).

Çizelge 4.49 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama yaprak sayıları (adet)*

Altkültür Süresi (gün)	Ortalama yaprak sayıları (adet)											
	250 ml besin ortamı				300 ml besin ortamı				350 ml besin ortamı			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
40	8.13	7.10	9.58	8.27	7.43	10.08	10.02	9.18	8.10	7.82	8.76	8.23
50	8.12	7.42	9.38	8.31	15.05	8.33	6.96	10.11	10.12	8.56	7.76	8.81
60	9.16	9.12	6.94	8.41	7.07	9.05	10.07	8.73	6.95	10.11	9.52	8.86

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



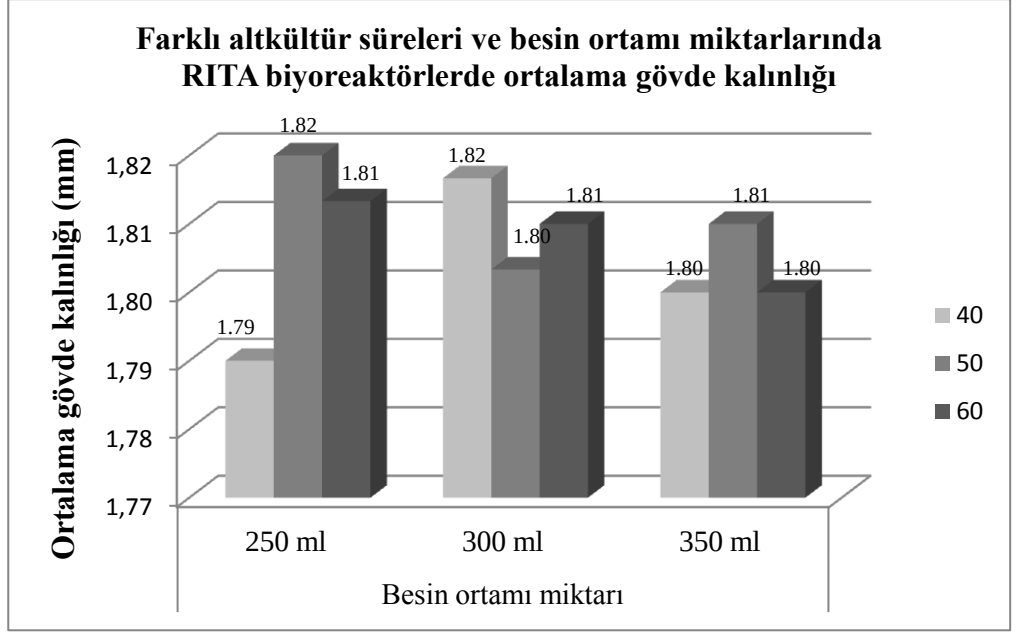
Şekil 4.40 RITA biyoreaktörlerde altkültür süreleri ve besin ortamı miktarlarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen sürgün demeti başına ortalama yaprak sayıları (adet)

Farklı altkültür süreleri ve besin ortamı miktarlarının gövde kalınlıklarına etkisi incelendiğinde, en fazla ortalama gövde kalınlığı (1.82 mm) 300 ml besin ortamının kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde 50 günlük altkültür süresinin sonunda ve 250 ml besin ortamının kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde 40 günlük altkültür süresinin sonunda elde edilmiştir. En düşük ortalama gövde kalınlığı (1.79 mm) ise 250 ml besin ortamının kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde 40 günlük altkültür süresinin uygulandığı denemelerden elde edilmiştir (Çizelge 4.50. Şekil 4.41).

Çizelge 4.50 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama gövde kalınlıkları (mm)*

Altkültür süresi (gün)	Besin ortamı miktarları											
	250 ml				300 ml				350 ml			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
40	1.72	1.69	1.96	1.79	1.95	1.87	1.63	1.82	1.63	1.86	1.91	1.80
50	1.87	1.74	1.85	1.82	1.79	1.67	1.95	1.80	1.98	1.83	1.62	1.81
60	1.73	1.92	1.79	1.81	1.73	1.91	1.79	1.81	1.93	1.68	1.79	1.80

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



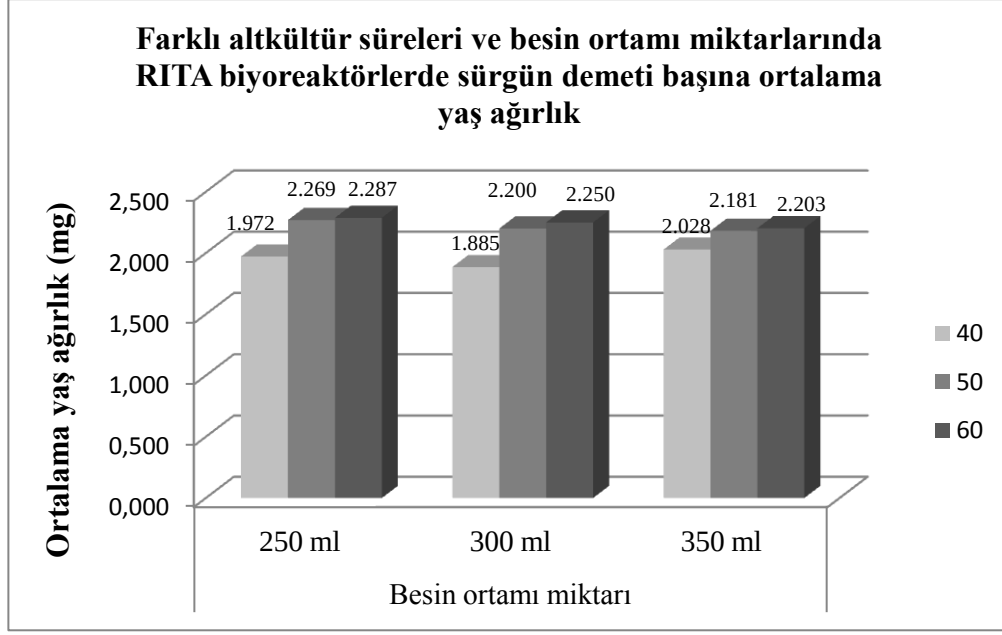
Şekil 4.41 RITA biyoreaktörlerde altkültür süresi ve besin ortamı miktarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama gövde kalınlıkları

Altkültür süresi ve besin ortamı miktarına göre yaş ağırlık miktarları incelendiğinde, en yüksek ortalama yaş ağırlık miktarı (1.885 mg), 300 ml besin ortamının kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde 40 günlük altkültür süresinin sonunda, en düşük ortalama yaş ağırlık miktarı (2.269 mg) ise 250 ml besin ortamının kullanıldığı denemelerde 50 günlük altkültür süresinin sonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.51; Şekil 4.42).

Çizelge 4.51 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları (mg)*

Altkültür süresi (gün)	Ortalama yaş ağırlık miktarı (mg)											
	250 ml besin ortamı				300 ml besin ortamı				350 ml besin ortamı			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
40	1.976	2.192	1.747	1.972	2.036	2.056	1.562	1.885	2.126	2.342	1.615	2.028
50	2.470	1.750	2.588	2.269	2.024	2.215	2.361	2.200	2.162	1.539	2.843	2.181
60	2.047	2.228	2.587	2.287	2.293	2.276	2.182	2.250	2.702	2.095	1.811	2.203

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



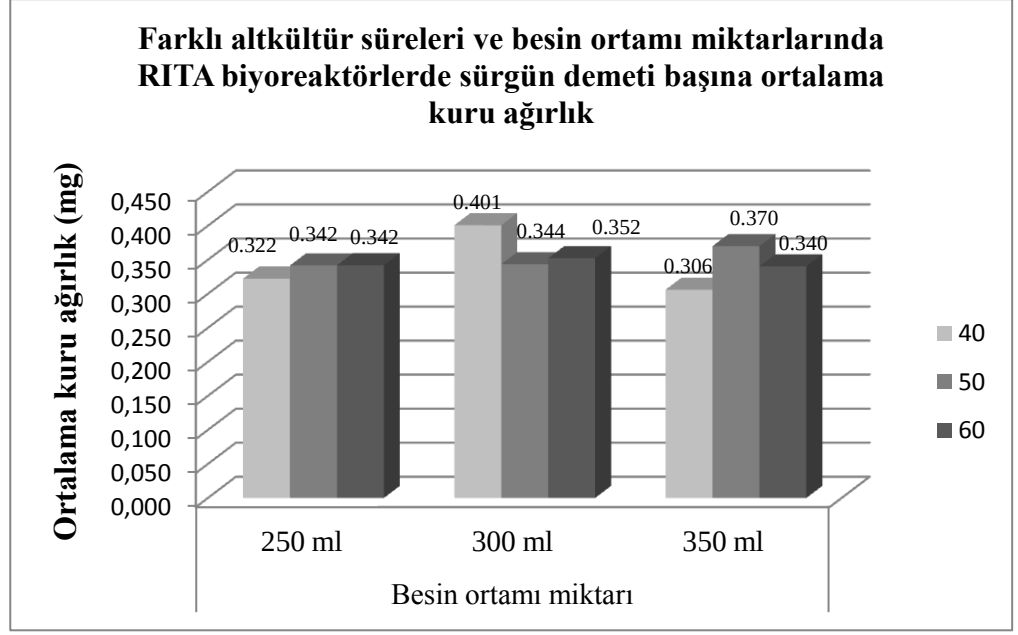
Şekil 4.42 RITA biyoreaktörlerde altkültür süresi ve besin ortamı miktarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama yaş ağırlık miktarları (mg)

Altkültür süresi ve besin ortamı miktarına göre kuru ağırlık miktarları incelendiğinde, en yüksek ortalama kuru ağırlık miktarı (0.401 mg), 300 ml besin ortamının kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde 40 günlük altkültür süresinin sonunda, en düşük ortalama yaş ağırlık miktarı (0.306 mg) ise 350 ml besin ortamının kullanıldığı denemelerde 40 günlük altkültür süresinin sonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.52; Şekil 4.43).

Çizelge 4.52 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg)*

Altkültür süresi (gün)	Ortalama kuru ağırlık miktarı (mg)											
	250 ml besin ortamı				300 ml besin ortamı				350 ml besin ortamı			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
40	0.360	0.275	0.331	0.322	0.335	0.426	0.441	0.401	0.344	0.346	0.228	0.306
50	0.415	0.257	0.353	0.342	0.389	0.350	0.292	0.344	0.387	0.230	0.494	0.370
60	0.305	0.377	0.344	0.342	0.338	0.351	0.368	0.352	0.438	0.299	0.285	0.340

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



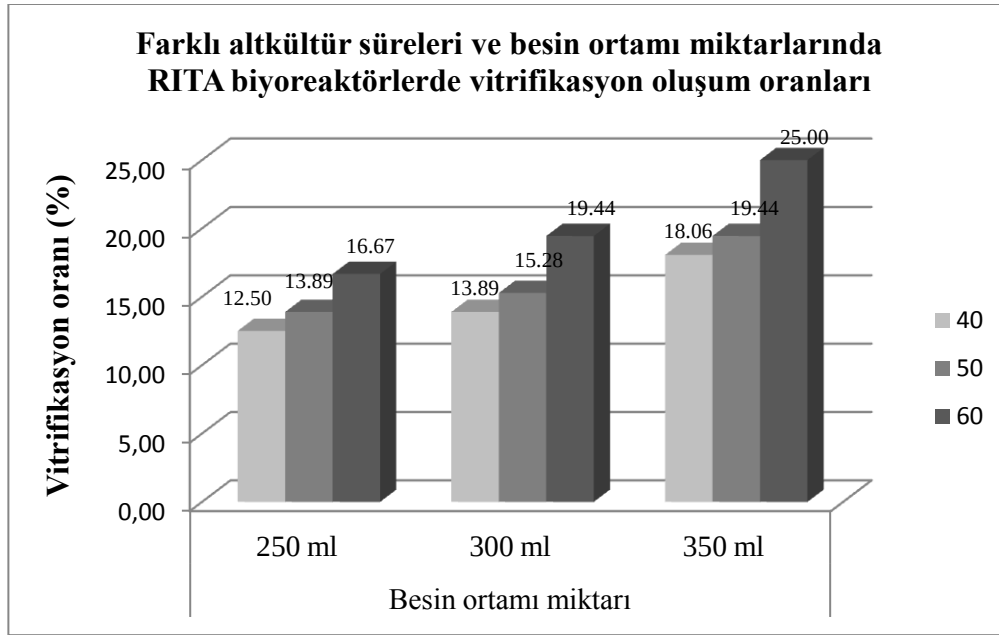
Şekil 4.43 RITA biyoreaktörlerde altkültür süresi ve besin ortamı miktarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg)

Besin ortamı miktarlarına göre vitrifikasyon oranları incelendiğinde, tüm altkültür sürelerinde en yüksek ortalama vitrifikasyon oranı (%20.83) 350 ml besin ortamının kullanıldığı denemelerde, en düşük ortalama vitrifikasyon oranı (%14.35) 250 ml besin ortamının kullanıldığı denemelerde gözlenmiştir. Alt kültür süreleri açısından değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama vitrifikasyon oranı (%20.37) 60 günlük altkültür sürelerinin sonunda en düşük vitrifikasyon oranı (%14.82) ise 40 günlük altkültür sürelerinin sonunda elde edilmiştir. İkili interaksiyon açısından bakıldığında, en düşük vitrifikasyon oranı (%12.5) 250 ml besin ortamının kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde 40 günlük altkültür süresinin sonunda, en yüksek vitrifikasyon oranı (%25) 350 ml besin ortamının kullanıldığı 60 günlük altkültür süresinin sonunda elde edilmiştir (Çizelge 4.53; Çizelge 4.54; Çizelge 4.55 ve Şekil 4.44).

Çizelge 4.53 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları (%)*

Altkültür süresi (gün)	Vitrifikasyon oranı (%)											
	250 ml besin ortamı				300 ml besin ortamı				350 ml besin ortamı			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
40	20.83	12.50	4.17	12.50	8.33	20.83	12.50	13.89	16.67	20.83	16.67	18.06
50	12.50	16.67	12.50	13.89	16.67	12.50	16.67	15.28	16.67	20.83	20.83	19.44
60	12.50	20.83	16.67	16.67	16.67	20.83	20.83	19.44	29.17	25.00	20.83	25.00

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



Şekil 4.44 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları (%)

Çizelge 4.54 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Besin ortamı miktarı	2	200.605	100.302	5.202*	3.550	6.010
Altkültür süresi	2	150.444	75.222	3.901*	3.550	6.010
Bes. ort.* Alt. Sür.	4	7.719	1.930	0.100ns	2.930	4.580
Hata	18	347.056	19.281			
Genel	26	705.824	27.147			

*= $\alpha:0.05$ önemlilik düzeyi

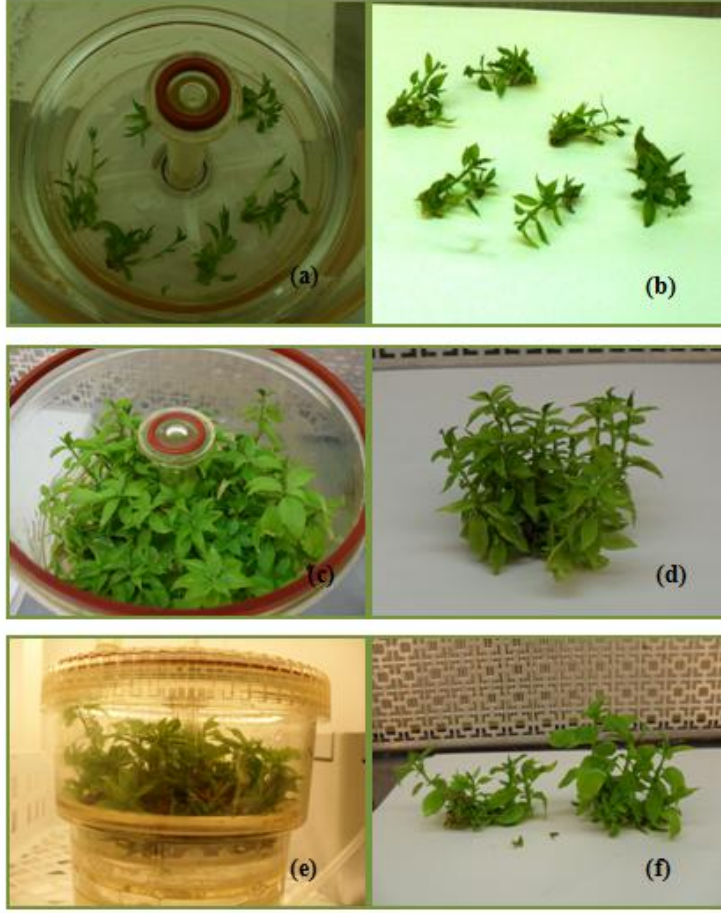
**= $\alpha:0.01$ önemlilik düzeyi

ns= α :önemsiz

Çizelge 4.55 RITA biyoreaktörlerde besin ortamı miktarı ve altkültür süresinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları ile ilgili LSD gruplandırması*

Altkültür süresi (gün)	Vitrifikasyon oranı (%)				Gruplar
	250 ml besin ortamı	300 ml besin ortamı	350 ml besin ortamı	Besin ortamı mik. ort.	
40	12.500	13.889	18.056	14.815	B
50	13.889	15.278	19.444	16.204	Ab
60	16.667	19.444	25.000	20.370	A
Altkültür süresi ort.	14.352 b	16.204 b	20.833 a		
*Altkültür süresi için HKO değeri 19.281; LSD değeri 4.349'dur. *Besin ortamı miktarı için HKO değeri 19.281; LSD değeri 4.349'dur.					

