EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

MAXMA 14 DELBARD® BROKFOREST (*PRUNUS MAHALEB* X *PRUNUS AVIUM*) KİRAZ MEYVE ANACININ KLONAL ÇOĞALTIMI VE İKİ YENİ BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE GENİŞ ÖLÇEKLİ ÜRETİMİ

Arif ANSIZ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 05.08.2015

Bornova-İZMİR

2015

Arif Ansız tarafından **Yüksek Lisans** tezi olarak sunulan "**Maxma 14 Delbard® Brokforest (*Prunus mahaleb* X *Prunus avium*) Kiraz Meyve Anacının Klonal Çoğaltımı ve İki Yeni Biyoreaktör Sisteminde Geniş Ölçekli Üretimi**" 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 05.08.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:	**İmza**
Jüri Başkanı:	**.....**
Raportör Üye:	**.....**
Üye :	**.....**

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "**Maxma 14 Delbard® Brokforest (*Prunus mahaleb* X *Prunus avium*) Kiraz Meyve Anacının Klonal Çoğaltımı ve İki Yeni Biyoreaktör Sisteminde Geniş Ölçekli Üretimi**" 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.

05 / 05 / 2015

İmzası

Adı-Soyadı

ÖZET

MAXMA 14 DELBARD® BROKFOREST (*PRUNUS MAHALEB* x *PRUNUS AVİUM*) KİRAZ MEYVE ANACININ KLONAL ÇOĞALTIMI VE İKİ YENİ BİYOREAKTÖR SİSTEMİNDE GENİŞ ÖLÇEKLİ ÜRETİMİ

ANSIZ, Arif

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Ağustos, 2015, 56 sayfa

Yeni biyoreaktör sistemlerinin tasarımı yoluyla mikroçoğaltımın otomasyonu, ticarileşme ve üretim maliyetlerinin düşürülmesi açısından çok önemlidir. Bu çalışmada, Maxma 14 Delbard® Brokforest (*Prunus mahaleb* x *Prunus avium*) kiraz meyve anacının klonal çoğaltımı için iki farklı biyoreaktör tasarlanmıştır. Bu reaktörlerden biri geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktör, diğeri ise geçici yağmurlama prensibine dayanan biyoreaktördür. Bu amaçla Maxma 14 Delbard® Brokforest kiraz anaçlarını kültüre almak için öncelikle farklı konsantrasyonlarda BAP (6-*Benzylaminopurin*), IBA (*Indole-3-butyric acid*) ve NAA (1-*Naphthaleneacetic acid*) içeren MS (Murashige and Skoog, 1962) ve WPM (Lloyd & McCown, 1980) yarı katı ortamları Algen Tarım ve Gıda San. Tic. Ltd. Şti. firmasında kullanılan yarı katı ticari ortamla kıyaslanmışlardır. Ticari ortam en yüksek sağlıklı çoklu sürgün oluşum oranını (%100) gösterdiği için biyoreaktör çalışmalarında sıvı besin ortamı olarak agarsız ticari ortam kullanılmıştır. Biyoreaktörlerde sürgün çoğaltım işlemi gerçekleştirildikten sonra elde edilen sürgünler *ex vitro* ortamlarda köklendirilmişlerdir. Geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde sürgün çoğaltımında 5,03 çoğaltım katsayısı sağlanmıştır ve elde edilen sürgünler %73,12 oranında köklendirilerek aklimatize edilmiştir. Geçici yağmurlama prensibi ile çalışan biyoreaktörde ise 7,29 çoğaltım katsayısı sağlanırken elde edilen sürgünlerin %93,22'si köklendirilerek aklimatize edilmişlerdir.

Anahtar sözcükler: Biyoreaktör, meyve anacı, kiraz, mikroçoğaltım.

ABSTRACT

MICROPROPAGATION AND LARGE SCALE PRODUCTION OF MAXMA 14 DELBARD® BROKFOREST (*PRUNUS MAHALEB* X *PRUNUS AVİUM*) SWEET CHERRY ROOTSTOCKS IN TWO NEW DESIGNED BIOREACTORS

ANSIZ, Arif

MSc in Bioengineering.

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GÜREL

August, 2015, 56 pages

Automation of micropropagation processes via design of new bioreactor systems is very important for commercialization and reducing of production cost. In this study, two new type bioreactors are designed for micropropagation of Maxma 14 Delbard® Brokforest (*Prunus mahaleb* x *Prunus avium*) sweet cherry rootstocks. These reactors are temporary immersion bioreactor with shelves and temporary sprinkling bioreactor with shelves. We have compared MS (Murashige and Skoog, 1962) and WPM (Lloyd & McCown, 1980) medium which include BAP (6-*Benzylaminopurine*), IBA (*Indole-3-butyric acid*) ve NAA (1-*Naphthaleneacetic acid*) with different concentration with commercial multiplication medium of Algen Tarım ve Gıda San. Tic. Ltd. Şti. We have provided the highest healthy shoot rate (%100) in the commercial multiplication medium, because of this we have used this medium without agar as liquid medium for bioreactors. We have propagated shoots in bioreactors and then we have rooted and made acclimatization successfully. In the temporary immersion bioreactor with shelves, we have provide 5.03 multiplication rate and 73.12% rooting and acclimatization efficiency. In the temporary sprinkling bioreactor with shelves, we have provided 7.29 multiplication rate and 93.22% rooting and acclimatization efficiency.

Key words: Bioreactor, rootstocks, micropropagation, liquid culture.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bana her konuda yol gösterici olan sayın danışmanım Prof. Dr. Aynur GÜREL'e, benden desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Meltem BAYRAKTAR'a, sevgili laboratuvar arkadaşlarım Begüm AKYOL, Berk ÜNAL, Esra İLHAN, Münire EKMEKÇİGİL, Pervin GÜNTÜRKÜN KIR ve Alpaslan Şevket ACAR'a biricik eşim ve arkadaşım Irmak ANSIZ'a ve canım aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……...……..vii

ABSTRACT……..……..…ix

TEŞEKKÜR……...…… xi

1. GİRİŞ.....1

2. LİTERATÜR BİLDİRİMLERİ.....7

2.1. Yarı Katı Kültürlerde Yapılan Klonal Çoğaltım Çalışmaları.....7

2.2. Biyoreaktörlerde Yapılan Klonal Çoğaltım Çalışmaları.....9

3. MATERYAL ve METOT.....13

3.1. Materyal.....13

3.2. Metot.....14

3.2.1 Meristem dokularının alınması ve meristem kültürlerinin oluşturulması....14

3.2.2 Yarı katı besin ortamlarında sürgün çoğaltımı.....17

3.2.3 Biyoreaktör sistemleri ve çalışma mekanizmaları.....18

3.2.4 Biyoreaktörlerde sıvı kültürlerin oluşturulması.....22

3.2.5 *Ex* vitro köklendirme.....23

3.2.6 İstatistiki değerlendirme.....23

4. BULGULAR.....24

İÇİNDEKİLER(devam)

4.1. Meristem Dokularının Alınması ve Meristem Kültürlerinin Oluşturulması...24

4.2. Yarı Katı Besin Ortamlarında ve Biyoreaktörlerde Sürgün Çoğaltımı.....31

4.3. Yarı Katı Besin Ortamlarında ve Biyoreaktörlerden Elde Edilen 2cm Uzunluğundaki Sürgünlerin *Ex vitro* Köklendirilmesi 36

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 38

6. ÖNERİLER.....41

KAYNAKLAR DİZİNİ.....42

ÖZGEÇMİŞ.....46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Sayfa

1.1 2012 yılında dünya kiraz üretiminde lider ülkeler (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (a), 2015).....1

1.2 Türkiye'de yıllara göre kiraz üretim miktarları (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (a), 2015).....2