RITA biyoreaktörlerinde altkültür süresi ve besin ortamı miktarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde, ölçülen üretim parametreleri açısından 250 ml besin ortamı ile 40 günlük altkültür süresinin optimum çalışma koşulları olduğu belirlenmiştir. Optimum koşullarda yüksek çoğaltma katsayıları ile çok sayıda kaliteli mikrosürgünlerin çoğaltımı sağlanmıştır (Şekil 4.45).



Şekil 4.45 (a) ve (b) RITA biyoreaktörlerde kültüre alınan 6 adet 2-3 sürgünlü eksplant, (c) 250 ml besin ortamı içeren RITA biyoreaktörde 40 günlük altkültür süresinin sonunda mikrosürgün demetleri , (b) Biyoreaktörden hasat edilen Myrobolan B çoklu sürgün demeti (e) ve (f) 350 ml besin ortamı içeren RITA biyoreaktörlerde 60 günlük altkültür süresinin sonunda vitrifikasyon oluşumları ve morfofizyolojik bozukluklar

4.4.3 RITA biyoreaktörlerinde ışık şiddetinin optimizasyonu

Işık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan çalışmalarda, içinde 30 g/l süktroz, 0.7 mg/l BAP ve 0.01 mg/l NAA içeren 250 ml sıvı MS besin ortamı (M19) bulunan, saatte 20 sn daldırma süresi ve 6 adet eksplant inokülasyon yoğunluğu uygulanan RITA biyoreaktörler 40 gün süreyle 3000, 4000 ve 5000 lüks ışık şiddeti koşullarında kültüre alınarak çoğaltma katsayıları, toplam sürgün sayıları (adet), eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet), ortalama sürgün boyları (cm) ve vitrifikasyon oranları (%) verileri incelenmiş ve bunlara ait bilgiler Çizelge 4.56; Çizelge 4.57; Çizelge 4.58; Çizelge 4.59; Çizelge 4.60;

Çizelge 4.61; Çizelge 4.62; Şekil 4.46; Şekil 4.47; Şekil 4.48; Şekil 4.49 ve 4.50’de verilmiştir.

İstatistiki değerlendirmeye göre, ışık şiddeti ortalama sürgün boyları için önemsiz, diğer tüm parametreler için %1 seviyesinde önemli bulunmuştur. En iyi sürgün gelişimi, 5000 lüks ışık şiddetinde kültüre alınan RITA biyoreaktörlerden hasat edilen bitkiciklerde gözlenmiştir. Vitrifikasyon oluşum durumlarına bakıldığında ise en yüksek vitrifikasyon oranı (%30.56) 5000 lüks ışık şiddetinde, en düşük vitrifikasyon oluşumu (%13.89) 3000 lüks ışık şiddetinde kültüre alınan RITA biyoreaktörlerde elde edilmiştir (Şekil 4.51).

Çizelge 4.56 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama çoğaltma katsayıları*

Işık şiddeti (lüks)	In vitro sürgün eksplantlarının çoğaltma katsayıları			
	T1	T2	T3	Ort.
3000	5.55	4.57	4.58	4.90 b
4000	6.12	5.81	5.93	5.95 ab
5000	7.22	7.15	6.18	6.85 a

* Eksplant sayısı tekerrür başına 24 adettir.

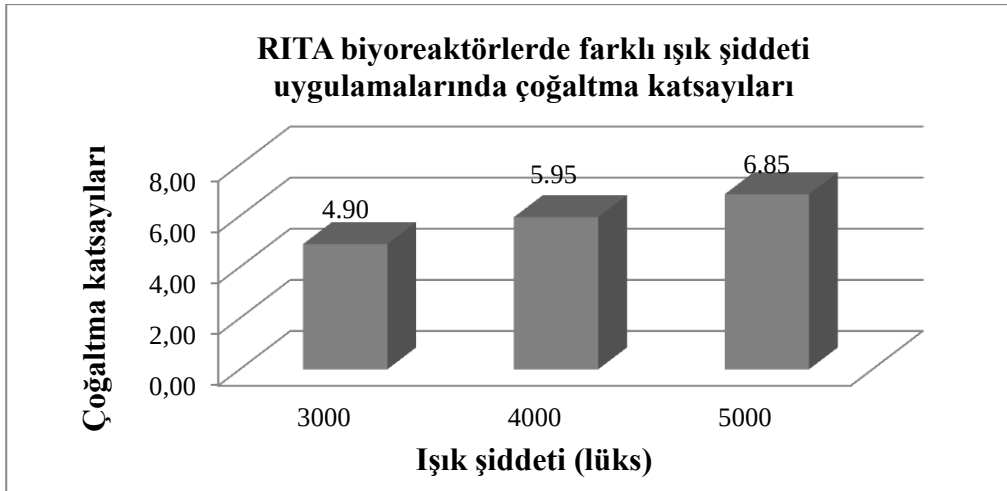
Testte kullanılan HKO değeri 0.226; LSD değeri 1.440’dır.

Çizelge 4.57 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama çoğaltma katsayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Işık şiddeti	2	5.716	2.858	12.623**	5.140	10.920
Hata	6	1.358	0.226			
Genel	8	7.074	0.884			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.46 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen ortalama çoğaltma katsayıları

Çizelge 4.58 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)* ve eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)**

Işık şiddeti (lüks)	Toplam sürgün sayıları (adet)				Eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)			
	T1	T2	T3	Top.	T1	T2	T3	Ort.
3000	267	220	220	707	11.13	9.17	9.17	9.82 b
4000	294	279	285	858	12.25	11.63	11.88	11.92 ab
5000	347	344	297	988	14.46	14.33	12.38	13.72 a

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.

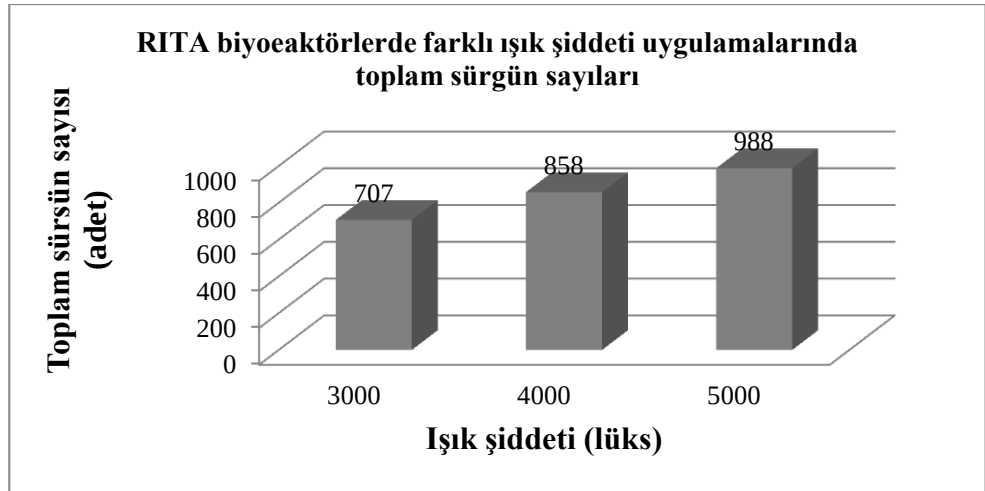
**Testte kullanılan HKO değeri 0.912 ; LSD değeri 2.890'dır.

Çizelge 4.59 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları

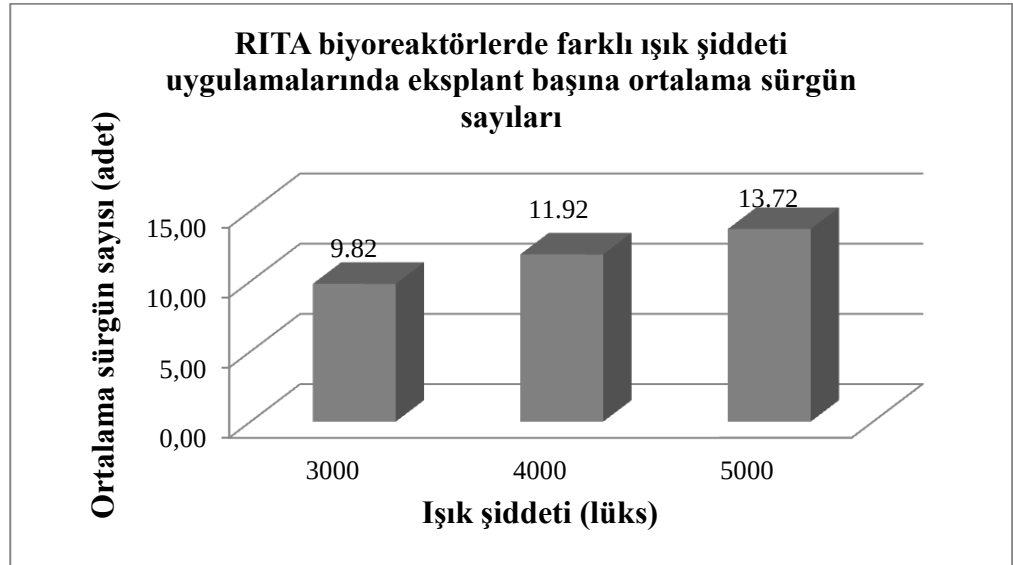
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Işık şiddeti	2	22.858	11.429	12.534**	5.140	10.920
Hata	6	5.471	0.912			
Genel	8	28.329	3.541			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.47 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam sürgün sayıları (adet)

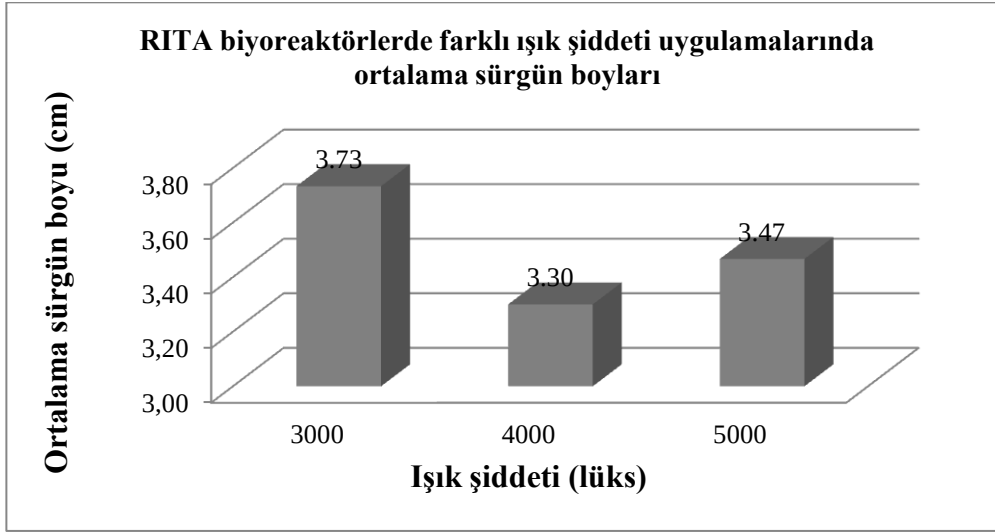


Şekil 4.48 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet)

Çizelge 4.60 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında ortalama sürgün boyları (cm)*

Işık şiddeti (lüks)	Ortalama sürgün boyları (cm)			
	T1	T2	T3	Ort.
3000	3.80	3.70	3.70	3.73
4000	3.10	3.30	3.50	3.30
5000	2.80	3.70	3.90	3.47

* Eksplant sayısı tekerrür başına 24 adettir.



Şekil 4.49 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında ortalama sürgün boyları (cm)

Çizelge 4.61 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam vitrifiye bitki sayıları (adet)* ve vitrifikasyon oranları (%)

Işık şiddeti (lüks)	Toplam vitrifiye bitki sayıları (adet)				Vitrifikasyon oranları (%)			
	T1	T2	T3	Top.	T1	T2	T3	Ort.
3000	4.00	3.00	3.00	10.00	16.67	12.50	12.50	13.89 b
4000	5.00	4.00	5.00	14.00	20.83	16.67	20.83	19.44 b
5000	7.00	8.00	7.00	22.00	29.17	33.33	29.17	30.56 a

* Eksplant sayısı tekerrür başına 24 adettir.

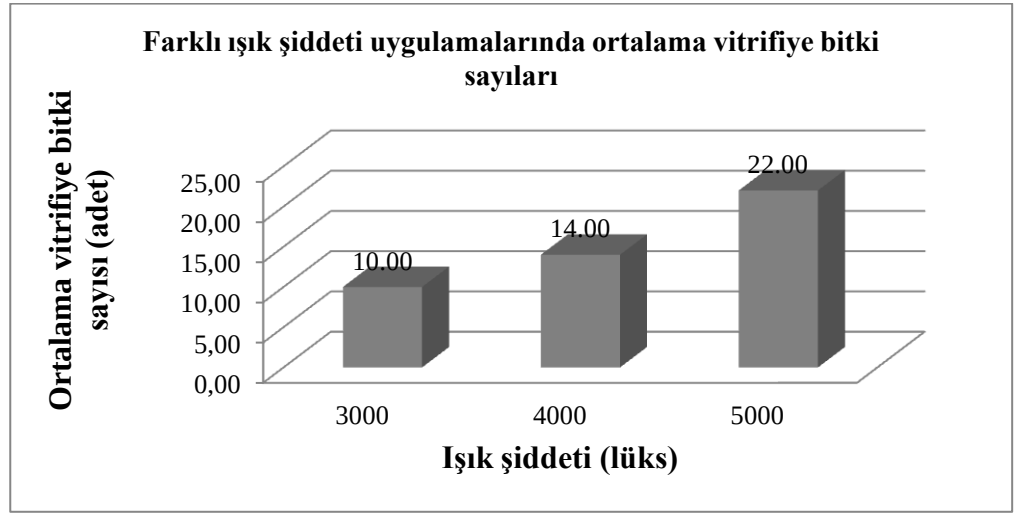
Testte kullanılan HKO değeri 5.778 ; LSD değeri 7.275'dir.

Çizelge 4.62 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen vitrifikasyon oranları ile ilgili varyans analiz sonuçları

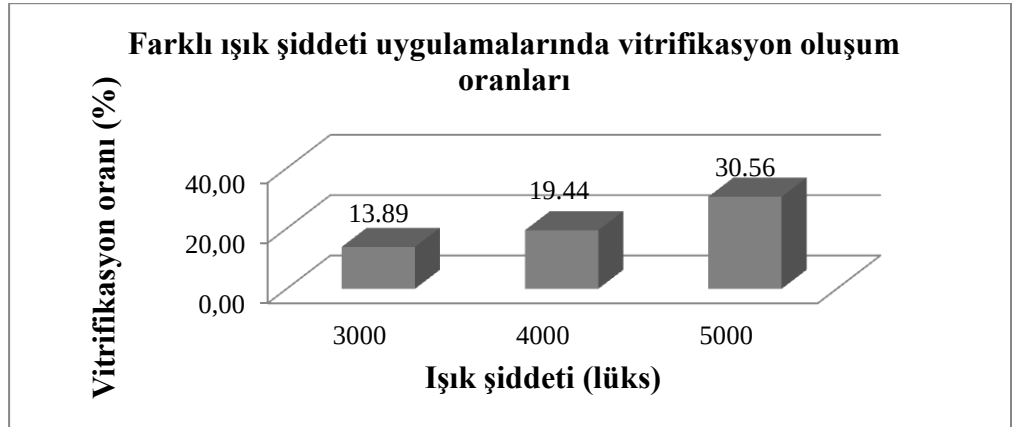
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Işık şiddeti	2	432.123	216.062	37.395**	5.140	10.920
Hata	6	34.667	5.778			
Genel	8	466.790	58.349			

*= $\alpha:0.05$ önemlilik düzeyi

**= $\alpha:0.01$ önemlilik düzeyi



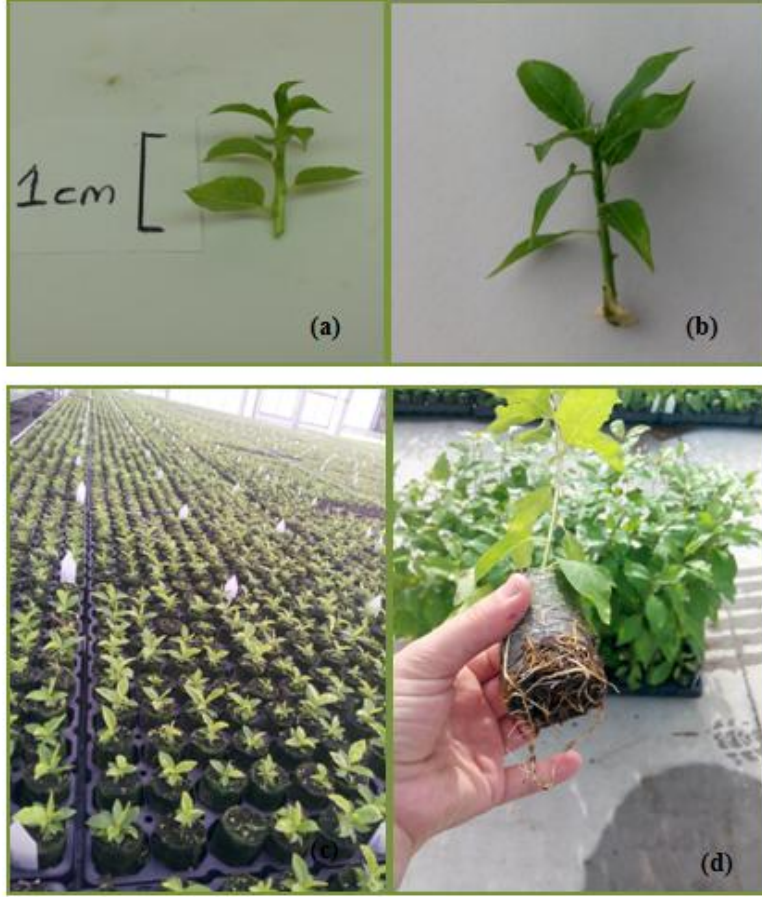
Şekil 4.50 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında elde edilen toplam vitrifiye bitki sayıları (adet)



Şekil 4.51 RITA biyoreaktörlerde ışık şiddetinin optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde Myrobolan B eksplantlarında vitrifikasyon oluşum oranları

4.4.4 RITA biyoreaktörlerden elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi ve dış koşullara adaptasyonu ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar

RITA biyoreaktörlerde mikroçoğaltım prosesinden elde edilen tekli sürgünler köklendirme için 20 g/l süktroz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş yarı katı $\frac{1}{2}$ MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. 20 gün sonunda, bitkiciklerde %91.67 oranında köklenme başarısı elde edilmiştir. Köklendirilmiş *in vitro* bitkicikler, %91.11 aklimatizasyon başarısı ile serada torf:perlite (4:1) ortamlarına alınmışlardır (Şekil 4.52).



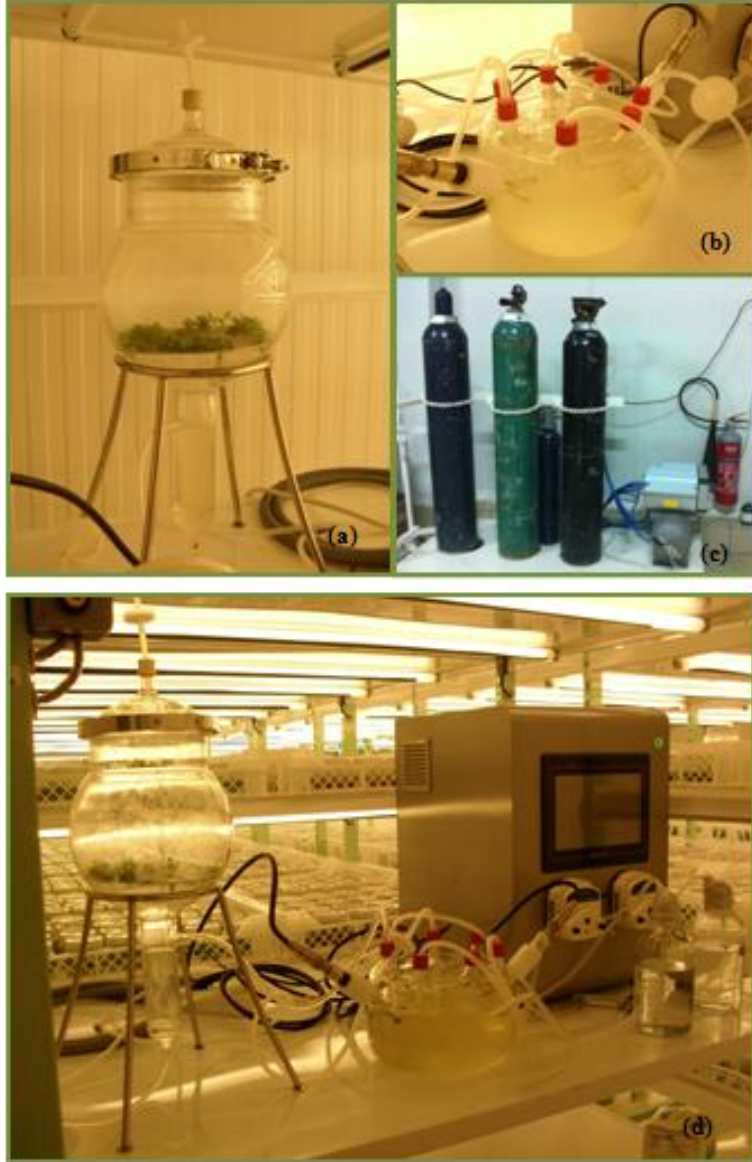
Şekil 4.52 (a) RITA biyoreaktörlerinde mikroçoğaltılan sürgün demetlerinden elde edilen tekli eksplant, (b) Yarı katı kültür koşullarında 20 günlük altkültür süresi sonunda mikrosürgünde kök oluşumu (c) Serada torf: perlite ortamına alınan bitkicikler, (d) Serada aklimatizasyonu yapılan Myrobolan B bitkisinde 40 gün sonunda kök ve yaprak gelişimi

4.5 5 L Balon Tip Geçici Daldırma Biyoreaktörlerde Myrobolan B Bitkiciklerinin Mikroçoğaltımı ve Mikroçoğaltılan Bitkiciklerin Aklimatizasyonu ile İlgili Uygulamalardan Elde Edilen Sonuçlar

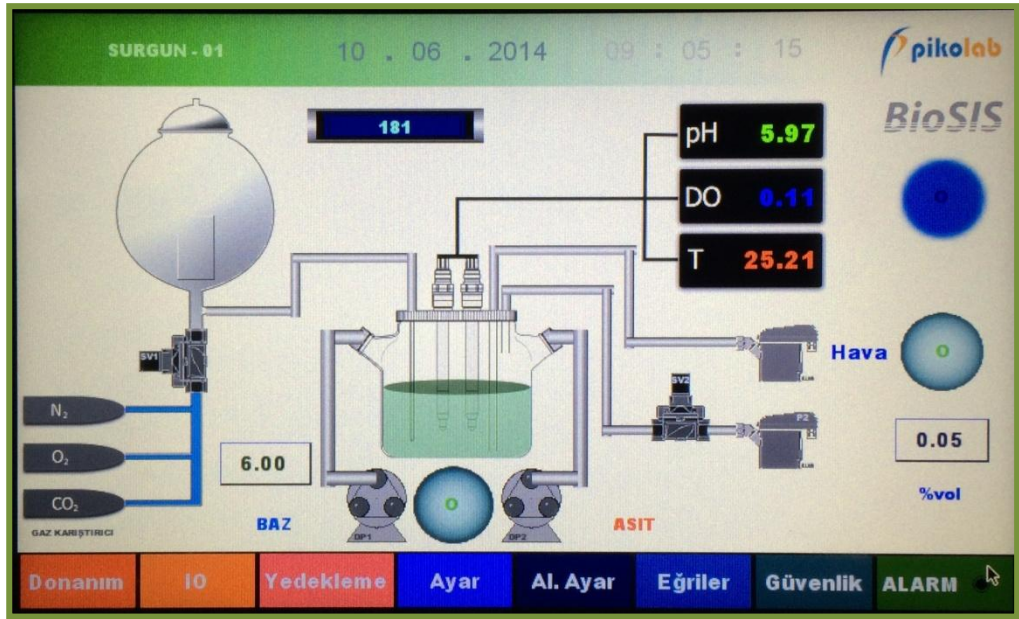
4.5.1 5 l balon tip geçici daldırma biyoreaktörün tasarımı

1 l hacmindeki RITA biyoreaktörlerde yapılan çalışmaların ardından ölçek büyütme amacıyla 5 l'lik balon tip geçici daldırma cam biyoreaktör tasarımı yapılmıştır.

Balon tip geçici daldırma reaktör sistemi; biyoreaktör ünitesi, kontrolör ünitesi ve gaz besleme ünitesi olmak üzere 3 temel birimden oluşmaktadır. Biyoreaktör ünitesi, 5 l hacminde balon şeklinde cam biyoreaktör tankı, 3.5 l hacminde üzerinde ikisi çözünmüş oksijen ve pH probu için olmak üzere toplam 7 adet boyun bulunan cam besin ortamı tankı, 2 adet cam asit ve baz tankı, 0.2 µ filtreler, Schott 01-300PKL-018 kapaklar, bağlantı için silikon hortumları içermektedir (Şekil 4.51). Kontrolör olarak Biosis BS-BT-22 PLC tabanlı kayıt ve kontrol ünitesi kullanılmış olup, balon tip geçici daldırma reaktör sistemi için Pikolab Mühendislik Biyoteknolojik Ürünler ve Laboratuar Hizmetleri San. Tic. Ltd. Şti tarafından özel kontrol yazılımı geliştirilmiş ve kontrol ekranları tasarlanmıştır (Şekil 4.52 ve Şekil 4.53). Kontrolör ünitesi 10.1" dokunmatik ekran, data kaydedici, 2 adet peristaltik pompa, 2 inputlu analitik transmitter, otoklava dayanıklı pH ve DO problemleri, selenoid valfden oluşmaktadır (Şekil 4.51). Gaz besleme ünitesi, O₂, N₂ ve CO₂ gaz karıştırıcısı, gaz güvenlik ventili, O₂, N₂ ve CO₂ tüpleri ve modifiye regülatörler, CO₂ ısıtıcı ve bağlantı ekipmanlarını içermektedir (Şekil 4.53).



Şekil 4.53 Balon tip geçici daldırma reaktör sistemi (a) 5 l cam balon reaktör tankı (b) 1.5 l cam besin ortamı tankı (c) Gaz besleme ünitesi (d) Biosis kontrolör ve balon tip geçici daldırma sistemi



Şekil 4.54 Biosis balon tip geçici daldırma reaktörü özel yazılım ana ekranı



Şekil 4.55 Biosis balon tip geçici daldırma reaktörü özel yazılım ayar ekranı

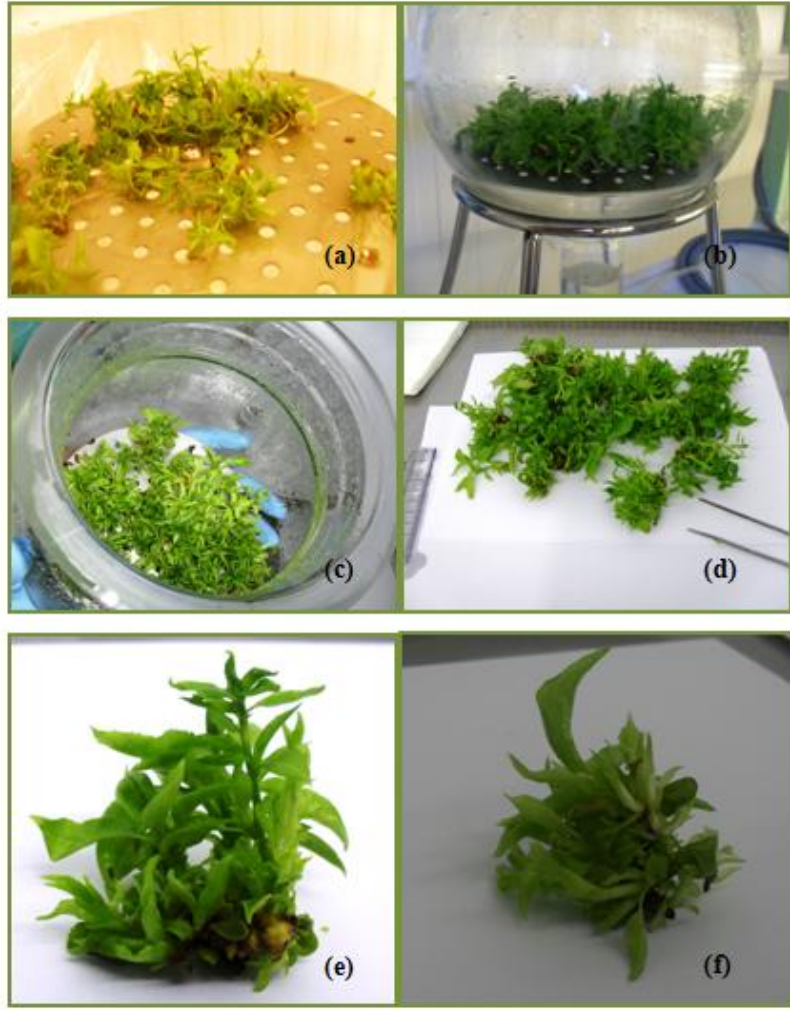
4.5.2 5 l balon tip geçici daldırma biyoreaktörde üretim parametrelerinin ölçümü ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar

RITA biyoreaktörlerden elde edilen *in vitro* sürgün demetleri, yaklaşık 1cm uzunluğunda iki uç sürgünlü eksplantlara ayrılarak 5l balon tip geçici daldırma biyoreaktörlerde altkültürlere alınmışlardır. Balon tip geçici daldırma biyoreaktör sisteminde besin ortamı tankında 750 ml, 30 g/l sükroz, 0.7 mg/l BAP ve 0.01 mg/l NAA içeren sıvı MS besin ortamı (M19) 5.9 pH değerinde sabit tutulmuş ve sürekli havalandırılmak suretiyle karıştırılmıştır. 20 adet eksplant inokülasyon yoğunluğu, 1 saatte 20 sn daldırma süresi ile 3000 lüks ışık şiddetinin uygulandığı kültür koşullarında 40 günlük altkültür süresinin sonunda çoğaltma katsayısı, sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), gövde kalınlığı (mm), yaprak sayısı (adet), yaş ağırlık (mg), kuru ağırlık (mg) ve vitrifikasyon yüzdeleri incelenmiştir (Çizelge 4.63; Şekil 4.56). Daldırma süresince %10 O₂, %50 CO₂ ve %40 N₂ içeren gaz karışımı biyoreaktöre beslenmiştir. Mikroçoğaltım denemeleri 3 tekrarlı olarak yapılmış ve her bir tekrar için 20 adet *in vitro* sürgün demeti kullanılmıştır.

Çizelge 4.63 Balon tip geçici daldırma biyoreaktörde Myrobolan B bitkiciklerinin mikroçoğaltım denemelerinde 40 günlük altkültür sonunda ölçülen üretim parametreleri

Üretim parametreleri	Balon tip geçici daldırma biyoreaktörde elde edilen değerler			
	T1	T2	T3	Ortalama
Çoğaltma katsayısı	5.9	5.81	5.78	5.83
Toplam sürgün sayısı (adet)	221	235	246	234
Ortalama sürgün sayısı (adet)	11.05	11.75	12.3	11.70
Ortalama sürgün uzunluğu (cm)	3.83	3.37	3.67	3.62
Ortalama yaprak sayısı (adet)	6.33	8.5	7.33	7.39
Ortalama gövde kalınlığı (mm)	1.56	1.25	1.67	1.49
Ortalama yaş ağırlık (mg)	3.714	3.011	3.492	3.406
Ortalama kuru ağırlık (mg)	0.356	0.269	0.301	0.309
Vitrifikasyon oranı (%)	30	20	25	25.00

* Eksplant sayısı tekrerr başına 24 adettir.



Şekil 4.56 (a) 5 l balon tip geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan 20 adet 2-3 sürgünlü eksplantlar (b) 30 günlük altkültür sonunda biyoreaktörde çoğaltılan sürgün demetleri (c) ve (d) 40 günlük altkültür sonunda hasat edilen sürgün demetleri, (e) Hasat edilen çoklu sürgün demetinde sağlıklı mikrosürgünler, (f) Hasat edilen kısmen vitrifiye olmuş sürgün demeti

4.5.3 5 l balon tip geçici daldırma biyoreaktörden elde edilen mikrosürgünlerin köklendirilmesi ve dış koşullara aklimatizasyonu ile ilgili uygulamalardan elde edilen sonuçlar

5 l balon tip geçici daldırma biyoreaktörlerde mikroçoğaltım prosesinden elde edilen tekli sürgünler köklendirme için 20 g/l sükröz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş yarı katı $\frac{1}{2}$ MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. 20 gün sonunda, bitkiciklerde %98.33 oranında köklenme başarısı elde edilmiştir.

Köklendirilmiş *in vitro* bitkicikler, %91.11 aklimatizasyon başarısı ile serada torf:perlit (4:1) ortamlarına alınmışlardır (Şekil 4.57).



Şekil 4.57 (a) Balon tip geçici daldırma biyoreaktörlerde mikroçoğaltılan *Myrobolan B* sürgün demetlerinden elde edilen ve yarı katı kültür koşullarında köklendirilen tek sürgünlü bitkicikler (b) Serada torf: perlit ortamına alınan bitkicikler, serada aklimatizasyonu yapılan bitkicikte (c) 15 gün sonunda sürgün gelişimi, (d) 40 gün sonunda kök ve sürgün gelişimi

4.5.4 5L balon tip geçici daldırma biyoreaktör ile RITA biyoreaktörden elde edilen üretim parametreleri verilerinin karşılaştırılması

250 ml, 30 g/l sükröz, 0.7 mg/l BAP ve 0.01 mg/l NAA içeren sıvı MS besin ortamı (M19) içeren RITA biyoreaktörlerde 1 sa: 20 sn daldırma süresi, 6 adet eksplant inokülasyon yoğunluğu ve 3000 lüks ışık şiddeti koşullarında 40 günlük altkültür süresi sonunda elde edilen üretim parametreleri değerleri ile aynı kültür koşullarında, aynı besin ortamından 750 ml kullanılan balon tip geçici daldırma

biyoreaktör sisteminde 20 adet eksplant inokülasyon yoğunluğunda elde edilen üretim parametreleri değerleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.64).

İstatistiki değerlendirmeye göre, biyoreaktör tipi, çoğaltma katsayısı, eksplant başına ortalama sürgün sayısı, ortalama yaş ağırlık ve vitrifikasyon oranı için %5 seviyesinde önemli, incelenen diğer parametreler için önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.65; Çizelge 4.66; Çizelge 4.67; Çizelge 4.68; Şekil 4.58; Şekil 4.59; Şekil 4.60; Şekil 4.61; Şekil 4.62; Şekil 4.63; Şekil 4.64).