1.3 Türkiye'de yıllara göre ihraç edilen kiraz miktarı (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (b), 2015) 3

1.4 Türkiye'nin yıllara göre kiraz ihracatından elde ettiği gelir (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (b), 2015).....3

3.1 Uyur haldeki Maxma 14 Delbard® Brokforest (Prunus mahaleb x Prunus avium) kiraz meyve anacı. 13

3.2 Meristem almak üzere hazırlanmış kabinde bulunan malzemeler. 15

3.3 Kültüre alınmak üzere yaprak taslakları temizlenmiş meristem dokusu. 17

3.4 Yarı katı kültürlerde ve sıvı kültürlerde inokülasyon olarak kullanılan çoklu sürgün. 18

3.5 Geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktör bileşenleri. 19

3.6 Geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktör. 20

3.7 Geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktör bileşenleri. 21

3.8 Geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktör. 22

4.1 Meristem alma işleminden sonra elde edilen steril sürgün eksplant sayısı (adet) 25

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

4.2 Meristem alma işleminden sonra elde edilen steril sürgün eksplant yüzdesi (%) 25

4.3 İki aylık kültür süresi sonunda farklı yarı katı ortamlarda sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplantı sayısı (adet). 28

4.4 İki aylık kültür süresi sonunda farklı yarı katı ortamlarda sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplantı yüzdesi (%).....28

4.5 Bir haftalık karanlık kültürden sonra meristem görünümü 29

4.6 Kültüre alındıktan 3 hafta sonra meristem kültürlerinde sürgün ve yaprak oluşumu 30

4.7 Kültüre alındıktan 2 ay sonra meristem kültürlerinden oluşan sürgün ve yaprak gelişimleri.....30

4.8 Geçici Daldırma Prensibi ile çalışan biyoreaktörden 18 gün sonra elde edilen çoklu sürgün 34

4.9 Geçici yağmurlama prensibi ile çalışan biyoreaktörden 18 gün sonra elde edilen çoklu sürgün. 34

4.10 Yarı katı kültürlerde 26 günlük kültürden sonra oluşan çoklu sürgünler. 35

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge Sayfa

3.1 Meristem Kültürleri için kullanılan bazal ortamlar ve içerdikleri bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları (mg/L). 16

3.2 10g Köklendirme tozu hazırlamak için gerekli bileşenler ve miktarları (g). ... 23

4.1 Meristemlerden elde edilen steril sürgün eksplant sayısı (adet) ve yüzdesi (%). 24

4.2 Meristem alma işleminden sonra elde edilen steril sürgün eksplant sayılarının tek yönlü varyans analizleri 26

4.3 Farklı ortamlarda kültüre alınan meristemlerden sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplant sayısı (adet) ve yüzdesi (%). 27

4.4 Farklı ortamlarda kültüre alınan meristemlerden sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplant sayısı değerlerinin tek yönlü varyans analizi 29

4.5 Biyoreaktör sistemlerinde ve yarı katı kültürlerden kültür süresi sonunda elde edilen apikal/aksiler göz miktarları (adet) ve çoğaltım katsayıları. 31

4.6 Biyoreaktör sistemlerindeki farklı raflardan ve yarı katı kültürlerdekurulan farklı bloktaki denemelerden elde edilen apikal ve/veya aksiler sürgün uçları sayıları için tek yönlü anova analizi. 32

4.7 Biyoreaktörlerden ve yarı katı kültürlerde kültür başlangıcında ve kültür sonunda elde edilen çoklu sürgünlerin yaş ağırlık değerleri. 32

4.8 Biyoreaktör sistemlerindeki farklı raflardan ve yarı katı kültürlerde kurulan farklı bloktaki denemelerden elde edilen kültür sonundaki yaş ağırlık (g) değerleri için tek yönlü varyans analizi. 33

4.9 Sıvı kültürlerde ve yarı katı kültürlerde sürgün uzunluğu (cm) ve 2cm'den uzun sürgün sayısı (adet). 35

ÇİZELGE DİZİNİ (devam)

Çizelge Sayfa

4.10 Biyoreaktörlerden ve yarı katı kültürlerden elde edilen 2cm uzunluğunda kesilen sürgünlerden köklenen sürgün sayısı (adet) ve yüzdesi (%) 36

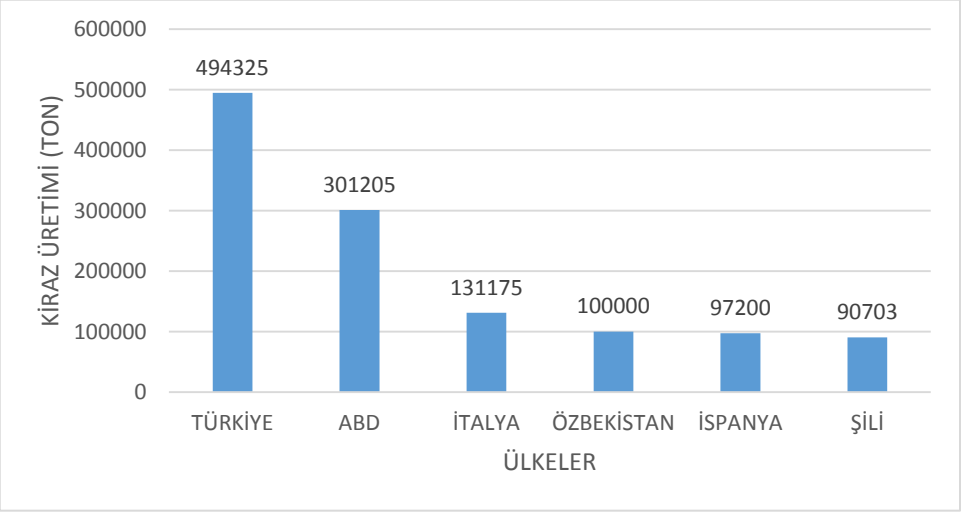
4.11 Biyoreaktör sistemlerindeki farklı raflardan ve yarı katı kültürlerde kurulan farklı bloktaki denemelerden elde edilen 2cm boyundaki sürgünlerin köklenme yüzdeleri için tek yönlü varyans analizi.....37

1. GİRİŞ

Türkiye, içerisinde bulunduğu coğrafi konumu itibariyle birçok sert ve yumuşak çekirdekli meyve türünün kolayca yetiştirilebildiği bir ülkedir. Ilıman iklim bölgelerinde yetişebilecek ürünlerin hemen hemen hepsi büyük bir çeşitlilikte ülkemizde üretilebilmektedir. Kirazın Türkiye'de yetişen tüm meyveler arasında ülke ekonomisi açısından önemli bir yeri bulunmaktadır. Türkiye'deki kiraz üretimi yıllara ve iklim koşullarına göre değişiklik göstermekle birlikte, dünya üretiminde ilk sıralarda yer almaktadır. Bu açıdan Türkiye dünyadaki kiraz üretiminde ve ihracatında söz sahibi bir ülkedir (Demiral ve Ülger, 2008; Demirtaş ve Sarısu, 2011).

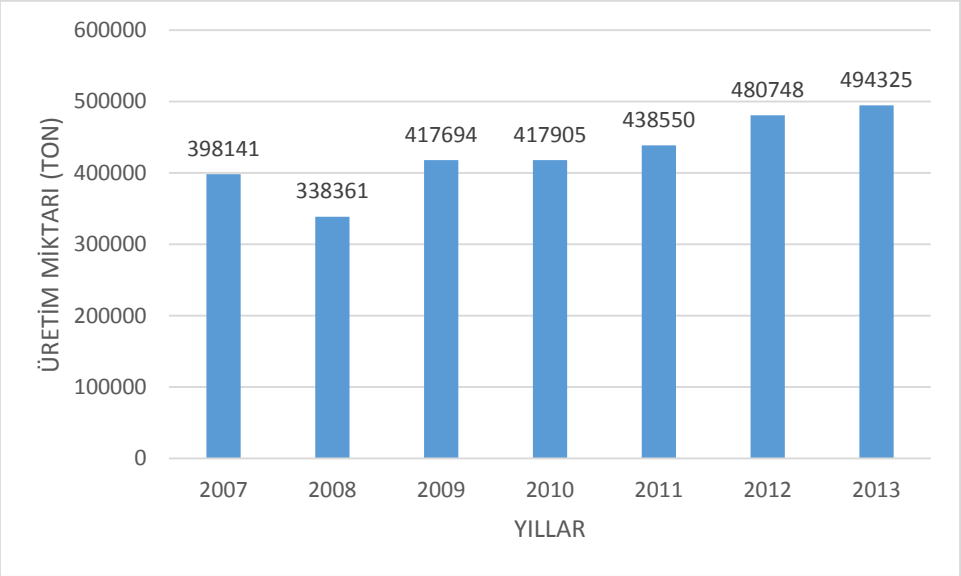
Kiraz dünyada geniş alanlarda tarımı yapılan bir meyvedir. Ancak dünya üretimindeki en büyük paya sırasıyla Türkiye, ABD ve İtalya gibi ülkeler sahiptir. Kiraz; gösterişli, insanlar tarafından sevilerek yenilen ve uluslararası pazarlarda aranan bir meyvedir. Bu sebeple son yıllarda kiraz meyvesine olan talep oldukça artmıştır (FAO, 2014; Demirtaş ve Sarısu, 2011).

FAO (Food And Agiculture Organization of The United Nations)'nun istatistik verilerine göre 2012 yılında dünyada kiraz üretimini en çok gerçekleştiren ülke 494325 ton ile Türkiye olmuştur. Türkiye'yi 301205 ton ile takip eden Amerika Birleşik Devletleri ikinci sırada kalmıştır (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division, 2015) (Şekil 1.1).



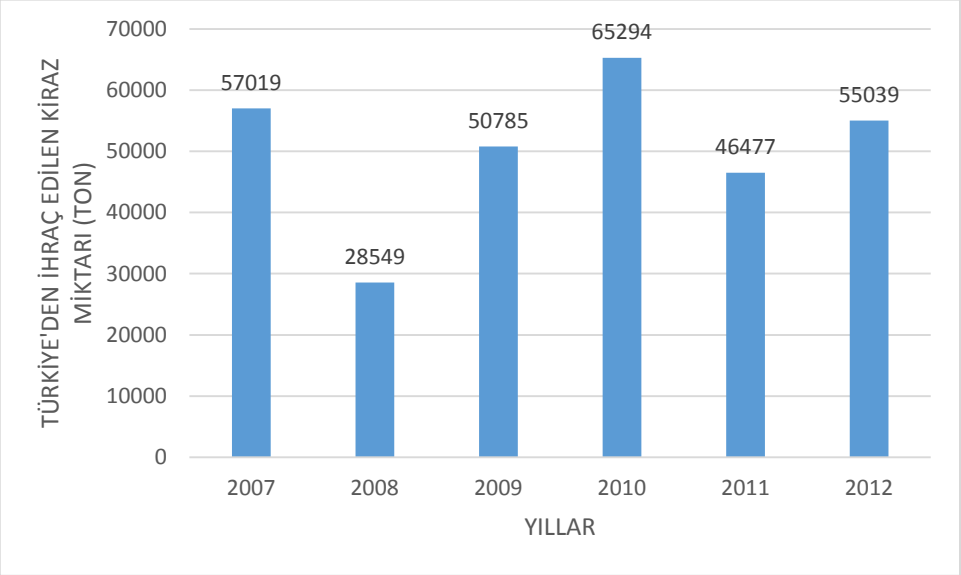
Şekil 1.1: 2013 yılında dünya kiraz üretiminde lider ülkeler (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (a), 2015)

Ülkemizde kiraz yetiştiriciliğinin önemi son yıllarda giderek artmıştır. Kiraz yetiştiriciliği için oldukça uygun ekolojiye sahip olan ülkemiz, yüksek kalitede ve yüksek miktarlarda ürün üretebilme özelliği sayesinde üretici ülkeler arasında önemli bir yere sahiptir. Modern kiraz yetiştiriciliğinde özellikle klon anaçların kullanılması ile kısa sürede ve yüksek kalitede ürün üretimi mümkün hale getirilmiştir. Bu sayede son yıllarda ihracat imkânları giderek artmış ve uluslararası pazarda bir 'Türk Kirazı' imajı oluşturulmuştur. Tüm bu etmenler sonucunda da ülkemizdeki kiraz üretimi her sene artış göstermektedir (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division, 2015; Günal, 2006) (Şekil 1.2).

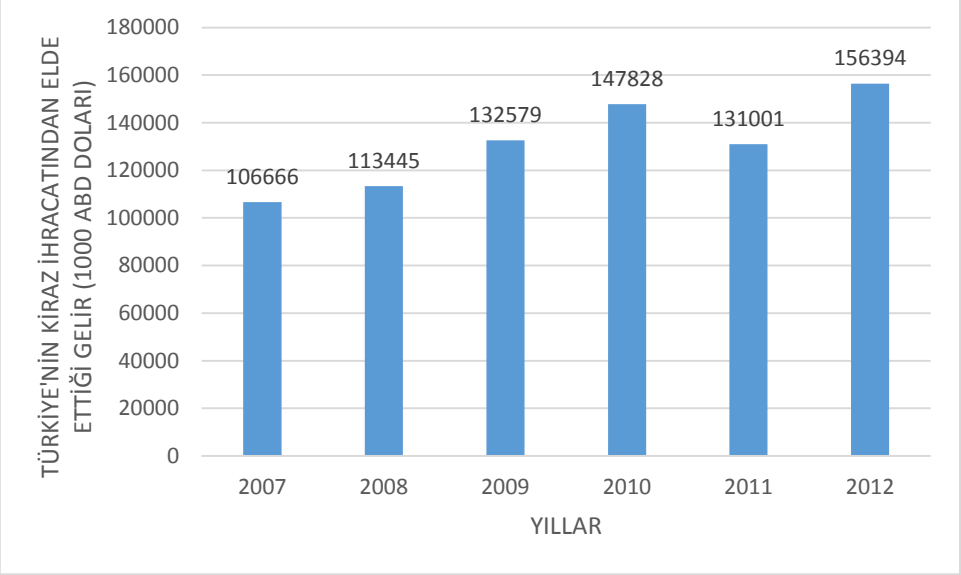


Şekil 1.2: Türkiye'de yıllara göre kiraz üretim miktarları (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (a), 2015)

Türkiye lider olduğu kiraz meyvesi üretimi yanında kiraz ihracatında da söz sahibi bir ülkedir. Türkiye'den ihraç edilen kiraz miktarı yıllara göre dalgalanma gösterse de kiraz ihracatından elde edilen gelir son yıllarda genellikle artış göstermektedir (Şekil 1.3, Şekil 1.4)



Şekil 1.3: Türkiye'de yıllara göre ihraç edilen kiraz miktarı (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (b), 2015)



Şekil 1.4: Türkiye'nin yıllara göre kiraz ihracatından elde ettiği gelir (Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (b), 2015)

Kiraz fidanı çöğür (generatif) ve klon anaçları üzerine aşılama yapılarak yetiştirilmektedir (Hepaksoy vd., 2004; Eroğul, 2012). Dünyada kiraz üretiminde ilk olarak *Prunus avium* L. ve *P. mahaleb* L. gibi çöğür anaçları kullanılmaktaydı. Çöğür anaçları, aşılama yapılan çeşitlerde standart bir fidan oluşumu göstermemekle birlikte, genellikle kiraz hasadını zorlaştıracak şekilde büyük taçlı

ve geç meyveye yatan ağaçların oluşumuna yol açmaktadırlar. Bu durum meyve elde edilme zamanını geciktirmekte ve hasat için yapılan masrafları da arttırmaktadır. Bu nedenle, aşılandığında küçük taç oluşturan, erken meyveye yatan, kritik iklim koşullarında kiraz-vişne yetiştiriciliğine olanak veren ve değişik hastalık-zararlılara dayanıklı anaçlar ıslah edilerek bu anaçların klonal çoğaltım ile çoğaltılması kiraz üretimi açısından önem taşımaktadır (Hepaksoy vd., 2004; Eroğul, 2012).