Çizelge 4.64 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen üretim parametreleri değerleri

Üretim parametreleri	RITA biyoreaktörlerde ölçülen değerler*				Balon tip geçici daldırma biyoreaktörde ölçülen değerler**			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
Çoğaltma katsayısı	7.10	7.8	7.1	7.33 a	5.9	5.81	5.78	5.83 b
Ortalama sürgün sayısı (adet)	14.21	15.63	14.21	14.68 a	11.05	11.75	12.3	11.70 b
Ortalama sürgün uzunluğu (cm)	3.30	4.1	3.9	3.77	3.83	3.37	3.67	3.62
Ortalama yaprak sayısı (adet)	9.5	8.5	8.1	8.7	6.33	8.5	7.33	7.39
Ortalama gövde kalınlığı (mm)	1.81	1.79	1.86	1.82	1.56	1.25	1.67	1.49
Ortalama yaş ağırlık (mg)	2.259	2.125	2.421	2.268 a	3.714	3.011	3.492	3.406 b
Ortalama kuru ağırlık (mg)	0.335	0.426	0.441	0.401	0.356	0.269	0.301	0.309
Vitrifikasyon oranı (%)	12.50	8.33	4.17	8.33 a	30	20	25	25.00 b

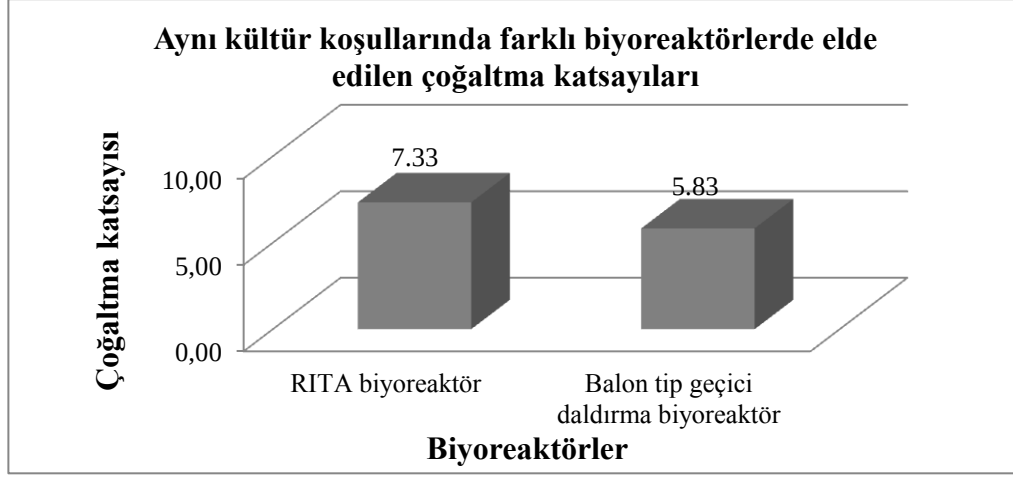
* Eksplant sayısı tekerrür başına 24 adettir.
 **Eksplant sayısı tekerrür başına 20 adettir.
 Çoğaltma katsayısı için HKO değeri 0.084. LSD değeri 1.087; ortalama sürgün sayısı için HKO değeri 0.532. LSD değeri 2.743; ortalama yaş ağırlık için HKO değeri 0.076. LSD değeri 1.033 ve vitrifikasyon oranı için HKO değeri 21.174. LSD değeri 10.340'dır.

Çizelge 4.65 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen çoğaltma katsayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Biyoreaktör tipi	1	3.390	3.390	40.542**	7.710	21.200
Hata	4	0.334	0.084			
Genel	5	3.724	0.745			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



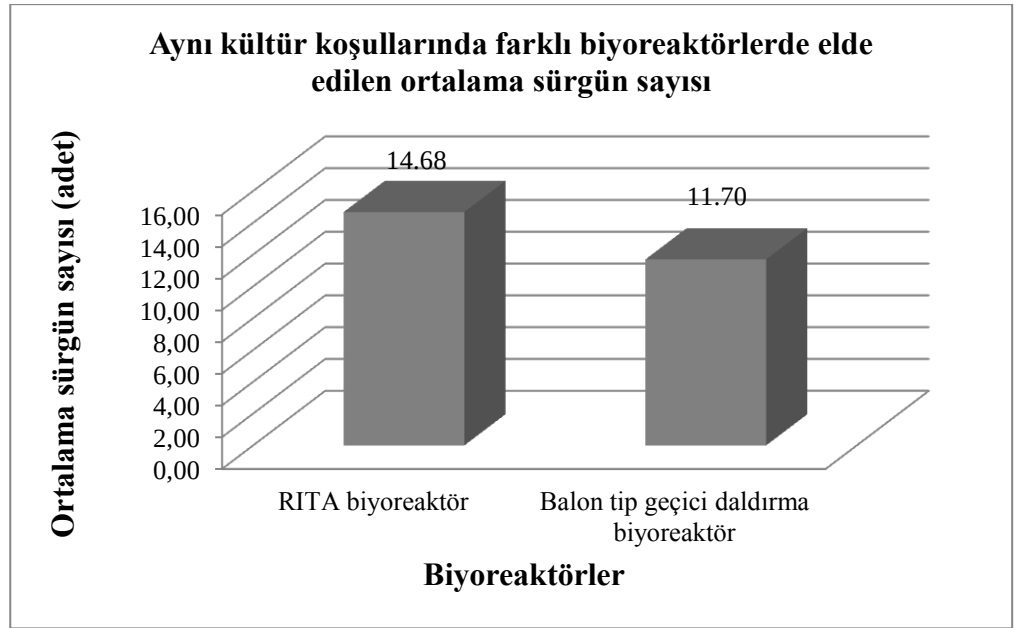
Şekil 4.58 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen çoğaltma katsayıları

Çizelge 4.66 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen eksplant başına ortalama sürgün sayıları ile ilgili varyans analiz sonuçları

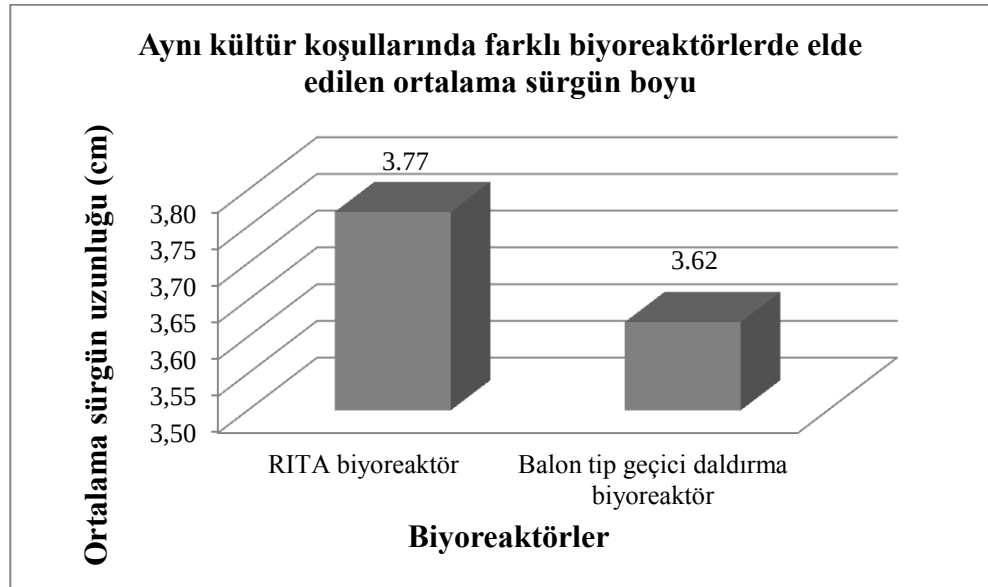
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Biyoreaktör tipi	1	13.350	13.350	25.080**	7.710	21.200
Hata	4	2.129	0.532			
Genel	5	15.480	3.096			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

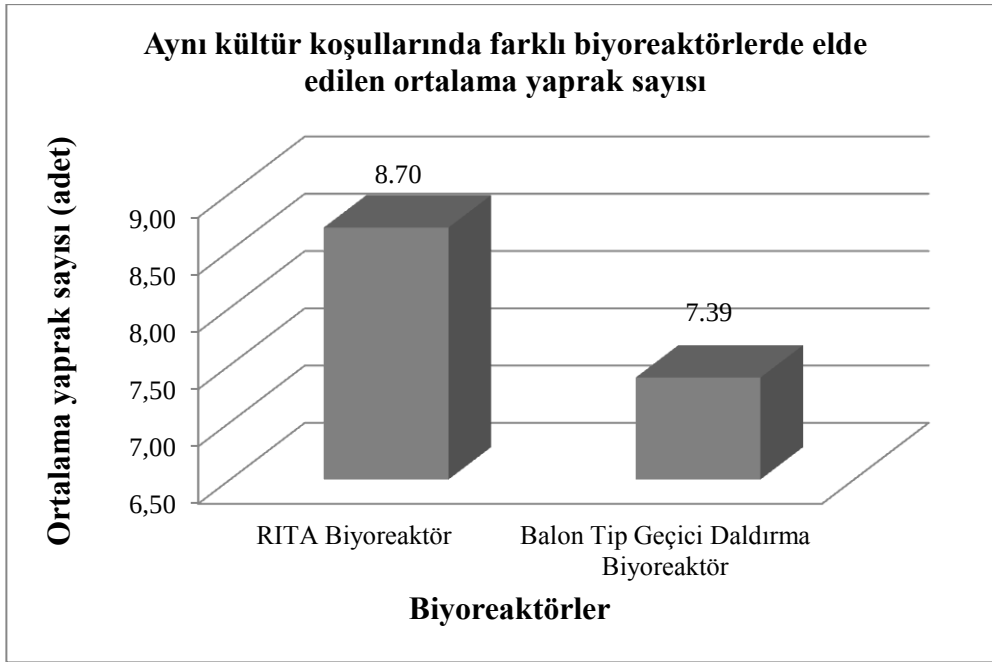
**= α :0.01 önemlilik düzeyi



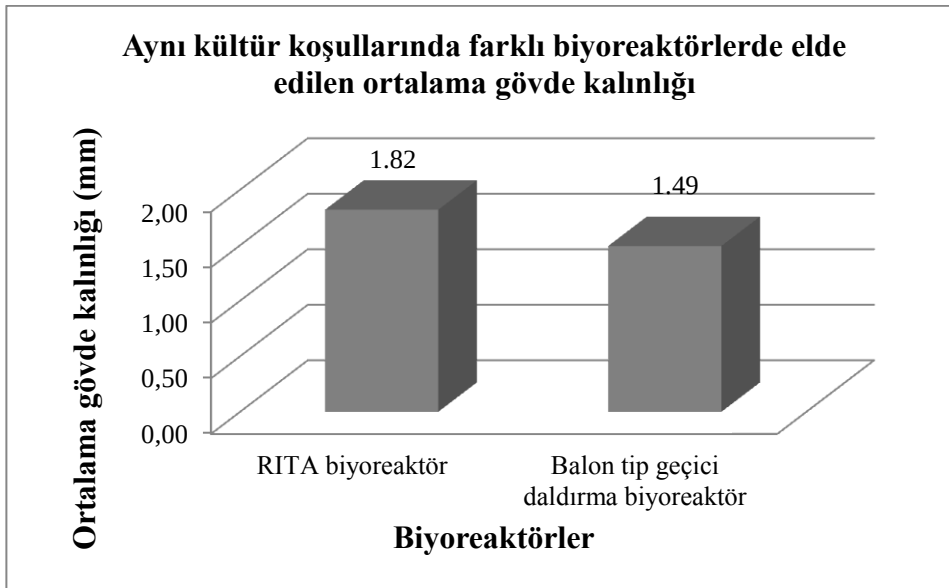
Şekil 4.59 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda belirlenen ortalama sürgün sayısı (adet)



Şekil 4.60 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen ortalama sürgün boyları (cm)



Şekil 4.61 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen ortalama yaprak sayıları (adet)



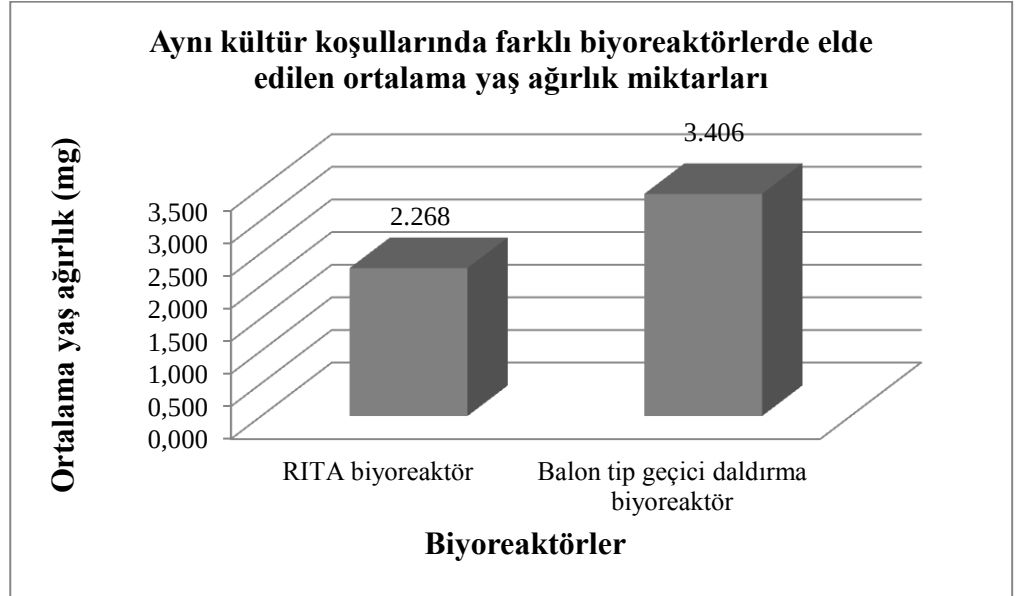
Şekil 4.62 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen ortalama gövde kalınlıkları (mm)

Çizelge 4.67 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen yaş ağırlıklar ile ilgili varyans analiz sonuçları

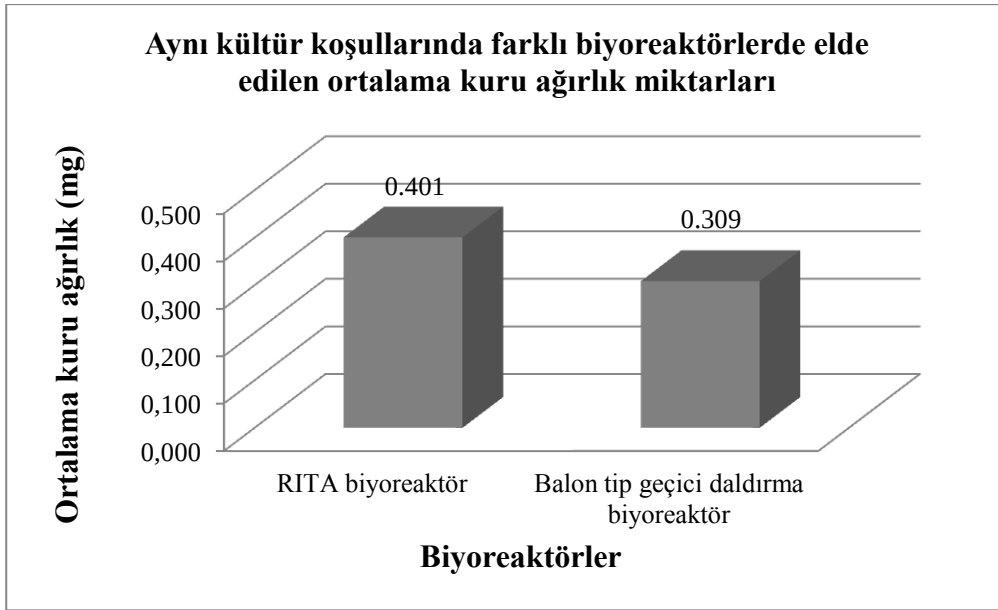
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Biyoreaktör tipi	1	1.940	1.940	25.680**	7.710	21.200
Hata	4	0.302	0.076			
Genel	5	2.243	0.449			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



Şekil 4.63 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen ortalama yaş ağırlıkları (mg)



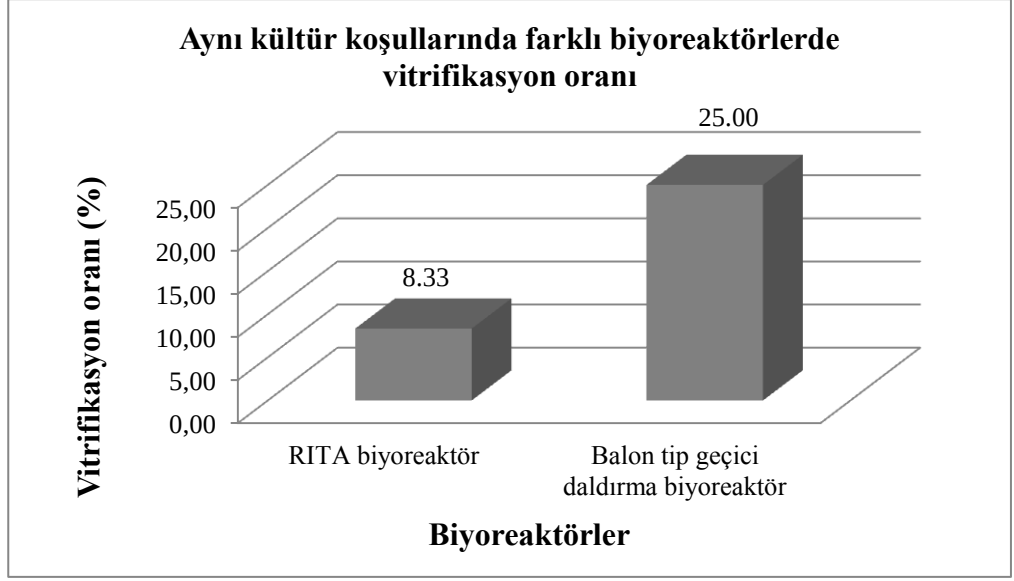
Şekil 4.64 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen ortalama kuru ağırlık miktarları (mg)