Kiraz yetiştiriciliğinde anaç olarak genellikle idris (*Prunus mahaleb* L.) ve kuşkirazının (*Prunus avium* L.) çöğürleri ve bu anaçlardan ıslah edilen klon anaçları kullanılmaktadır. Çöğür anaçları, tohumlardan kolay ve daha az bir maliyetle üretilebilmektedirler. Bununla birlikte, gösterdikleri heterozigot yapı nedeniyle standart meyve fidanı elde edilmesini ve buna bağlı olarak standart meyve üretimini çok zorlaştırmaktadırlar. Bu sebeple aşılı fidan üretiminde klon anaçları tercih edilmektedir. Modern kiraz yetiştiriciliğinde uzun boylu ve geniş hacimli ağaçlar arzulanmamaktadır. Çünkü kiraz yetiştiriciliğinde birim maliyetler arasında en önemli girdiyi, hasat oluşturmaktadır. Bu nedenle yetiştiriciler, daha küçük boylu ağaçları tercih etmektedirler. Bu amaca ulaşmak için zayıf gelişen bodur anaçların kullanılması önemlidir. Ayrıca klon anaç kullanımı ile genotipin devamlılığı sağlanmakta, tek tip popülasyon oluşturulabilmekte, gençlik kısırlığı dönemi daha kısa sürdüğü için meyve fidanlarından daha erken meyveye elde edilebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, modern meyve yetiştiriciliğinde klon anaç kullanımı tercih edilmektedir Günümüzde, *P. avium, P. mahaleb* ve *P. cerasus* türleri içinde çok sayıda çöğür ve klon anaçları ile, tür ve türler arası melezleme yoluyla elde edilen hibrit klon anaçları bulunmaktadır. Maxma 14 Delbard® Brokforest (*Prunus mahaleb* x *Prunus avium*) kiraz anacı da bu hibrit anaçlardan biridir (Hepaksoy, 2004, Bolsu ve Akça., 2011).

Mikroçoğaltım yöntemi, genotipik ve fenotipik olarak birbirinin tamamen aynı milyonlarca bitkinin çok küçük alanlarda üretilebilmesine olanak sağlamaktadır (George et al., 2008). Islah çalışmaları sonucunda seçilen klon anaçlarının mikroçoğaltım ile çoğaltılarak elde edilen klon anaçlarının kiraz yetiştiriciliğinde kullanılması ürün ve verim standardizasyonu açısından önem arz etmektedir (Eroğul, 2012).

Sıvı kültürlerin kullanımı, mikroçoğaltımın otomasyonu ve büyük ölçeklerde gerçekleştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bununla birlikte, sıvı kültürler camsılaşma gibi bir takım problemleri de birlikte getirmektedir. Bu

açıdan sıvı kültürlerle birlikte, uygun biyoreaktör sistemlerinin geliştirilmesi de büyük önem arz etmektedir. Sıvı kültürlerde; büyük ölçekte, camsılaşma vb. morfolojik bozukluklardan bağımsız bir şekilde kitlesel üretimin gerçekleştirilebilmesi için geçici besleme prensibi ile çalışılan biyoreaktör sistemlerinin kullanılması zorunludur (Hvoslef-Eide, 2005).

Bu tez projesinde Maxma 14 Delbard® Brokforest (*Prunus mahaleb* x *Prunus avium*) kiraz anacının mikroçoğaltım yöntemi ile klonal çoğaltılabilmesi için uygun aseptik yarı katı kültürlerin oluşturulması ve tasarlanmış nöbetleşe besleme sistemi ile çalışan iki farklı biyoreaktör (biyotepkime kabı) sisteminde sıvı kültürlerde büyük ölçekte üretimleri gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Ülkemizde 2014 yılında yayınlanan Meyve/Asma Fidan ve Üretim Materyali ile Çilek Fideleri İthalat Uygulama Genelgesi'ne göre tedarikçiler yurt dışından sadece üretim amaçlı, bahçe tesisi amaçlı, araştırma, geliştirme, deneme ve demonstrasyon amaçlı ve teşhir amaçlı ithalatını gerçekleştirebilmektedir (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2015). Bu genelgeye göre;

"**Üretim Amaçlı İthalat:** Yetkilendirilmiş Tohumculuk Kuruluşları, ülkemizde de kayıt altına alınmış, ıslahçı materyali/ön temel/temel kademede sertifikalandırılmış olan fide, fidan veya üretim materyallerini, bir/iki/üç no'lu damızlık ünitelerinin kurulması için ithal edebilirler."

"**Bahçe Tesisi Amaçlı İthalat:** Yetkilendirilmiş Tohumculuk Kuruluşu olan veya olmayan kişi veya kuruluşlar bahçe tesisi amacıyla sahibi oldukları veya kiraladıkları araziler için ithalat yapabilirler. Bu amaçla getirilecek çilek fidesi ve meyve/asma fidanlarına ait çeşitlerin ülkemizde kayıtlı çeşit olmaması gerekir. Ancak, anaçlar bahçe tesisi amacıyla ithal edilemez."

"**Araştırma, Geliştirme, Deneme ve Demonstrasyon Amaçlı İthalat:** Yurt içinde araştırma geliştirme faaliyetleri çerçevesinde araştırma geliştirme ve deneme amaçlı olarak kullanılacak fidan, fide ve üretim materyali ithalat ön izni, yetki devredilen Bakanlık İl Müdürlükleri tarafından verilir."

"**Teşhir Amaçlı İthalat:** Fuar kapsamında teşhir ve tanıtım amaçlı olarak yapılacak ithalatlarda; sergi sonunda ihracatçı ülkeye iade edilmesi, materyallerin gümrükten girişi ve çıkışı sırasında karantina kontrollerinin materyali getiren kişi veya kuruluş tarafından yaptırılması ve ticari amaçla kullanılmayacağının taahhüt edilmesi şartıyla izin verilebilir.

Geri götürülememesi durumunda ise, Bakanlık İl Müdürlüğü teknik elemanları gözetiminde imha edilir.”

Bu açıdan yapılacak olan tez projesi, Türkiye’nin kiraz anacı ihtiyacını karşılama açısından ve kiraz anaçlarının mikroçoğaltımında kullanılacak olan, kiraz anaçlarının sıvı kültürlerde ve geniş ölçekte üretimine imkân verecek olan iki yeni biyoreaktör tipinin sektöre kazandırılması açısından önem arz etmektedir.

2. LİTERATÜR BİLDİRİMLERİ

2.1. Yarı Katı Kültürlerde Yapılan Klonal Çoğaltım Çalışmaları

Klon anaçlarının çoğaltılmasında geleneksel vejetatif çoğaltım yöntemlerinden en fazla kullanılanı çelik ile çoğaltmadır. Bazı anaçlarda daldırma metodunu da uygulamak mümkündür. Geniş çaplı üretim ve kısa sürede çok sayıda anaç materyali elde etmek amacı ile *in vitro* tekniklerden de son yıllarda yaygın olarak yararlanılmaktadır (Hepaksoy, 2004, Güçlü vd., 2010).