Çizelge 4.68 RITA ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda elde edilen vitrifikasyon oranları ile ilgili varyans analiz sonuçları

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	Bulunan F değeri	F Tablo değeri (%5)	F Tablo değeri (%1)
Reaktör tipi	1	416.667	416.667	19.679**	7.710	21.200
Hata	4	84.694	21.174			
Genel	5	501.361	100.272			

*= α :0.05 önemlilik düzeyi

**= α :0.01 önemlilik düzeyi



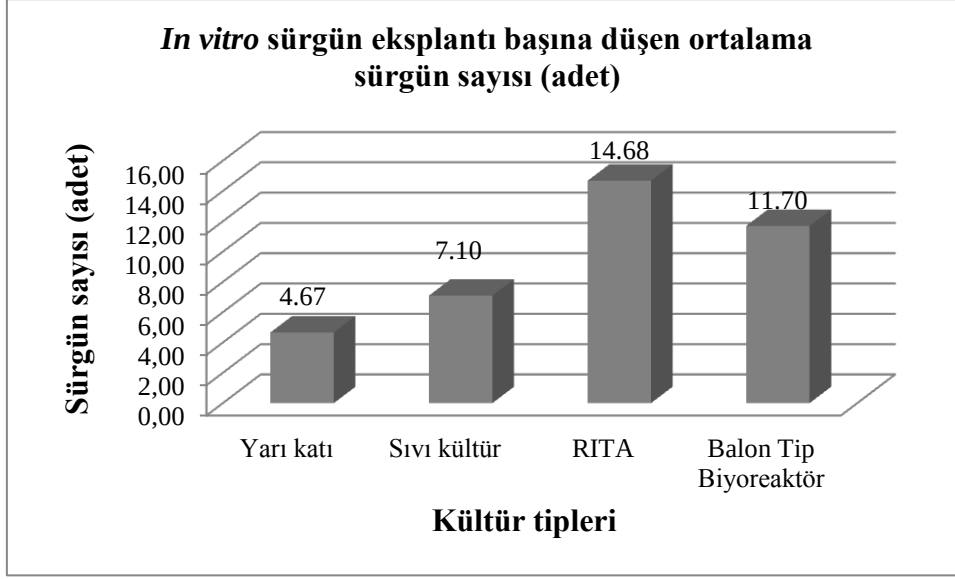
Şekil 4.65 RITA ve balon tip geçici daldırma biyoreaktörlerde kültüre alınan Myrobolan B eksplantlarının 40 günlük altkültür sonunda ölçülen vitrifikasyon oranları (%)

4.5.5 Farklı kültür koşullarında kültüre alınan Myrobolan B bitkiciklerinden elde edilen mikrosürgünlerin mikroçoğaltım parametreleri ile köklenme ve aklimatizasyon oranlarının karşılaştırılması

Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktörler ve geçici daldırma biyoreaktörlerde elde edilen eksplant başına ortalama sürgün sayısı, ortalama sürgün uzunluğu ve vitrifikasyon oranları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.69; Çizelge 4.70; Çizelge 4.71; Şekil 4.66; Şekil 4.67; Şekil 4.68).

Çizelge 4.69 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinde eksplant başına düşen ortalama sürgün sayıları (adet)

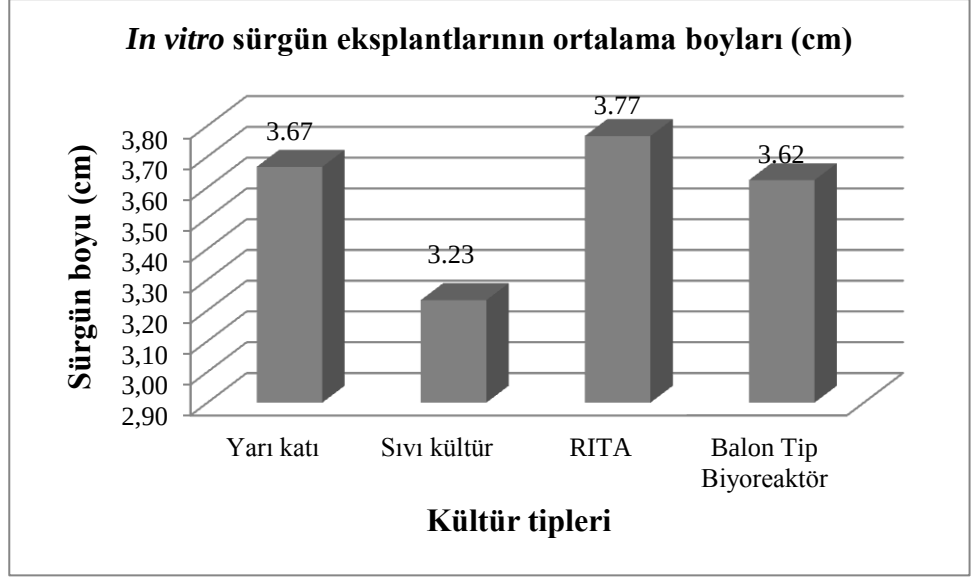
Kültür Tipi	In vitro sürgün ekplantı başına düşen ortalama sürgün sayıları (adet)			
	T1	T2	T3	Ort.
Yarı katı	5.15	4.15	4.70	4.67
Sıvı kültür	6.15	7.75	7.40	7.10
RITA	14.21	15.63	14.21	14.68
Balon Tip Biyoreaktör	11.05	11.75	12.3	11.70



Şekil 4.66 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinde eksplant başına düşen ortalama sürgün sayıları (adet)

Çizelge 4.70 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin ortalama boyları (cm)

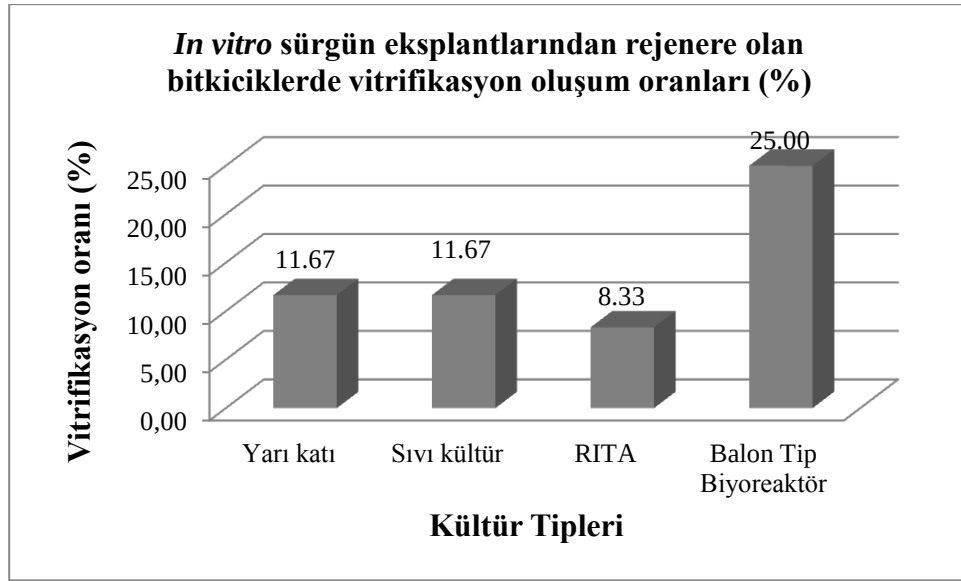
Kültür Tipi	<i>In vitro</i> sürgün ekplantlarının ortalama boyları (cm)			
	T1	T2	T3	Ort.
Yarı katı	4.20	3.10	3.70	3.67
Sıvı kültür	3.10	3.30	3.30	3.23
RITA	3.30	4.10	3.90	3.77
Balon Tip Biyoreaktör	3.83	3.37	3.67	3.62



Şekil 4.67 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin ortalama boyları (cm)

Çizelge 4.71 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinde vitrifikasyon oluşum oranları (%)

Kültür Tipi	<i>In vitro</i> sürgün eksplantlarından rejenere olan bitkiciklerde vitrifikasyon oluşum oranları (%)			
	T1	T2	T3	Ort.
Yarı katı	15.00	10.00	10.00	11.67
Sıvı kültür	15.00	10.00	10.00	11.67
RITA	12.50	8.33	4.17	8.33
Balon Tip Biyoreaktör	30.00	20.00	25.00	25.00



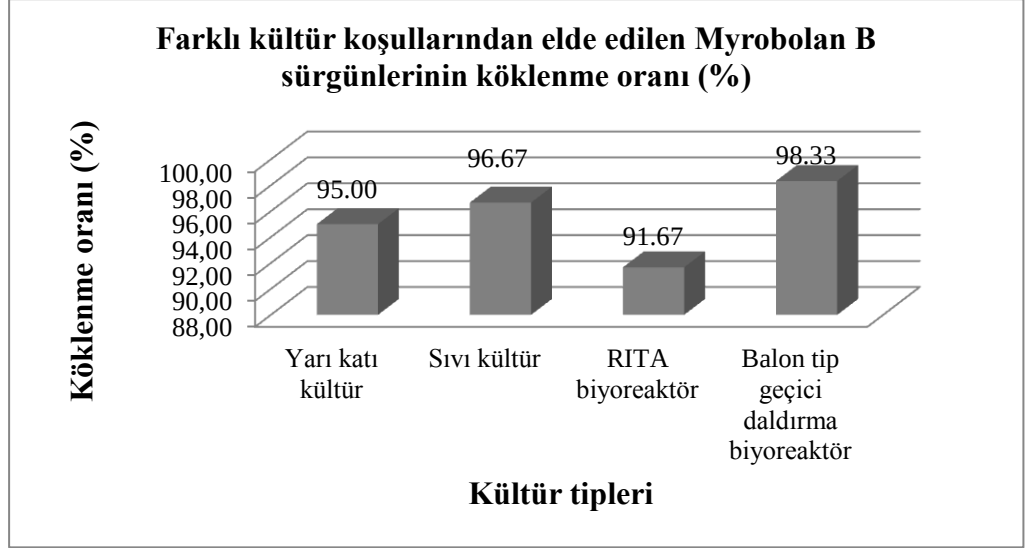
Şekil 4.68 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinde vitrifikasyon oluşum oranları (%)

Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktörler ve geçici daldırma biyoreaktörlerde mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda elde edilen mikrosürgünlerin 20 g/l sükröz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş yarı katı ½ MS besin ortamlarında 20 günlük altkültürleri sonunda gözlenen köklenme oranları ve köklenen bitkiciklerin aklimatizasyon oranları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.72; Çizelge 4.73; Şekil 4.69 ve Şekil 4.70). İstatistiki değerlendirme sonucunda köklenme ve aklimatizasyon için mikrosürgünlerin çoğaltıldığı kültür tipinin önemsiz olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.72 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin 20 günlük altkültür sonunda köklenme oranları (%)*

Kültür Tipi	Kök oluşturan tek sürgünlü eksplantların sayısı (adet)				Kök oluşturan eksplantlarının yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
Yarı katı kültür	20	18	19	19.00	100	90	95	95.00
Sıvı kültür	19	19	20	19.33	95	95	100	96.67
RITA biyoreaktör	17	19	19	18.33	85	95	95	91.67
Balon tip geçici daldırma biyoreaktör	19	20	20	19.67	95	100	100	98.33

* Eksplant sayısı tekrerr başına 20 adettir.

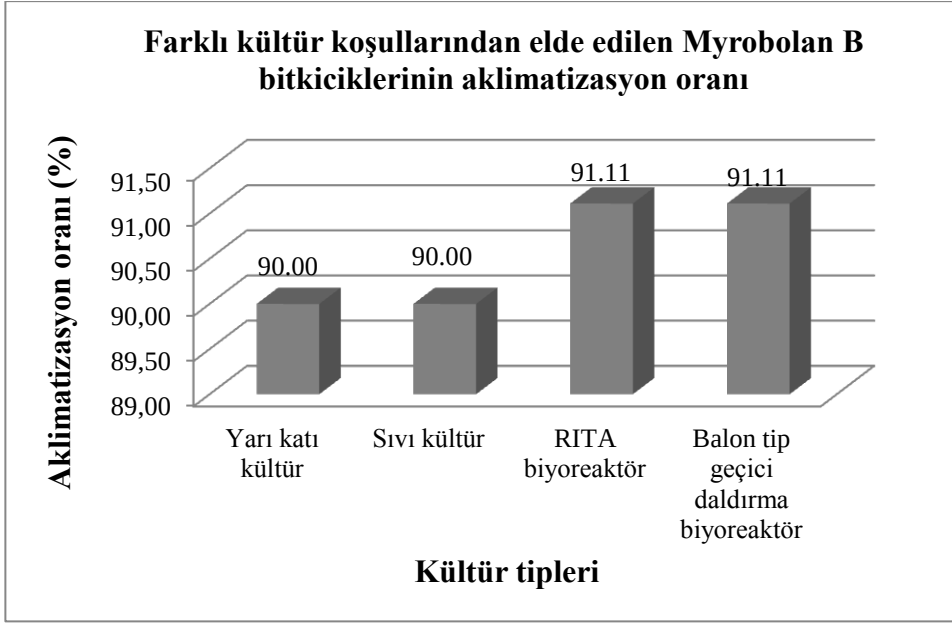


Şekil 4.69 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin 20 günlük altkültür sonunda köklenme oranları (%)

Çizelge 4.73 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinden aklimatize olan toplam bitki sayıları (adet) ve aklimatizasyon oranları (%)*

Kültür Tipi	Aklimatize olan köklü bitkiciklerin sayısı (adet)				Aklimatizasyon yüzdesi (%)			
	T1	T2	T3	Ort.	T1	T2	T3	Ort.
Yarı katı kültür	54	56	52	162.00	90.00	93.33	86.67	90.00
Sıvı kültür	52	59	51	162.00	86.67	98.33	85.00	90.00
RITA biyoreaktör	53	57	54	164.00	88.33	95.00	90.00	91.11
Balon tip geçici daldırma biyoreaktör	59	50	55	164.00	98.33	83.33	91.67	91.11

* Eksplant sayısı tekerrür başına 60 adettir.



Şekil 4.70 Yarı katı kültür koşulları, sıvı kültür koşulları, RITA biyoreaktör ve balon tip geçici geçici daldırma biyoreaktörde mikroçoğaltılan Myrobolan B sürgünlerinin aklimatizasyon oranları (%)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meyve ağaçlarının uygun olmayan ekolojik şartlarda yetiştirilmesi, ağaçlarda gelişmenin kontrol altına alınması, bodur anaçlar ile küçük taçlı ağaçlar elde edilmesi gibi avantajları nedeniyle aşılı fidan kullanımı modern meyvecilik için vazgeçilmez bir unsur haline gelmiştir (Gençtan ve ark., 2008; Hernandez, 2010).

Meyve anaçları geleneksel olarak, yavaş ve yüksek işçilik gerektiren vejetatif yöntemler (ayırma ya da çelikle köklendirme gibi) ya da uniform olmayan materyal üretimine neden olan generatif (tohum yoluyla) yöntemler ile çoğaltılmaktadır (Vujovic et al., 2012). Klasik yöntemler ile ticari üretimin başaramadığı durumlarda ekonomik olarak önemli, birçok bitki çeşidinin, sürekli kütsel üretimleri için, embriyogenik ve organogenik doku kültürü metotlarının kullanımı bir potansiyel olarak kabul edilmektedir. Ancak uygulamada, eksplantların yarı katı besin ortamlarında çoklu sürgün oluşturma oranlarının düşük olması, yeni üretim yöntemlerinin geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Sıvı besin ortamlarının kullanıldığı biyoreaktör sistemleri; ölçek büyütme olanakları, fiziksel ve kimyasal çevrenin kolay kontrol edilebilmesi ve üretim maliyetlerinin düşürülmesi gibi avantajları nedeniyle, alternatif bir üretim tekniği olarak önerilmektedir (Paek ve ark., 2001). Araştırmamızda kök boğazı çürüklüğüne dayanıklı, kuvvetli bir erik kök anacı olan ve geleneksel yöntemlerle köklendirilmesinde problem olan, ekonomik olarak önemli Myrobolan B (*Prunus cerasifera* L.) erik klon anacının sıvı kültürlerde büyük ölçekte mikroçoğaltımları amaçlanmıştır.

Myrobolan grubu anaçlar ülkemizde ve dünyada en çok kullanılan erik klon anaçlarıdır. Myrobalan B anacı, kireçli, ağır, drenajı kötü, hafif, kuvvetli ve zayıf gibi farklı topraklara iyi uyum sağlamanın yanında nematod, bakteriyel kanser ve *Verticilium*'a duyarlı, kök boğazı çürüklüğüne ve kuraklığa orta derecede dayanıklıdır. Koçal (2011)'a göre kuvvetli ve verimli ağaçlar oluşturan ve yoğun dikime uygun olan Myrobolan B anaçları ülkemizde kayısı, badem, erik çeşitleri için ortak anaç olarak kullanılmaktadır.

Myrobolan B anaçlarının doku kültürü çalışmalarında ilk adım olarak kullanılacak eksplantlar için uygun donör bitkilerin seçimine ve sterilizasyon prosedürünün oturtulmasına çalışılmıştır. Bu amaçla sera ve arazi koşullarında muhafaza edilen bitkilerden elde edilen nodal eksplantlar sterilizasyon için farklı sürelerde (20 ve 30 dk) %1'lik NaOCl ile muamele edilmişlerdir. Çalışmada arazi koşullarından alınan eksplantların %100'ü, sera koşullarından alınan eksplantların sırasıyla %1.5 ve %5'i kontamine olmuştur. Kontaminasyon tipleri incelendiğinde yoğun fungal kontaminasyonlar gözlenmiştir. Sterilizasyon başarısını arttırmak amacı ile yapılan fungusit uygulamalarında eksplantlar 15 saat %1 benomil ile ön muamele edilmişler ve daha sonra 1'lik NaOCl ile 20 ve 30 dk steril edilmişlerdir. Fungusit ile yapılan 1 saatlik ön muamele, sera koşullarından elde edilen eksplantlarda sadece NaOCl'nin kullanıldığı sterilizasyon yöntemi ile hemen hemen aynı sonuçları verirken, arazi koşullarından elde edilen eksplantlarda kontaminasyon oranını %80'e düşürmüştür. Ancak arazi koşullarından elde edilen steril eksplantların tamamı bir sonraki altkültürde kontamine olmuştur. Bunun sebebi kullanılan fungusitin miktarı ve uygulama süresinin eksplantlarda bulunan içsel kontaminasyonları giderecek kadar yeterli olmaması olabilir. Deneme sonuçları, kullanılan sterilizasyon yönteminden bağımsız olarak, eksplantın alındığı donör bitkinin muhafaza edildiği koşulların, sterilizasyon başarısı üzerinde önemli etkisi olduğunu göstermiştir. Sera koşullarındaki bitkilerden elde edilen eksplantlardan steril olanların tamamında rejenerasyon gözlenmiş ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında kullanılacak *in vitro* eksplantlar, rejenere olan yeni sürgünlerden çoğaltılmışlardır. Benzer şekilde Vujovic et al. (2012), kiraz, erik ve armut anaçlarının mikroçoğaltımı için kontrollü sera koşullarında bulunan bitkilerden elde ettikleri eksplantları kullandıkları çalışmada, kontaminasyon oranlarının eksplant kaynağının büyüme koşulları ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra sera koşullarında bulunan bitkiler daha zayıf ve hassas epiderm tabakasına sahip oldukları için sodyum hipoklorit gibi kimyasalların daha etkili olabileceği belirtilmiştir.

Rejenere sürgünlerin sürgün çoğaltımı amacıyla aynı besin ortamında altkültüre alınması sonucunda sürgün gelişiminin yanında yüksek oranda (%90) ağır hiperhidrisite problemi ile karşılaşmıştır. Reed et al. (2013), besin ortamı, jelleştiricilerin tipi ve konsantrasyonu, bitki kültür kabı, kültür kabı içindeki hava,

mineral besinler, sitokininler ve süktroz gibi ozmotik durumu etkileyen besin ortamı içeriklerinin hiperhidrisite oluşumu üzerinde önemli etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Yarı katı kültür koşullarında sürgün geliştirme ortamının belirlenmesi amacı ile Myrobolan B'ye ait nodal eksplantlardan elde edilen sürgünler bağılı bulundukları ana dokudan kesilerek tekli sürgünler halinde farklı büyüme düzenleyicileri ve jelleştirici ajan içeren MS ve WPM ortamlarında altkültüre alınmışlardır. Hiperhidrisite probleminin çözülebilmesi için besin ortamında bulunan süktroz miktarı düşürülmüş ve jelleştirici ajan olarak gelrite yerine agar kullanımı önerilmiştir. Sitokininlerin yanında çok düşük konsantrasyonlarda oksinler ve GA₃ kullanımı da vitrifikasyon sorununun çözümü amacıyla denenmiştir. Besin ortamlarının tamamında yeni sürgün oluşumları ile vitrifikasyon oluşumları gözlenmiştir. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı 4.67, en düşük sürgün sayısı 2.33 olarak belirlenirken, vitrifikasyon oranları %90.00-%11.67 arasında değişiklik göstermiştir. Quiala et al. (2014), bildirdiği üzere sitokinin hormonlarının daha yüksek oranda bulunduğu besin ortamlarında sürgün gelişimi yanında ağır hiperhidrisite oluşumları gözlenmiştir.

Besin ortamlarında yapılan modifikasyonlar ve düşük oranda sitokinin kullanımı vitrifikasyon sorunu çözülmüş ancak rozet şeklinde kısa boylu ve düşük çoğaltma katsayısına sahip bitkicikler elde edilmiştir. Hem bitkiciklerin sürekli sitokininler ile temasını engelleyerek vitrifikasyon oluşma olasılığını düşürmek, hem de rozet yapıdaki eksplantların boylarını uzatmak için çoğaltma ortamında kültüre alınan eksplantlar 15 gün sonunda 0.1; 0.25; 0.5; 0.75 mg/l IBA ve 0.5 mg/l IBA ile birlikte 0.01 mg/l IAA içeren MS uzatma ortamlarına aktarılmışlardır. Uzatma ortamı olarak kullanılan besin ortamlarından, iki farklı oksin içeren besin ortamında sürgün boyu daha yüksek bulunmuştur. Uzatma ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda vitrifikasyon sorunu gözlenmemiştir. Çoğaltma ortamlarından uzatma ortamlarına aktarılan vitrifiye eksplantların da bu ortamlarda camsı özelliklerini kaybedip normal görünüme ulaştıkları saptanmıştır. Uzatma ortamlarında eksplantlarda sürgün çoğalması olmamıştır, ancak sürgünlerin boyları uzamıştır. Oksinlerin bitki hücresinden hidrojen iyonlarının serbest bırakılmasını sağlayıp hücre duvarındaki stresi azaltmak suretiyle bitkide uzamayı teşvik ettiği bilinmektedir (Higashide et al., 2014).

Yarı katı kültür koşullarında eksplantların, ilk 15 gün sürgün çoğaltma ortamında kültüre alınmasının ardından 10 gün uzatma ortamında kültüre alınması şeklinde 4 ay sürdürülen mikroçoğaltım prosesi sonucunda projenin diğer aşamalarında kullanılmak üzere istenen sayıda *in vitro* bitkicik üretimi sağlanmıştır. Elde edilen çoklu sürgünler son uzatma ortamlarından alınarak köklendirme için 20 g/l süktroz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş ½ MS besin ortamlarına aktarılmışlardır. Besin ortamının mineral konsantrasyonunun eksplantların köklenme özelliklerini etkiledikleri bilinmektedir. Bazı araştırmacılar köklendirmenin artırılması için besin ortamının nutrient içeriğinin yarısının kullanılmasını önermektedir. Fotopoulos and Sotiropoulos (2005), PR 204/84 kök anacı ile yaptıkları çalışmada, besin ortamının nutrient içeriğinin yarıya indirilmesinin köklendirmeyi artırdığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde yapılan çalışmada, 20 gün sonunda, bitkiciklerde %95 oranında köklenme başarısı elde edilmiştir. Köklü bitkilerin apeks dokuları taze ve canlı yeşil renkte olup aklimatizasyon için uygun bulunmuştur. Alıştırma, *in vitro* ile *ex vitro* koşullar arasında bir geçiş aşaması olup *in vitro* koşullarda elde edilen bitkiciklerin kalitesi alıştırma başarısını doğrudan etkilemektedir (Özkaynak ve Samancı, 2005). Köklendirilmiş *in vitro* bitkicikler, %90 aklimatizasyon başarısı ile serada cocopeat ortamlarına alınmışlardır.

Yarı katı kültür çalışmalarında kullanılan ve başarılı bulunan, 20 g/l süktroz, 1 mg/l BAP, 0.01 mg/l NAA, 0.3 mg/l GA3 içeren sıvı MS besin ortamı, 20 g/l süktroz, 0.5 mg/l BAP, 0.01 mg/l NAA, 0.3 mg/l GA3 içeren sıvı MS besin ortamı ve 20 g/l süktroz, 0.5 mg/l IBA, 0.01 mg/l IAA sıvı MS besin ortamlarını içeren filtre köprülü tüplerde kültüre alınan bitkiciklerde ortalama sürgün sayılarında artış gözlenirken, sürgün boylarında azalmalar tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek sitokinin içeren sıvı besin ortamında kültüre alınan bitkiciklerde, yarı katı besin ortamında kültüre alınanlara göre vitrifikasyon oranları da artmıştır. Ancak düşük sitokinin içeren sıvı besin ortamında kültüre alınan bitkiciklerde, yarı katı besin ortamında kültüre alınanlara göre vitrifikasyon oranları azalmıştır.

Sıvı besin ortamı içeren filtre köprülü tüplerde kültüre alınan eksplantlarda, kültür kaplarının oldukça dar olmasından dolayı, altkültür periyodunun yirminci gününden sonra bitkiciklerin yapraklarında morfolojik bozukluklar gözlenmeye

başlanmıştır. Ayrıca tüplerde bulunan sıvı besin ortamlarının karıştırılarak havalandırılması da mümkün olmamıştır. Bitkicik büyümesi için yeterli alan oluşturmak, karıştırma ile bir miktar havalandırma sağlamak ve bunun yanında bitki yüzeyinin besin ortamı ile etkin temasını sağlamak için eksplantlar, 100 ml sıvı besin ortamı içeren, içinde filtre kağıdı ile köprü oluşturulmuş ve oluşturulmamış 250 ml hacmindeki erlenlerde karıştırmalı ve karıştırmaz olarak kültüre alındıklarında, en iyi sürgün gelişimi, filtre köprülü erlenlerde karıştırmalı kültür sistemlerinde elde edilmiştir. Vitrifikasyon oluşum durumlarına bakıldığında, en düşük vitrifikasyon oluşumu filtre köprülü tüplerde kültüre alınan bitkiciklerde gözlenmiştir. Sürgün gelişimine karıştırmanın olumlu etkisinin yanında, filtre köprüsü oluşturmanın vitrifikasyon oranını azalttığı tespit edilmiştir. Filtre köprünün kullanılmadığı ve karıştırmanın yapılmadığı sistemde bitkiciklerde asfeksiye bağlı olarak çürümeler görülmüştür. Karıştırmanın yapılması asfeksiyi engellemekle birlikte, bitkilerin sürekli olarak besin ortamı ile teması sonucu yoğun vitrifikasyon oluşumu gerçekleşmiştir. Asfeksi ve vitrifikasyon sıvı kültür sistemlerinin en temel dezavantajları olup, bu problemin giderilmesi için geçici daldırma sistemleri önerilmektedir (Berthouly and Etienne, 2005). Erlenlerde ve tüp içinde kurulan filtre köprü geçici daldırma görevi gördüğü için sürgün gelişimi daha yüksek olmuştur.

Sıvı kültür denemelerinde kullanılan üç farklı sıvı besin ortamında sürgünlerin kısa sürede yaşlandığı gözlenmiştir. Sıvı kültürde altkültür süresinin uzatılması ve buna bağlı olarak çoğaltma katsayılarının artırılabilmesi için, düşük vitrifikasyon oranları göz önüne alınarak besin ortamı içeriklerinde çeşitli modifikasyonlar yapılmış, sükroz miktarı %3'e çıkarılıp sitokinin oranları da artırılmıştır. Giberellinlerin dormansinin kırılması, gövde büyümesi, çiçeklenmenin başlatılması, polen gelişimini ve meyve büyümesini içeren bitki gelişim fazlarını düzenlediği bilinmektedir (Sponsel and Peter, 2010). Filtre köprülü tüplerde ve erlenlerde yeni rejenere olan sürgünlerin apeksleri canlı ve açık bulunduğu için besin ortamlarında GA₃ kullanılmamıştır. Deneme sonucunda 30 g/l sükroz, 0.7 mg/l BAP ve 0.01 mg/l NAA içeren sıvı MS besin ortamından (M19) elde edilen sürgünlerin boylarının diğerlerine oranla daha uzun olduğu ve yeni rejenere olan sürgünlerde ağır vitrifikasyon semptomlarının bulunmadığı gözlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında RITA biyoreaktörlerde ve

geçici daldırma balon tip biyoreaktörlerde optimum besin ortamı olarak M19 besin ortamı kullanılmıştır.

Sıvı kültür koşullarından elde edilen çoklu sürgünlerin yarı katı kültür koşullarındakine benzer şekilde köklendirme için 20 g/l süktroz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş ½ MS besin ortamlarına aktarılmalrı sonucunda bitkiciklerde %96.67 oranında köklenme başarısı elde edilmiştir. Yarı katı kültür denemelerinde aklimatizasyon çalışmalarında kullanılan cocopeat ortamından fidanların tek tek ayrılması mümkün olmadığı için, sıvı kültürden elde edilen mikrosürgünlerin aklimatizasyon denemelerinde viyollerde torf:perlit (4:1) karışımları kullanılmış ve aynı aklimatizasyon başarısı (%90) elde edilmiş olmakla birlikte; cocopeat ortamında bitkilerin daha hızlı uzadıkları ve kalınlaştıkları, daha kuvvetli kök geliştirdikleri gözlenmiştir. Bu durum cocopeat ortamının su tutma kapasitesinin daha yüksek olması ve kök gelişimi için daha gözenekli bir doku sunması ile ilişkilendirilebilir (Kashyap and Dhiman, 2011).

Sıvı kültür koşullarında geliştirilen çoklu sürgünlerin geçici daldırma sisteminin kullanıldığı RITA biyoreaktörlerde altkültürlere alınması ve üretim parametrelerinin optimizasyonu çalışmalarında, optimum inokulasyon yoğunluğu (6 adet eksplant), daldırma süresi (1 sa: 20 sn), altkültür süresi (40 gün), besin ortamı miktarı (250 ml), ışık şiddeti (3000 lüks) belirlenmiştir. Mariaterasa et al. (2014), antepfıstığı ile ilgili yaptığı çalışmada, RITA biyoreaktörlerde inokulasyon yoğunluğu ve daldırma süresinin optimizasyonu ile vitrifikasyon oranının azaltıldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda yarı katı kültür koşullarında elde edilen en yüksek eksplant başına ortalama sürgün sayısı 4.67 adet, RITA biyoreaktörlerde optimum kültür koşullarında 14.68'e çıkarılmış ve en düşük vitrifikasyon oranı %11. 67 değeri, % 8.33'e düşürülmüştür. Akdemir et al. (2014), Myrobolan B gibi odunsu bir bitki olan Antepfıstığı ve anaçlarının RITA biyoreaktörlerde mikroçoğaltımı çalışmalarında, yarı katı kültürlerde 3.5 olan sürgün başına eksplant sayısının RITA biyoreaktörlerde 4.5'e çıkarıldığını ve yarı katı kültürlerde %20 olan vitrifikasyon oranlarının, RITA biyoreaktörlerde %10'a düşürüldüğünü bildirmişlerdir. Bu bulgulara göre Myrobolan B eksplantlarının RITA biyoreaktörlerde mikroçoğaltımı çalışmalarından elde edilen sonuçlar daha başarılıdır.

Çalışmamızda inokülasyon yoğunluğunun büyüme parametrelerine etkisi incelendiğinde, az sayıda eksplantın kullanıldığı çalışmalarda bitkiciklerde daha az sayıda yeni sürgün oluşumu ve daha yüksek oranda vitrifikasyon ve morfofizyolojik bozukluk gözlenmiştir. Bu durum az sayıda eksplantın daldırma süresince besin ortamı ile daha fazla temas içinde olmasından kaynaklanmış olabilir. Yüksek inokülasyon yoğunluklarında ise nispeten daha az vitrifikasyon oranı ile çoğaltma katsayısı elde edilmiştir. Ancak yüksek inokülasyon yoğunluklarında bitkiciklerde morfofizyolojik bozukluklar gözlenmemiş, uzun boylu, aktif apeks dokusuna sahip çoklu sürgünler gelişmiştir. Damino et al. (2005), benzer şekilde krizantem bitkisinde 10L geçici daldırma biyoreaktörde optimum inokülasyon yoğunluğunu belirlemek için 20, 40 ve 60 adet eksplant kullanarak, düşük inokülasyon yoğunluklarının mikroçoğaltım fazı için yüksek inokülasyon yoğunluklarının ise bitkinin uzamasını teşvik etmesinden dolayı köklendirme prosesi için daha uygun olduğunu belirlemişlerdir.

Berthouly and Etienne (2005), daldırma süresi ve sıklığının geçici daldırma sistemlerinde en kritik parametrelerden olduğunu, büyüme parametrelerinin daldırma süresi ve sıklığı ile kontrol edilebileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda daldırma süresinin kültürlere etkisi incelendiğinde, daldırma sıklığı arttıkça sürgün gelişimi ile birlikte vitrifikasyon oranının da azaldığı gözlenmiştir.

Savankiar et al. (2005) sıvı ortamdaki stokinin çeşidi ve miktarı, daldırma süresi ve sıklığı, biyoreaktör hacmi, inokulum miktarı yanında altkültür süresinin de geçici daldırma sistemlerinde başarıyı etkileyen faktörlerden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda RITA biyoreaktörlerde altkültür süresinin etkisi incelendiğinde daha uzun altkültür sürelerinde sürgün gelişimlerinde önemli farklılıklar oluşmazken, süre arttıkça vitrifikasyon oranının da arttığı belirlenmiştir. Bunun sebebi 40 günlük altkültür sonucunda besin ortamının nutrient içeriğinin azalması, EC ve pH değerlerinin değişmesi olabilir. Piao et al. (2013), asma anaçlarından 5BB bitkilerinin biyoreaktörde mikroçoğaltımları amacıyla yaptıkları çalışmada altkültür süresi arttıkça sürgün çoğaltımının arttığını ancak 40 ve 50 günlük altkültür süreleri arasında önemli bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda belirlenen optimum altkültür süreleri bu çalışmada bildirilen sonuçlar ile benzerdir.

RITA biyoreaktörlerde kullanılan besin ortamının hacmi, daldırma süresince eksplantların besin ortamı ile temasını etkilediği için önemlidir. Yüksek hacimlerde besin ortamı kullanımı asfeksi problemine neden olduğu için vitrifikasyon ve morfofizyolojik bozukluk oluşma oranını artırmaktadır. Berthouly and Etienne (2005), sükrözpancarı ile yapılan çalışmalarda eksplant başına düşen sıvı ortam miktarındaki artışın çoğaltma katsayısını artırdığını ancak sürgün boyunu etkilemediğini saptamışlardır. Çok yüksek hacimlerin ise mikroçoğaltım verimliliğini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılara göre bunun sebebi sürgün oluşumunu stimule eden kimyasal molekül salgılarının büyük hacimlerde dilue olmasıdır. Daha az besin ortamı miktarları ile optimum büyümenin sağlanması, maliyetleri düşürerek sistemin ticari anlamda kullanılabilirliğini artırmaktadır.