Kiraz anaçlarının *in vitro* koşullarda çoğaltılması ile ilgili yayınlanmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Günal, 2006 yılında yaptığı çalışmada, Gisela 5 ve Maxma 14 Delbard® Brokforest kiraz anaçlarının doku kültürü ile çoğaltılmasını amaçlamıştır. Kiraz klon anaçlarının sürgün ucu kültürü ile çoğaltılmasında eksplant olarak tepe ve yan sürgün uçları, temel besin ortamı olarak ise MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı kullanılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı dozlarının sürgünlerin gelişme oranı, sürgün çoğaltılması, sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu üzerine etkileri araştırılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda yan sürgün çoğaltımında, bitki büyüme düzenleyicisi olarak BAP'ın (6-*Benzylaminopurine*) tek başına düşük dozlarının (0.1 ve 0.5 mg/l) veya düşük dozdaki 2,4-D (2,4-*dichlorophenoxyacetic acid*) (0.01 mg/l) ile birlikte kombinasyonlarının başarılı olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, sürgün çoğaltımı aşamasında altkültür sayısı arttıkça yan sürgün sayısının da arttığı gözlenmiştir.

Muna et al. 2000 yılında yaptıkları çalışmada, Maxma 14 Delbard® Brokforest yarı bodur kiraz anacı için *in vitro* üretim protokolü geliştirmişlerdir. Dört haftalık kültür süresince çoğaltım katsayısını 6 olarak elde etmişlerdir. Çoğaltım ortamı olarak 4.44 µM BAP ve 0.49 µM IBA (*Indole-3-butyric acid*) içeren MS ortamı kullanılmıştır. Yarı katı ve sıvı ortamlarda yüksek oranlarda köklendirme elde etmişlerdir. En yüksek verimde köklendirmeyi 0.49 µM NAA (1-*Naphthaleneacetic acid*) veya 0.49, 2.45µM IBA içeren sıvı MS ortamlarda elde etmişlerdir.

Sarropoulou et al. 2013 yılında yaptıkları çalışmada, CAB-6P, Gisela 6 ve Maxma 14 Delbard® Brokforest kiraz anaçları için *in vitro* üretin protokolleri geliştirmişlerdir. Kiraz anaçları; farklı konsantrasyonlarda SNP (sodium *nitroprusside*), 17.6µM BAP ve 8µM NAA içeren MS bazlı ortamlarda kallus

oluşumunu, sürgün ve kök gelişimini sağlamak amacıyla kültüre alınmışlardır. CAB-6P anacı en fazla sürgün gelişimini 10µM SNP içeren ortamda sağlarken, en uzun sürgün gelişimini ve en iyi kallus oluşumunu ise 30µM SNP içeren ortamda elde etmişlerdir. En iyi kök gelişimi 50µM SNP içeren ortamda tespit edilmiştir. Gisela 6 anacı için en iyi kallus oluşumu 30µM SNP içeren, en iyi sürgün oluşumu ise 40µM SNP ilaveli MS ortamında belirlenmiştir. Maxma 14 Delbard® Brokforest anacı için yapılan çalışmalarda en iyi kallus oluşumunu 40µM SNP içeren ortamlarda, en çok sayıda sürgün ve kök oluşumunu ise 30µM SNP içeren MS ortamlarında elde etmişlerdir.

Sarropoulou et al. 2013 yılında IBA'nın yalnız veya L-arginin ile birlikte besin ortamı içerisinde kullanıldığında, sürgün ve kök oluşumu üzerine etkilerini tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmalardaki bulgularda düşük konsantrasyonlarda 0,5mg/L IBA'nın besin ortamında L-arginin ile birlikte kullanımı köklü sürgünlerdeki kök sayısını, köklerdeki karbonhidrat içeriğini ve yapraklardaki klorofil miktarını arttırdığını saptamışlardır. Yüksek konsantrasyonlarda (1-2mg/L) IBA kullanımında ve L-arginin bulunmayan ortamlarda ise kök uzunluklarının arttığını, fakat sayısının ve köklerdeki karbonhidrat içeriğinin azaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca yapraklardaki klorofil içeriği de yine azalmıştır.

Ayrıca Maxma 14 Delbard® brokforest (*Prunus mahaleb* x *Prunus avium*) kiraz anacının ebeveynleri olan *Prunus mahaleb* ve *Prunus avium* üzerinde yapılan mikroçoğaltım çalışmaları da bulunmaktadır. Kitin et al., 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada, bir yabani kiraz türü olan *Prunus avium*'un *in vitro* koşullarda MS besin ortamları içerisinde çoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları denemelerde kültüre alınan eksplantlardan elde edilen sürgün sayısının BAP konsantrasyonuna bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. BAP konsantrasyonunun 0.5, 0.75, 1.00 ve 1.25 mg/L yarı katı besin ortamlarında çoğaltım katsayısının sırayla 3.63, 5.37, 8.93 ve 7.30 olduğunu belirlemişlerdir.

Hosseini et al., 2011 yılında yaptıkları çalışmada *Prunus mahaleb* kiraz anacının mikroçoğaltımını gerçekleştirmişlerdir. Farklı kombinasyonlarda ve konsantrasyonlarda BAP, GA_3 (*gibberellic acid*), IBA, NAA bitki büyüme düzenleyicilerini 30 g/L konsantrasyonda sükroz içeren MS ortamlarında sürgün çoğaltımı ve köklendirme denemeleri yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, en iyi sürgün çoğaltım verimini 2mg/L BAP içeren MS ortamında, en iyi kök gelişimini ise 1.5mg/L IBA ve 0.5mg/L NAA içeren MS ortamında saptamışlardır.

2.2. Biyoreaktörlerde Yapılan Klonal Çoğaltım Çalışmaları

Debnath, (2011), yaptığı çalışmada yarı katı ortamlarda çoğalttığı kısa çalı formundaki mavi yemiş sürgünlerinin uzaması için biyoreaktör olarak RITA® kültür kaplarını kullanmıştır. Mavi yemiş yapraklarından; 2,3–4.5µM TDZ (thidiazuron) içeren, yarı katı DM bazal ortamında (Debnath and McRae's, 2001) sürgün teşviki sağlamıştır. Sürgün teşvik ortamında oluşan sürgünleri, sürgün çoğaltımı amacıyla 1.2–2.3 µM TDZ içeren yarı katı DM ortamında kültüre almıştır. Çoğaltılan sürgünler jelleştirici ajan içermeyen ve 1 µM zeatin içeren sıvı DM ortamında RITA® kültür kaplarında sürgün uzaması elde etmiştir. Uzatılan sürgünler 3:2 (v/v) oranında turba yosunu ve torf karışımında köklendirilerek aklimatize edilmiştir.

Arencibia et. al., 2013 yılında fotomiksotrofik koşullarda, ahududu (*Rubus* spp.) bitkisinin ticari genotiplerinde (Heritage, Meeker ve Amity) klonal çoğaltım protokolü belirlemişlerdir. Bitkiler geçici besleme prensibine dayanan biyoreaktörlerde, 550 ppmv CO_2 varlığında, 80 $\mu M.m^{-2}.s^{-1}$ ışık yoğunluğunda, 15 g/L ve 30 g/L konsantrasyonlardaki sükroz içeriğinde kültüre alınmışlardır. Yapılan CO_2 akışı ve klorofil ölçümleri sonucunda, 15g/L sükroz konsantrasyonunda oluşturulan kültürlerin daha başarılı olduğu belirlenmiştir.