Mikroçoğaltımda en önemli faktörlerden biri de kültürlerin bulunduğu büyüme odalarındaki ışık şiddetidir. Çalışmamızda ışık şiddeti arttıkça RITA biyoreaktörlerde sürgün gelişiminin azaldığı ve vitrifikasyon oranlarının arttığı gözlenmiştir. Bu durum yüksek ışıklandırma sebebiyle hassas bitki dokularında büyümenin inhibe olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte Takayama and Akita (2008), ışık yoğunluğunun dokuyu geçerken logoritmik olarak azaldığını bildirmişlerdir. Işık kaynağına olan uzaklığın da etkisiyle sürgün demetlerinin ışıklandırılması güçleşmekte ve özellikle yüksek taze ağırlıkta sürgün kültürlerinin varlığında ışık iletimi hızlı şekilde düşmektedir. Ancak çalışmamızda küçük hacimde biyoreaktörler, yarı katı kültürlerle benzer şekilde büyüme odalarında direkt ışık kaynaklarının altında bulunan raflara yerleştirildiği için mikrosürgünler, düşük ışık oranlarından etkilenmemiş olabilir.

RITA biyoreaktörlerden elde edilen çoklu sürgünlerin sıvı kültürlerle benzer şekilde köklendirme için 20 g/l sükröz içeren, 1 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş ½ MS besin ortamlarına aktarılmaları sonucunda bitkiciklerde %91.67 oranında köklenme başarısı elde edilmiştir. RITA biyoreaktörlerden elde edilen mikrosürgünlerin torf:perlite (4:1) karışımları kullanılan aklimatizasyon denemelerinde %91.11 oranında aklimatizasyon başarısı elde edilmiştir. Akdemir et al. (2014), antep fıstığı ve kök anaçlarının RITA biyoreaktörlerinde mikroçoğaltımı ile ilgili çalışmalarında benzer sonuçlar elde etmişler,

köklendirme (%50-70) ve aklimatizasyon (%70-90) başarılarının yarı katı kültürlerden daha verimli olduğunu bildirmişlerdir. Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde üretilen bitkicikler yüksek foto-mikzotrofik metabolizma gösterdikleri için daha fazla besin elementine ihtiyaç duymaktadır. Geçici daldırma sistemi, bitkiciklerin fotosentetik kapasitesini iyileştirmemekte ancak foto-mikzotrofik koşullarda besin elementi alımını artırmaktadır. Bunun sonucu olarak *ex vitro* koşullara alıştırılma başarıları da artış göstermektedir (Escalona et al., 2003).

Ölçek büyütme amacıyla tasarlanan 5 l balon tip geçici daldırma biyoreaktör sisteminde RITA biyoreaktörlerde optimum koşullar olarak belirlenen 1sa:20 sn daldırma süresi, 3000 lüks ışık şiddetinde 750 ml sıvı besin ortamı, 20 adet eksplant inokülasyon yoğunluğu kullanılarak ve 40 günlük altkültür süresi sonunda üretim parametreleri ölçülmüş (çoğaltma katsayısı 5.83, ortalama sürgün sayısı 11.7 ve vitrifikasyon yüzdesi %25) ve RITA biyoreaktörlerde elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Vitrifikasyon oranı dışındaki büyüme parametreleri için RITA biyoreaktörlerde elde edilen sonuçlar daha düşük bulunurken, vitrifikasyon oranlarının 5 l balon tip biyoreaktörde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebi balon tip geçici daldırma sisteminde verimliliği artırmak üzere gerekli optimizasyon çalışmalarının yapılmamış olmasıdır.

Escalona et al. (1999), ananas bitkilerinin mikroçoğaltımı için sıvı, yarı katı ve geçici daldırma sistemlerini karşılaştırdıkları çalışmada, 42 günlük altkültür süresinde geçici daldırma sistemlerinde çoğaltma katsayıları, yaş ve kuru ağırlıklarda artışlar olduğunu bildirmişlerdir. Pati et al. (2005), *Rosa damascena* ve *T. bourboniana*, sürgün çoğaltımı ve kök teşviki için sıvı kültür sistemlerini kullandıkları çalışmada yarı katı kültürlerden 8 kat fazla sürgün oluşumu elde etmişlerdir. Dewir et al. (2006), *Spathiphyllum* bitkiciklerinde agar bazlı ortam, destek materyali bulunan ve bulunmayan sürekli sistemler ve geçici daldırma sistemlerinin kullanıldığı farklı sıvı kültür tipleri karşılaştırılmış, destek materyali bulunan biyoreaktörlerde çoğaltma ve büyümenin daha verimli olduğu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Shaik et al. (2010), *L. frutescens* sürgün çoğaltımını geliştirmek için 5 l balon tip, sürekli ve geçici daldırma biyoreaktör sistemlerini kullandıkları çalışmada, en yüksek sürgün çoğaltma oranının, geçici

daldırma sistemlerinden alındığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara paralel olarak, sürekli daldırma ya da yarı katı kültür ortamları ile kıyaslandığında geçici daldırma sistemleri, sürgün sayısı, sürgün uzunluğu ve taze ağırlık bakımından daha verimli bulunmuştur. Niemenak et al. (2013), *Xanthosoma sagittifolium* bitkiciklerinin geçici daldırma sistemlerinde büyük ölçekli çoğaltımı amacıyla yaptıkları çalışmada, biyoreaktörde elde edilen çoğaltma katsayılarının yarı katı kültürler ile karşılaştırıldığında 97 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Yarı katı kültür sistemleri, sıvı kültür sistemleri, RITA biyoreaktörler ve balon tip geçici daldırma biyoreaktörlerden elde edilen mikrosürgünlerin köklenme oranları ve aklimatizasyon başarıları karşılaştırıldığında kültür tipinin istatistiki olarak önemli olmadığı görülmüştür. Bu durum verimliliği yüksek sıvı kültürlerde oluşan sürgünlerin, yarı katı kültürlerdekine benzer şekilde olmalarının bir sonucu olabilir. Bununla birlikte, Berthouly and Etienne (2005), geçici daldırma sistemlerinin daha başarılı aklimatizasyon ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Dewir et al. (2006), biyoreaktörlerde çoğaltılan *Spathiphyllum* sürgünlerinde yüksek köklendirme (%100) ve aklimatizasyon (%100) başarıları elde etmişlerdir. Wang et al. (2012), *G. paniculata* sürgünlerinin üretimi için hava kaldırmalı reaktörleri kullandıkları çalışmada %65 köklendirme ve %23.3 aklimatizasyon başarıları bildirmişlerdir. Rizvi and Kukreja (2014), *Chlorophytum borivillianum* bitkilerinin 5 l mekanik karıştırıcı biyoreaktörde çoğaltımı ve çoğaltılan mikrosürgün demetlerinin yine sıvı kültürlerde köklendirilmesi (köklendirme başarıları %100) ve köklü bitkiciklerin cam alıştırma seralarında dış koşullara aktarımı (aklimatizasyon oranı %85) başarıyla sağlamıştır.

6. ÖNERİLER

Sera ve arazi koşullarında bulunan fidanlardan elde edilen eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemlerine göre kontaminasyon durumları incelendiğinde, arazi koşullarında bulunan fidanların dış etkenlerle yoğun şekilde bulaşık olması sebebiyle bu bitkilerden elde edilen eksplantların sterilizasyonları başırlanamamıştır. Ayrıca bu bitkilerin virüs taşıma riskleri de bulunmaktadır. Bu risklerin elimine edilmesi için doku kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere eksplant kaynağı olan donör bitkilerin çift tül sistemli gölge evlerinde muhafaza edilmesi ve içsel kontaminasyon risklerinin azaltılması için sistemik ilaçları da içeren rutin ilaçlama programları ile pest kontrol yapılması önerilebilir. Donör bitkilerin virüsten ari olduklarından emin olunabilmesi için gölge evine alınmadan önce ve her yıl virüs analizlerinin yaptırılması önemlidir.

Myrobolan B ile ilgili doku kültürü çalışmalarında en sık karşılaşılan problemler yüksek vitrifikasyon oranları ile düşük köklenme oranlarıdır. Yarı katı kültürlerde vitrifikasyon probleminin çözümü için MS gibi düşük tuz oranı içeren besin ortamlarının kullanımı önerilmektedir. Yapılan çalışmalarda WPM ortamında daha yüksek vitrifikasyon oranı gözlenmiştir. Köklendirme oranının artırılması için besin ortamı nutrient içeriğı azaltılarak bitkinin strese sokulması böylece kök gelişiminin teşviki sağlanabilir.

Küçük ölçekte sıvı kültürlerde karıştırma ve destek materyalinin kullanılmadığı erlenlerde çok yüksek vitrifikasyon ve morfofizyolojik bozukluklar gözlenmiştir. Küçük ölçekte bu problemlerin çözümü için geçici daldırma sistemine benzer destek materyali kullanılmıştır. Ancak erlen denemelerinde filtre kağıttan yapılan köprüler eksplantların üzerinde durması için uygun olmadıklarından eksplantlar karıştırma ya da erlenlerin taşınması esnasında sıvı ortama düşerek kısa süre içinde boğulmuşlardır. Bu problemin çözümü için küçük ölçek denemelerinde kullanılmak üzere erlen içine monte edilebilecek, paslanmaz çelik ya da otoklava dayanıklı plastik malzemeden elek tipinde destek materyali tasarlanabilir.

RITA biyoreaktörlerde yapılan optimizasyon çalışmalarında vitrifikasyon

oranını azaltmak ve sürgün gelişimini artırmak için daldırma sıklığı optimize edilirken daldırma süresi optimize edilmemiştir. Verimliliğin artırılabilmesi için daldırma süresi ile ilgili yeni denemeler yapılmalıdır.

pH, sıcaklık, ışık, havalandırma, mineral konsantrasyonu, ortam hacmi ve viskozitesi gibi parametrelerin *in vitro* bitkiciklerin çeşitli besin elementleri alım oranlarını etkiledikleri bilinmektedir (Ziv, 1999). Sıvı kültürlerde gelişen bitki hücreleri besin ortamları ile daha iyi temasta oldukları için, besin elementleri alımı ve tüketimi daha hızlıdır. Bu sebeple sıvı kültürlerde besin ortamı içeriklerinin optimize edilmesi amacıyla yeni denemeler kurulmalıdır.

Kültürlerin muhafaza edildiği büyüme odalarının sıcaklıkları mikroçoğaltım oranını etkilemektedir. Kültürler genellikle gece ve gündüz ortalama $24\pm4^{\circ}\text{C}$ 'de tutulmakla birlikte bazı bitkilerde gece ve gündüz arasındaki sıcaklık farklılıkları mikroçoğaltım oranlarını etkilediği için RITA biyoreaktörler ve 5 l balon tip geçici daldırma reaktör için sıcaklık değeri optimize edilebilir.

İnokulasyon yoğunluğunun yanı sıra, eksplant tipi ve büyüklüğü de mikroçoğaltım için önemli parametrelerdendir. Bitkicik oluşturma özelliğine sahip, çoklu sürgün tomurcukları, protocorm benzeri yapılar, meristematik dokular, somatik embriyolar ve aksiler tomurcuklara sahip sürgün ya da gövde gibi rejeneratif dokular inokulum olarak kullanılabilir. Myrobolan B bitkicikleri için inokulum morfolojisi ve optimum büyüklüğünün belirlenmesi amacıyla yeni denemeler kurulmalıdır.

Balon tip geçici daldırma biyoreaktörlerde, RITA biyoreaktörlerden daha üstün olarak N_2 , O_2 ve CO_2 gaz besleme sistemi, pH ve çözülmüş oksijen konsantrasyonu kontrolü, besin ortamının kültürden bağımsız değiştirilmesi gibi özellikleri bulunmasına rağmen, aynı koşullarda üretim parametreleri değerleri daha düşük ve vitrifikasyon oranları daha yüksek bulunmuştur. Balon tip geçici daldırma reaktörlerde daha verimli mikroçoğaltım için inokulasyon yoğunluğu, daldırma süresi ve sıklığı, besin ortamı nutrient içeriği, miktarı, pH'ı ve çözülmüş oksijen oranı, altkültür süresi, ışık yoğunluğu, gaz karışım oranları optimize edilmelidir.