Welander et. al., 2014 yılında *Digitalis lutea* × *purpurea*, *Echinacea purpurea* ve *Rubus idaeus* bitkileri için geçici besleme prensibi ile çalışan yeni tipte Platform Biyoreaktörler geliştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada sıvı ortamda biyoreaktörlerden elde ettikleri sürgünlerde sürgün kalitesinin ve çoğaltım katsayısının agar ile katışaltırılmış yarı katı ortamlardan daha iyi olduğu belirlenmiştir. Üç bitki türü de 30g/L sükroz içeren MS ortamlarında kültüre alınmışlardır. *Digitalis lutea* 1mg/L BAP, 0.1mg/L IBA , *Echinacea purpurea* 0.2 mg/L BAP, *Rubus idaeus*'da 0.5mg/L BAP, 0.01mg/L IBA içeren ortamlarda sürgün çoğaltımı tespit edilmiştir. Biyoreaktörlerden elde edilen sürgünler yarı katı ortamlardan elde edilen sürgünler kadar başarılı bir şekilde köklendirilmiş ve aklimatize edilmiştir.

Shaik et. al., 2010 yılında tıbbi bir bitki olan *Lessertia frutescens* bitkisi için hızlı ve etkili bir klonal çoğaltım protokolü belirlemişlerdir. Bu amaçla; *Lessertia frutescens* bitkisini, farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri içeren farklı bazal ortamlarda, sürekli ve geçici besleme prensibine dayalı biyoreaktörlerde kültüre almışlardır. En başarılı sonuçları 2.22 µM BA ve 0.54

µM NAA içeren sıvı MS ortamlarında geçici besleme prensibine dayalı biyoreaktörlerde elde etmişlerdir. Fakat bu ortamlarda bile %50 oranında camsılaşma saptanmıştır. Geçici besleme prensibine dayalı biyoreaktörden elde edilen sürgünler 19.6 µM IBA içeren yarı katı MS ortamlarında %78 verimle köklendirilmişlerdir.

Klerk and Brugge, 2011 yılında dalya (yıldız çiçeği) bitkisinde yaptıkları çalışmada sıvı kültürlerde, yarı katı kültürlerden yaklaşık olarak 4 kat daha hızlı sürgün gelişimi elde etmişlerdir. Sıvı kültürler Wavin kültür kapları içerisinde sürekli besleme prensibi ile oluşturulmuşlardır. Yaptıkları çalışmada dalya bitkisini DKW (Driver–Kuniyuki walnut medium) (Driver and Kuniyuki, 1984) makro elementleri, MS mikro elementleri ve 0.44 µM BAP içeren sıvı ve yarı katı ortamlarda kültüre almışlardır. Sıvı kültürlerde ortamlardaki temel bileşenlerinin %75-80'inin kültür süresinin ilk 6 haftasında tükendiği belirlenmiştir. Bu süreden sonra eklenecek olan ortam bileşenleri ile büyümenin de arttığı gözlemlenmiştir. Kültür başlangıcında ortama eklenen fazla bileşenlerin ise büyümeyi durdurduğu tespit edilmiştir.

Jin et. al. 2013 yılında; hava kaldırmalı balon tip biyoreaktörler içerisinde, inokülasyon yoğunluğunun, havalandırma hızının ve ışık yoğunluğunun, asma anacının '5BB' sürgün çoğaltımı üzerine etkilerini araştırmışlardır. En başarılı sürgün oluşumu ve çoğaltımı ve köklenmesinin; 5 L'lik hava kaldırmalı balon tip biyoreaktörlerde, 150mL/dakika havalandırma hızında ve 50 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ışık yoğunluğunda 40-50 günde elde edilmiştir. Biyoreaktörlerde 40 günlük kültür sonunda elde edilen bitkicikler vermikülit, 2:1 (v/v) vermikülit perlit, 1:1 (v/v) vermikülit perlit, (D) 1:2 (v/v) vermikülit perlit ve perlit içeren saksılarda, 90 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ ışık şiddetinde ve 16 saat fotoperiyotta kültüre alınmışlardır. Vermikülitin aklimatizasyon sırasında asma anaçları üzerinde olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir.

Scherer et. al. 2013 yılında ananas (*Ananas comosus* var. *comosus*) bitkisi ile yaptıkları çalışmada, farklı kültür yöntemleri ile kalluslardan elde ettikleri nodül gruplarından bir klonal çoğaltım protokolü geliştirmişlerdir. *In vitro* ortamlarda elde edilen çoklu sürgün yaprakları, 2 µM NAA ve 8 µM 2-ip (isopentenyl adenine) veya BAP içeren MS tuzları ve Morel vitaminlerinden (Morel and Wetmore, 1951) oluşan bazal ortamlarda kültüre alınarak nodül yığınları oluşturulmuştur. Oluşturulan nodül yığınları iki erlenli nöbetleşe beslemeli sistem ile RITA® kaplarında kültüre alınmışlardır. 2 µM NAA and 2

µM BAP içeren sıvı MS tuzları ve Morel vitaminlerinden oluşan bazal ortam içerisine kültüre alınarak mikrosürgün gelişimi sağlanmıştır. En başarılı sürgün çoğaltımı RITA® kaplarında belirlenmiştir. Elde edilen mikrosürgünlerin uzaması daimi besleme prensibi ile oluşturulan sıvı kültürlerde sağlanmıştır. Sıvı sürgün uzama ortamı nodül oluşturma ortamına 10 µM GA_3 eklenmesi ile elde edilmiştir. Uzatılan sürgünler başarılı bir şekilde köklendirilerek %92 oranında bir başarı ile aklimatize edilmişlerdir.

Cui et. al. 2014 yılında *Dendrobium candidum* orkidelerinin protokormlarını balon tip kabarcık kolon biyoreaktörde kültüre almışlardır. Kültür yöntemi, inokülüm yoğunluğu ve havalandırma hacmi gibi parametreler optimize edilmiştir. Erlenler içerisinde 0.05 mg/L NAA, %2.5 (w/v) sükroz, 150 mg/L NaH_2 PO_4 ve %1 (v/v) muz homojenizatı içeren MS ortamlarında üretilen protokormlar 3L hacme ve 2 L çalışma hacmine sahip balon tip kabarcık kolon biyoreaktörlerde kültüre alınmışlardır. Biyoreaktörlerde kültür tipleri olarak sürekli ve nöbetleşe besleme sistemlerini kullanmışlardır. Nöbetleşe besleme sistemi ile yapılan biyoreaktör çalışmalarında sal yöntemi ile met-cezir yöntemlerini kullanmışlardır. Sal yönteminde bir süzgeç üzerinde duran protokormlar nöbetleşe besleme sistemi ile beslenerek kültür tamamlanmıştır. Met-cezir yönteminde ise protokormlar biyoreaktör içerisinde serbest bırakılarak kültüre alınmışlardır. En yüksek biyokütle oluşumu sürekli besleme sistemi ile oluşturulan kültürlerde, 50g/L inokülüm yoğunluğunda ve 0.3 vvm havalandırmada belirlenmiştir.

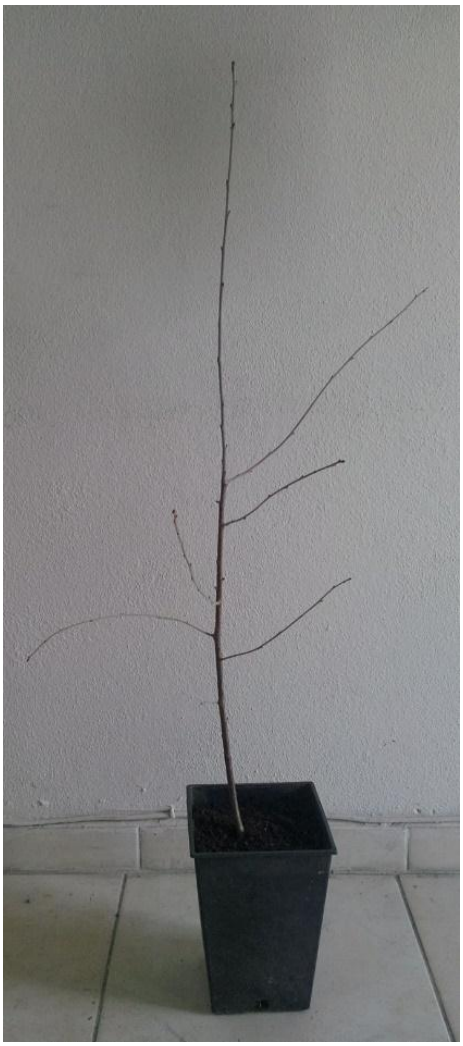
Ducos et. al. 2007 yılında *Coffea canephora* (Robusta) çeşidindeki kahve fidanlarının somatik embriyogenez aracılığı ile üretimi amacı ile farklı tiplerde biyoreaktör denemeleri gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışma, embriyonik hücrelerden torpedo safhasında embriyoların üretilmesi, üretilen embriyoların ön-olgunlaştırma işlemi, embriyoların tam olgunlaştırılması ve kotiledon safhadaki embriyoların sera ortamında tam bitkiciklere olgunlaştırılarak aklimatize edilmesi basamaklarından oluşmaktadır. Embriyonik hücrelerden torpedo safhasındaki somatik embriyoların üretimi için mekanik karıştırıcılı biyoreaktörler kullanılmıştır. Torpedo safhasındaki embriyolar nöbetleşe besleme sistemi ile çalışan cam biyoreaktörlerde ön olgunlaştırma işlemine tabii tutulmuşlardır. 10L'lik cam biyoreaktörlerde 20.000-25.000 kadar embriyo olgunlaştırılmıştır. Ön olgunlaştırma işlemlerinden sonra embriyolar 12L'lik Box-in-Bags tip biyoreaktörlerde olgunlaştırılarak kotiledon safhası sonunda bitkiciklerin oluşumu gözlenmiştir. Elde edilen bitkiler sera ortamında aklimatize edilmişlerdir.

Marbun et. al. 2014 yılında yağlık palmiye ağaçları (*Elaeis guineensis* Jacq.) için somatik embriyogenez aracılığı ile ticari bir klonal çoğaltım yöntemi geliştirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, embriyogenik kallus oluşumu için en uygun ortam seçimi erlen kapları içerisinde, çalkalayıcıda, sıvı kültürlerde yapılmıştır. Belirlenen en uygun embriyonik kallus çoğaltım ortamları ile nöbetleşe besleme sistemleri kullanılarak çoğaltım katsayısının arttırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla embriyonik kallus oluşumu için kullanılan 20 farklı ortamdan başarılı sonuç %25,97 oranında asparagin içeren MS ortamlarından elde edilmiştir. Erlen kaplarda elde edilen embriyogenik kalluslar RITA® kaplarında farklı besleme sıklıklarında kültüre alınmışlardır. 1 saat, 3 saat ve 6 saatte 3 dakika boyunca beslenerek yapılan denemelerde en yüksek çoğaltım katsayısı 3 saatte 3 dakika boyunca yapılan denemeden elde edilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Yapılan çalışmada, bitki materyali olarak, Algen Tarım ve Gıda Sanayi Ltd. Şti. bünyesindeki tül seralardan temin edilen uyku halindeki Maxma 14 Delbard® Brokforest (*Prunus mahaleb* x *Prunus avium*) kiraz meyve anacı sürgünleri kullanılmıştır (Şekil 3.1).



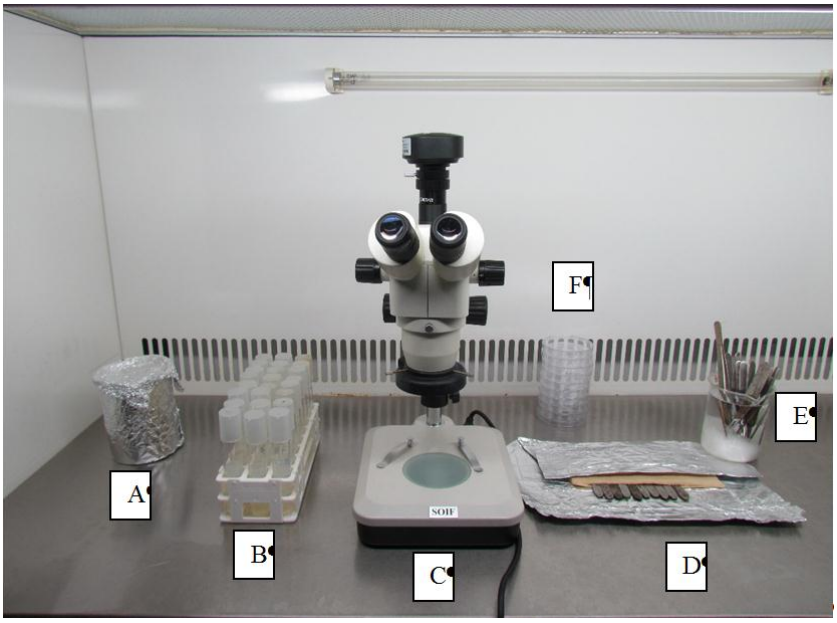
Şekil 3.1: Uyur haldeki Maxma 14 Delbard® Brokforest (*Prunus mahaleb* x *Prunus avium*) kiraz meyve anacı.

3.2. Metot

3.2.1. Meristem dokularının alınması ve meristem kültürlerinin oluşturulması

Maxma 14 Delbard® Brokforest (*Prunus mahaleb* x *Prunus avium*) kiraz meyve anacının uyur haldeki sürgünlerinden meristem alma işlemi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle Algen Tarım ve Gıda Sanayi Ltd. Şti. bünyesindeki tül seralarda kurulmuş damızlık parsellerden sonbahar döneminde uyur halde bulunan sürgünler 10-15 nod içerecek uzunlukta kesilerek alınmıştır. Uyur sürgünler üzerine ilk önce ticari fungusit (3mL/L Captan) püskürtülerek oda koşullarında 12 saat süreyle bekletilmiştir. Daha sonra sürgünler filtre kâğıdı ile kurutularak 2-3 nod içerecek uzunluklarda kesilmişlerdir. Kesilen sürgünler steril boş bir kavanoza alınmıştır.

Meristem Alma işlemi La Salle Üniversitesi, Bitki Islahı Bölümü Koordinatörü Dr. Jean Paul Reynoird tarafından geliştirilen bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yönteme göre; meristem alma işlemi öncesinde sürgünlere herhangi bir sterilizasyon işlemi uygulanmamıştır. Bu şekilde sterilizasyondan kaynaklanabilecek nekroz oluşumlarının da önüne geçilmiştir. Bu yönteme göre; ikiye katlanmış filtre kağıtları ve 20 adet bisturi alüminyum folyo ile kaplanarak etüvde 180°C'de 2 saat süre ile sterilize edilmiştir. Bir litrelik bir beher içerisine bir miktar pamuk yerleştirilerek beher %70'lik alkol ile yarısına kadar doldurulmuştur. Kabin dezenfekte edilerek hazırlanmış ve içerisine stereo mikroskop, sterilize edilmiş bisturiler ve filtre kağıtları, %70'lik alkol ve pamuk içeren beher, tek kullanımlık steril petriler ve son olarak 2-3 adet nod içerecek şekilde kesilmiş sürgünler yerleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Meristem almak üzere hazırlanmış kabinde bulunan malzemeler. A: Alınan meristemlerin ışıktan korunabilmesi için alüminyum folyo ile kaplanmış beher. B: Besin ortamı içeren tüpler. C: Stereomikroskop. D: Bisturileri kurutmak için arasına dizilmiş filtre kağıdı. E: Bisturilerin sterilizasyonu için kullanılan %70'lik alkol içeren beher. F: Üzerinde meristem almak için tek kullanımlık steril petri kapları.