Sıvı kùltùrlerden elde edilen mikrosùrgùnlerin yarı katı kùltùr koşullarında köklendirilmesi yüksek işçilik sebebiyle oldukça maliyetli bir aşama olarak karşımıza çıkmaktadır. RITA biyoreaktörlerden ya da balon tip geçici daldırma reaktörlerden hasat edilen sürgün demetleri sera içinde tek tek ayrılarak *ex vitro* köklendirme için viyollere dikilebilir. Böylece daha düşük maliyet ile mikroçoğaltım prosesi tamamlanabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adelbeg, J.**, 2005, Efficiency in Thin-Film Liquid System for *Hosta* micropropagation, 443–457. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Afreen, F.**, 2006, Temporary Immersion Bioreactor Engineering Considerations and Applications in Plant Micropropagation, 187–201. Plant Tissue Culture Engineering, Gupta, S. D. and Ibaraki, Y. (eds.), Springer, Netherlands, 480p.
- Albany, N., Gonzalez, E. J., Vilchez, J., García, L., Feria, M. D., Naivy, P. N., Sarria, Z., Pérez, B. and Clavelo, J.**, 2005, Use of Growth Retardants for Banana (*Musa AAA* cv. Grand Naine) Shoot Multiplication in Temporary Immersion Systems, 213-224. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y. and Çiftçi, Y. Ö.**, 2014, Micropropagation of the Pistachio and Its Rootstocks by Temporary Immersion System, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 117: 65-76 pp.
- Akdeniz İhracatçı Birliği Genel Sekreterliği**, 2014. Yaş Meyve Sebze İhracatçıları Birliği Değerlendirme Raporu, 2013/2014 Ocak-Ağustos Dönemi, http://www.akib.org.tr/tr/ihracat-arastirma-raporlari-yas_meyve-sebze-ihracatcilari-birligi.html (Erişim Tarihi: 30 Eylül 2014).
- Aragon, C. E., Sanchez, C., Gonzalez-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L. and Amancio, S.**, 2014, Comparison of Plantain Plantlets Propagated in Temporary Immersion Bioreactors and Gelled Medium During *In Vitro* Growth and Acclimatization, Biologia Plantarum 58 (1): 29-38 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arencibia, A. D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, C., Bravo, C. and Garcia-Gonzales, R., 2013a**, An Approach for Micropropagation of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Plants Mediated by Temporary Immersion Bioreactors (TIBs), American Journal of Plant Sciences 4: 1022-1028 pp.
- Arencibia, A. D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B. and García-Gonzales, R., 2013b**, Establishment of Photomixotrophic Cultures for Raspberry Micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs), Scientia Horticulturae 160: 49-53 pp.
- Arıcı, S. E., 2008**, Bazı Sert Çekirdekli Meyve Anaçlarının Doku Kültürü ile Çoğaltılması, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 3(1): 19-23 s.
- Ayanoglu, H., Bayazit, S., Inan, G., Bakir, M., Akpınar, A. E., Kazan, K. and Ergul, A., 2007**, AFLP Analysis of Genetic Diversity in Turkish Green Plum Accessions (*Prunus cerasifera* L.) Adapted to the Mediterranean Region, Scientia Horticulturae 114: 263–267 pp.
- Berthouly, M. and Etienne, H., 2005**, Temporary Immersion System: A New Concept for Use Liquid Medium in Mass Propagation, 165-195. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Burgos, L., Petri, C. and Badenes, M. L., 2007**, *Prunus spp.*, 283-300. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 60. Transgenic Crops V, Pua, E. C. And Davey, M. R. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, 563p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chin, W. S., Shaw, J., Haberle, R., Wen, J. and Potter, D.,** 2014, Diversification of Almonds, Peaches, Plums and Cherries - Molecular Systematics and Biogeographic History of *Prunus* (Rosaceae), Molecular Phylogenetics and Evolution 76: 34-48 pp.
- Chin, W. Y. W., Annuar, M. S. M, Tan, B. C. and Khalid, N.,** 2014, Evaluation of A Laboratory Scale Conventional Shake Flask and Abioreactor on Cell Growth and Regeneration of Banana Cell Suspension Cultures, Scientia Horticulturae 172: 39-46 pp.
- Curtis, W. R.,** 2005, Application of Bioreactor Design Principles to Plant Micropropagation, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81: 255–264 pp.
- Curtis, W. R. and Tuerk, A. L.,** 2006, Oxygen Transport in Plant Tissue Culture Systems, Oxygen Transport Limitations, 173–186. Plant Tissue Culture Engineering, Gupta, S. D. and Ibaraki, Y. (eds.), Springer, Netherlands, 480p.
- Çalışır, S., Haciseferoğulları, H., Özcan, M. and Arslan, D.,** 2005, Some Nutritional and Technological Properties of Wild Plum (*Prunus spp.*) Fruits in Turkey, Journal of Food Engineering 66: 233–237 pp.
- Damiano, C., La Starza, S. R., Monticelli, S., Gentile, A., Caboni, E. and Frattarelli, A.,** 2005, Propagation of *Prunus* and *Malus* by Temporary Immersion, 243–251. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Debnath, S. C.,** 2014, Bioreactor-Induced Adventitious Shoot Regeneration Affects Genotype-Dependent Morphology But Maintains Clonal Fidelity in Red Raspberry, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 1-12 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dewir, Y. H., Chakrabarty, D., Hahn, E. J. and Paek, K. Y.,** 2006, A Simple Method For Mass Propagation of *Spathiphyllum cannifolium* Using An Airlift Bioreactor, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42: 291–297 pp.
- Dey, S.,** 2005, Cost-Effective Mass Cloning of Plants in Liquid Media Using A Novel Growtek Bioreactor, 127–141. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Durmuş, E. ve Yiğit, A.,** 2003, ‘Türkiye’nin Meyve Üretim Yöreleri’, Fırat Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi 13 (2): 23-54 s.
- Ertekin, C., Gözlekçi, S., Kabaş, O., Sönmez, S. and Akıncı, I.,** 2006, Some Physical, Pomological and Nutritional Properties of Two Plum (*Prunus domestica* L.) Cultivars, *Journal of Food Engineering* 75: 508–514 pp.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y. and Borroto, C. G.,** 1999, Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) Micropropagation in Temporary Immersion Systems, *Plant Cell Reports* 18: 743–748 pp.
- Escalona, M., Samson, G., Borroto, C. and Desjardins, Y.,** 2003, Physiology of Effects of Temporary Immersion Bioreactors on Micropropagated Pineapple Plantlets, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 39: 651–656 pp.
- Farahani, F. and Majd, A.,** 2012, Comparison of Liquid Culture Methods and Effect of Temporary Immersion Bioreactor on Growth and Multiplication of Banana (*Musa*, cv. Dwarf Cavendish), *African Journal of Biotechnology* 11 (33): 8302-8308 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fei, L., Weathers, P. J.**, 2014, From Cells to Embryos to Rooted Plantlets in A Mist Bioreactor, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 116: 37-46 pp.
- Fotopoulos, S. and Sotiropoulos, T.E.**, 2005, *In vitro* rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and exposure to darkness for a period, *Agronomy Research* 3 (1), 3–8 pp.
- Gao, R., Wu, S. Q., Piao, X. C., Park, S. Y. and Lian, M. L.**, 2014, Micropropagation of *Cymbidium sinense* Using Continuous and Temporary Airlift Bioreactor Systems, *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 117–124 pp.
- Gençtan, T., Tugay, M. E., Geçit, H. H., Bozkurt, B., Ergun, E., Ekiz, H., Yalvaç, K., Gevrek, M. N., Elçi, A. ve Balkan, A.**, 2008, Türkiye’de Tohumluk, Fide ve Fidan Üretimi ve Kullanımı, www.zmo.org.tr/resimler/ekler/4306d99c63613fa_ek.pdf?tipi=14&sube (Erişim Tarihi: 30 Eylül 2014).
- Gonzalez, J. G.**, 2005, Mass Propagation of Tropical Crops in Temporary Immersion Systems, 197-211. *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation*, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Georgiev, M. I., Eibl, R. and Zhong, J. J.**, 2013, Hosting the Plant Cells *In Vitro*: Recent Trends in Bioreactors, *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 3787–3800 pp.
- Georgiev V., Schumann A., Pavlov A. and Bley T.**, 2014, Temporary Immersion Systems in Plant Biotechnology, *Engineering in Life Science* 00: 1-15 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grigoriadou, K., Vasilakakis, M., Tzoulis, T. and Eleftheriou, E.P.,** 2005, Experimental Use of a Novel Temporary Immersion System for Liquid Culture of Olive Microshoots, 263–274. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Hahn, E. J. and Paek, K. Y.,** 2005, Multiplication of Chrysanthemum Shoots in Bioreactors as Affected by Culture Method and Inoculation Density of Single Node Stems, 143–153. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Hempfling, T. and Preil, W.,** 2005, Application of A Temporary Immersion System in Mass Propagation of Phalaenopsis, 231–242. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Hernandez, F., Pinochet, J., Moreno, M. A., Martinez, J. J. and Legua, P.,** 2010, Performance of *Prunus* Rootstocks for Apricot in Mediterranean Conditions, *Scientia Horticulturae* 124: 354–359 pp.
- Higashide, T., Narukawa, M., Shimada, Y. and Soeno, K.,** 2014, Suppression of Elongation and Growth of Tomato Seedlings by Auxin Biosynthesis Inhibitors and Modeling of the Growth and Environmental Response, *Scientific Reports* 4: 45-56 pp.
- Hohe, A. and Reski, R.,** 2005, Control of Growth and Differentiation of Bioreactor Cultures of *Physcomitrella* by Environmental Parameters, 155–161. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Horvath, A., Balsemin, E., Barbot, J. C., Christmann, H., Manzano, G., Reynet, P., Laigret, F. and Mariette, S.,** 2011, Phenotypic Variability and Genetic Structure in Plum (*Prunus domestica* L.), Cherry Plum (*P. cerasifera* Ehrh.) and Sloe (*P. spinosa* L.), *Scientia Horticulturae* 129: 283-293 pp.
- Hossain, S. N., Munshi, M. K., Islam, M. R., Hakim, L. and Hossain, M.,** 2003, *In Vitro* Propagation of Plum (*Zyziphus jujuba* Lam.), *Plant Tissue Culture* 13(1): 81-84pp.
- Hrotko, K.,** 2008, Progress In Tree Fruit Nursery And Rootstock Research, Session II Plant Propagation And Rootstock Breeding, Scientific Papers Of The Research Institute For Fruit Growing Pitesti, XXIV: 56-62 pp.
- Ionica, M. E., Nour, V., Trandafir, I., Cosmulescu, S. and Botu, M.,** 2013, Physical and Chemical Properties of Some European Plum Cultivars (*Prunus domestica* L.)' *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 41 (2): 1-6 pp.
- Jackson, M. B.,** 2005, Aeration Stress in Plant Tissue Cultures, 459-473. *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation*, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Jakab, I. Zs., Pamfil, D., Clapa, D. and Fira, A.,** 2008, *In Vitro* Regeneration and Meristem Culture of *Prunus Domestica* Cv.', University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine (UASVM), *Horticulture* 65 (1).
- Jin, M. Y., Piao, X. C., Xiub, J. R., Park, S. Y. and Liana, M. L.,** 2013, Micropropagation Using a Bioreactor System and Subsequent Acclimatization of Grape Rootstock '5BB Jina', *Scientia Horticulturae* 164: 35-40 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kara, N.**, 2011, Uçucu Yağ Üretimine Uygun Lavanta (*Lavandula Sp.*) Çeşitlerinin Belirlenmesi ve Mikroçoğaltım Olanaklarının Araştırılması, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 178s (yayımlanmamış).
- Karakaya, G., Seferoğlu, H. G., Kankaya, A. ve Tekintaş, F. E.**, 2006, Farklı Anaçlara Aşılı Santa Rosa ve Özark Premier Erik Çesitlerinin Aydın Ekolojisindeki Gelişme Durumları, Adnan Menders Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 3 (2): 85-93 s.
- Karamürsel, Ö. F.**, 2011, Erik Yetiştiriciliği, Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Yayın No: 6.
<http://arastirma.tarim.gov.tr/marim/Menu/6/Yetistiricilik-Bilgileri> (Erişim tarihi 15.11.2014)
- Kashyap, B. and Dhiman, SR.**, 2011, Effect of media on hardening of *in vitro* multiplied plantlets of gloxinia and saintpaulia under low cost polytunnels International Journal of Farm Sciences 1 (2): 63-67 pp.
- Kintzios, S., Kollias, H., Straitouris, E. and Makri, O.**, 2004, Scale-up Micropropagation of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) in An Airlift Bioreactor and Accumulation of Rosmarinic Acid, Biotechnology Letters 26: 521–523pp.
- Koçal, H.**, 2011, Kayısı Yetiştiriciliği, Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Yayın No: 7.
<http://arastirma.tarim.gov.tr/marim/Menu/6/Yetistiricilik-Bilgileri> (Erişim tarihi 15.11.2014)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Konstas, J. and Kintzios, S.,** 2003, Developing A Scale-up System for The Micropropagation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.): The Effect of Growth Retardants, Liquid Culture and Vessel Size, *Plant Cell Reports* 21:538–548 pp.
- Mansuroğlu, S. and Gürel, E.,** 2001, Mikroçoğaltım, 262-281. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. (Ed), Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya, 374s.
- Mariateresa, C., Maria, C. S. C. and Giuseppe, C.,** 2014, Influence of Ozone Treatments on *In Vitro* Propagation of *Aloe barbadensis* in Continuous Immersion Bioreactor, *Industrial Crops and Products* 55: 194–201 pp.
- Niemenak, N., Noah, M. A. and Omokolo, N. D.,** 2013, Micropropagation of Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) in Temporary Immersion Bioreactor, *Plant Biotechnology Reports* 7: 383–390 pp.
- Özkaynak, E., Samancı, B.,** 2005, Mikroçoğaltımda Alıştırma, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 19 (36): 28-36 s.
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D. and Hahn, E. J.,** 2005, Application of Bioreactor Systems for Large Scale Production of Horticultural and Medicinal Plants, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81: 287–300 pp.
- Paek, K. Y., Hahn, E. and Son, S.,** 2001, Application of Bioreactors for Large-Scale Micropropagation Systems of Plants, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37: 149-157pp.
- Pati, P. K., Sharma, M., Sood, A. and Ahuja, P. S.,** 2005, Micropropagation of *Rosa damascena* and *R. bourboniana* in Liquid Cultures, 373–385. *Liquid Culture Systems for In Vitro Plant Propagation*, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Persson, J.**, 2012, Evaluation of A New Type of Temporary Immersion System (TIS) Bioreactors For Plant Micropropagation, Degree Project for MSc Thesis in Horticulture, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Faculty of Landscape Planning, Horticulture and Agricultural Sciences, Department of Plant Breeding and Biotechnology, 41p.
- Polzin, F., Sylvestre, I., Déchamp, E., Ilbert, P., Etienne, H. and Engelmann, F.**, 2014, Effect of Activated Charcoal on Multiplication of African Yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) Nodal Segments Using a Temporary Immersion Bioreactor (RITA®), *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 50: 210–216 pp.
- Ptak, A., Simlat, M., Kwiecie, M. and Laurain-Mattar, D.**, 2013, *Leucojum aestivum* Plants Propagated in *In Vitro* Bioreactor Culture and on Solid Media Containing Cytokinins, *Engineering in Life Science* 13: 261–270 pp.
- Quiala, E., Jiménez-Tello, V. M., Barbón, R., Chávez, M., Feria, M. D., La O, M. and Perez, M.**, 2014, Influence of 6-Benzyladenine and gelling agent on the reduction of hyperhydricity in *Tectona grandis* L., *Revista Colombiana de Biotecnología* XVI: 129-136 pp.
- Rathore, J. S., Rathore, V., Shekhawat, N. S., Singh, R. P., Liler, G., Phulwaria, M., Dagla, H. R.**, 2004, Micropropagation of Woody Plants, 195-205. *Plant Biotechnology and Molecular Markers*, Srivastava, P. S., Narula, A. and Srivasta, S., (Eds.), Anamaya Publishers, India, 400p.
- Reed, M. B. Wada, S., DeNoma, J. and Niedz, R. P.**, 2013, Mineral nutrition influences physiological responses of pear *in vitro*, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 49: 699–709 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rizvi, Z. M. and Kukreja, A. K.,** 2014, Micropropagation of an Endangered Medicinal Herb *Chlorophytum borivillianum* Sant. Et Fernand in Bioreactor, African Journal of Biotechnology 13 (17): 1772-1778 pp.
- Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J., Sandoval, J. and Debergh, P.,** 2005, Optimization of Plantain (*Musa AAB*) Micropropagation by Temporary Immersion System, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82: 57 – 66 pp.
- Ruffoni, B., Savona, M., Doveri, S., Pamato, M. and Carli, S.,** 2005, Micropropagation of *Ixia* Hybrids in Liquid Medium, 365-372. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K. and Therios, I.,** 2014, *In Vitro* Plant Regeneration From Leaf Explants of the Cherry Rootstocks CAB-6P, Gisela 6. and MxM 14 Using Sodium Nitroprusside, *In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant 50: 226 – 234 pp.
- Savangikar, V. A., Savangikar, C., Daga, R. S. and Pathak, S.,** 2005, Potentials for Cost Reduction in a New Model of Commercial Micropropagation, 403-414. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Scherer, R. F., Garcia, A. C., Fraga, H. P. F., Vesco, L. L. D., Steinmacher, D. A. and Pedro, M. P.,** 2013, Nodule Cluster Cultures and Temporary Immersion Bioreactors as A High Performance Micropropagation Strategy in Pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*), Scientia Horticulturae 151: 38 – 45 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shaik, S., Dewir, Y. H., Singh, N. and Nicholas, A.,** 2010, Micropropagation and Bioreactor Studies of The Medicinally Important Plant *Lessertia* (Sutherlandia) *frutescens* L., South African Journal of Botany 76: 180 – 186 pp.
- Sponsel, V. M. and Peter, H.,** 2010, Gibberellin biosynthesis and inactivation, 63-94. Plant Hormones, Davies, P. J. (Ed), Springer, Netherlands, 802 p.
- Sutherland, B. G., Cerovib, R., Robbins, T. P. and Tobutt, K. R.,** 2009, The Myrobalan (*Prunus cerasifera* L.): A Useful Diploid Model for Studying The Molecular Genetics of Self-incompatibility in Plums', Euphytica 166: 385 – 398 pp.
- Takayama, S. and Akita, M.,** 2008, Bioengineering Aspects of Bioreactor Application in Plant Propagation, 86 - 100. Plant Tissue Culture Engineering, Gupta, S. D. and Ibaraki, Y. (eds.), Springer, Netherlands, 480p.
- Tian, L. and Sibbald, S. I.,** 2007, Micropropagation of *Prunus domestica* and *Prunus salicina* Using Mature Seeds, 373–379. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits, S. M. Jain and H. Häggman (eds.), Springer, 559p.
- Tsvetkov, I., Dzhambazova, T., Evstratios, S. and Xiloyannis, C.,** 2013, Effect of Biotization on Grafting Success of The Plants in Fruit Nursery, World Research Journal of Agronomy 2 (1): 11-14 pp.
- Tülay, S.,** 2003, Kayısı Sektör Araştırması, İstanbul Ticaret Odası, Dış Ticaret Şubesi, Araştırma Servisi, <http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-54.pdf> (Erişim Tarihi 15 Kasım 2014).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı**, 2014, Yaş Meyve ve Sebze Sektörü, Sektör Raporları, <http://www.ibp.gov.tr/pg/sektorpdf/tarim/yasmeyvesebze.pdf> (Erişim Tarihi 30 Eylül 2014).
- Türkiye Cumhuriyeti Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı**, 2014, Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü (GTHB BÜGEM) Faaliyetleri, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü, <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf> (Erişim Tarihi: 30 Eylül 2014).
- Türkiye İstatistik Kurumu Başkanlığı**, 2014, Bitkisel Üretim İstatistikleri Raporu 2013. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim Tarihi: 30 Eylül 2014).
- Ünal, R. M.**, 2010, 'Kayısı Araştırma Raporu' T.C. Fırat Kalkınma Ajansı, <http://www.fka.org.tr/ContentDownload/FKA%20KAYISI%20RAPORU.pdf>, (Erişim Tarihi 26.11.2014).
- Vujovic, T., Ruzic, Dj. and Cerovic, R.**, 2012, *In Vitro* Shoot Multiplication as Influenced by Repeated Subculturing of Shoots of Contemporary Fruit Rootstocks, Horticultural Science (Prague) 39 (3): 101 – 107 pp.
- Wang, M. S, Piao, X. C., Park, Y. S. and Lian, L. M.**, 2012, Improved Micropropagation of *Gypsophila paniculata* with Bioreactor and Factors Affecting *Ex Vitro* Rooting in Microponic System', *In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant 49: 70 – 78 pp.
- Wawrosch, C., Kongbangkerd, A., Köpf, A. and Kopp, B.**, 2005, Shoot Regeneration From Nodules of *Charybdis* sp.: A Comparison of Semisolid, Liquid and Temporary Immersion Culture Systems, 275–280. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvosllef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yahyaoğlu, Z., Turna, İ. ve Genç, M.,** 2007, Genetik Yapı ve Üretim Materyali, 13-34. Fidan Standardizasyonu, Standart Fidan Yetiştiricinin Biyolojik ve Teknik Esasları, Yahyaoğlu, Z. ve M. Genç (Ed), Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, Isparta, 555s.
- Zhu, L. H., Li, X. Y. and Welander, M.,** 2005, Optimisation of Growing Conditions for The Apple Rootstock M26 Grown in RITA Containers Using Temporary Immersion Principle, 253–261. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Ziv, M.,** 1999, Bioreactor Technology for Plant Micropropagation, 1-30. Horticultural Reviews Volume 24. Janick J. (Ed), John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK, 456p.
- Ziv, M.,** 2005, Simple Bioreactors for Mass Propagation of Plants, 79–93. Liquid Culture Systems for *In Vitro* Plant Propagation, Hvoslef-Eide, A. K. and Preil, W. (Eds.), Springer, Netherlands, 588p.
- Zou N. Y.,** 2010, ‘Micropropagation of Chinese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) Using Mature Stem Segments’, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, 38 (3): 214 – 218 pp.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Kütahya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir ilinin Dikili ilçesinde tamamladıktan sonra 2001 yılında Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümünü kazandı. 2005 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak Biyomühendis ünvanını aldı. Aynı yıl Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansa başladı. 2007 yılında “Karabaş Otu (*Lavandula stoechas* L.) Bitkisinin Farklı *In Vitro* Ortamlarda Kültüre Alınması” başlıklı Yüksek Lisans Tezi’ni tamamladı. 2007 yılında yine Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Doktora yapmaya başladı. Yüksek Lisans süresince Ar&Ge mühendisi olarak çalıştığı özel bir bitki doku kültürü laboratuvarında halen üretim müdürü olarak görevine devam ediyor.