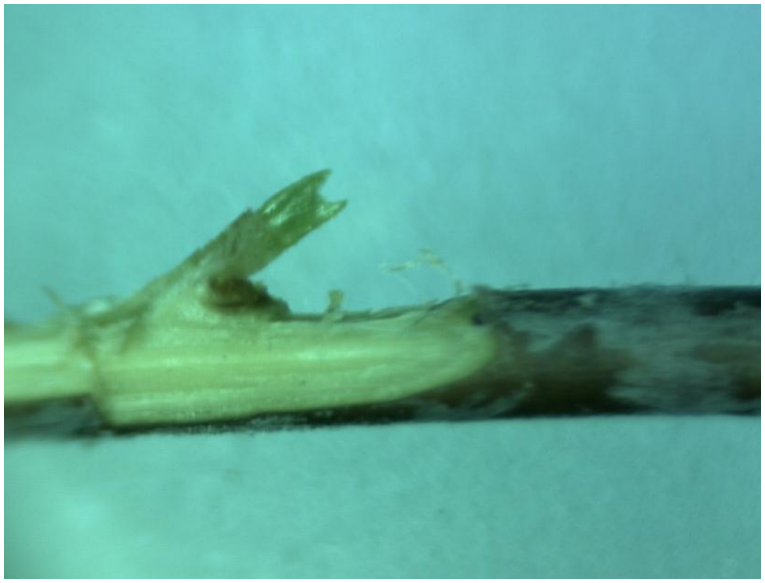
Çalışmaya başlarken alüminyum folyo ile kaplı, ikiye katlanmış filtre kâğıtları açılmış ve bisturiler uçları filtre kâğıdında kalacak şekilde yerleştirilmiştir. Bisturiler çalışmaya başlandığı sırada ikiye ayrılarak ilk on bisturi kullanılırken diğer 10 tanesi %70'lik alkol içerisinde bekletilmiş ve sterilize edilmiştirler. 10 adet bisturi kullanıldıktan sonra alkol içerisinde sterilize edilen bisturiler filtre kağıdı arasına yerleştirilmiş ve kullanılan bisturiler alkol içerisinde bekletilmiştir. Tek kullanımlık steril petriler paketlerinden çıkartılarak bir petri alınıp mikroskop altına yerleştirilmiştir. Kavanozdan içerisindeki sürgünlerden biri çıkartılarak mikroskop altındaki petri üzerine meristemleri alınmak üzere konulmuştur. Sürgünlerin meristemleri alınırken her bir yaprak taslağı ayrı bir bisturi ile kesilerek sürgünden uzaklaştırılmıştır. Kullanılan her bisturi, ucu %70'lik alkol içerisine daldırılacak şekilde konmuştur. Bu şekilde her bir yaprak taslağı temizlenerek meristem dokuya ulaşılmıştır (Şekil 3.3). Son olarak steril olduğu kabul edilen meristem doku, yine steril bir bisturi ile kesilerek 8 ayrı bitki büyüme düzenleyicisi kompozisyonuna sahip yarı katı MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamına, 8 ayrı bitki büyüme düzenleyicisine sahip yarı katı WPM (Woody Plant Medium) (McCown ve Lyond, 1980) besin ortamına ve

Algen Tarım ve Gıda Sanayi Ltd. Şti. bünyesinde kullanılan MS tabanlı yarı katı modifiye ticari besin ortamı içerisinde kültüre alınmışlardır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1: Meristem Kültürleri için kullanılan bazal ortamlar ve içerdikleri bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonları (mg/L).

Besin Ortamı	BAP (mg/L)	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)
MS 1	1	0.01	-
MS 2	1	0.1	-
MS 3	1	-	0,01
MS 4	1	-	0,1
MS 5	0.5	0.01	-
MS 6	0.5	0.1	-
MS7	0.5	-	0.01
MS8	0.5	-	0.1
WPM 1	1	0.01	-
WPM 2	1	0.1	-
WPM 3	1	-	0.01
WPM 4	1	-	0.1
WPM 5	0.5	0.01	-
WPM 6	0.5	0.1	-
WPM 7	0.5	-	0.01
WPM 8	0.5	-	0.1
TİCARİ ORTAM	Modifiye edilmiş MS bazlı besin ortamı		

Tüm besin ortamları bazal ortam ve bitki büyüme düzenleyicilerine ek olarak 30g/L sükroz, 6g/L agar içermektedir ve tüm ortamların pH'ı 6 olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3.3: Kültüre alınmak üzere yaprak taslakları temizlenmiş meristem dokusu.

Meristemler tüpler içerisinde kültüre alındıktan sonra porttüpler alüminyum folyo ile kaplanarak 1 hafta boyunca karanlıkta kültüre alınmışlardır. Bir hafta sonunda alüminyum folyo açılarak meristemler 16 saat fotoperiyotta, 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 3000 ± 200 lux ışıkta 18 gün boyunca kültüre alınmışlardır.

3.2.2. Yarı katı besin ortamlarında sürgün çoğaltımı

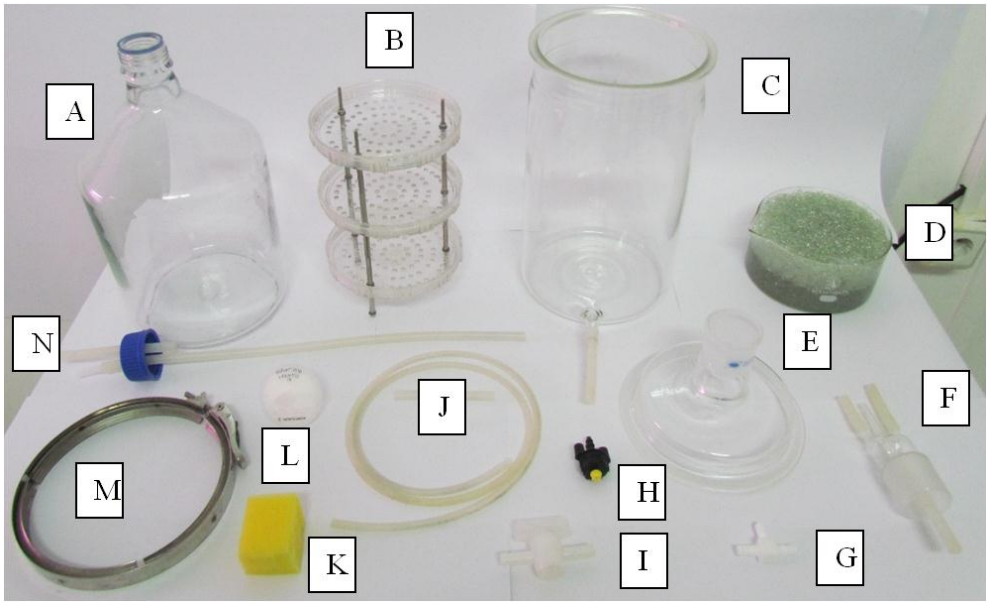
Yarı katı kültürlerde sürgün çoğaltımı için toplamda 17 farklı besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamı bileşenleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Kültür kabı olarak Sigma Magenta® GA7 Polypropylene kap kullanılmıştır. Bitki materyali olarak 9 adet aksiler ve/veya apikal göz içeren çoklu sürgünler kullanılmıştır. Toplamda 75 adet çoklu sürgün öbeği her bir kültür kabında 5 adet öbek olacak şekilde kültüre alınmıştır. Çoklu sürgünler 16 saat fotoperiyotta, 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 3000 ± 200 lux ışıkta 26 gün boyunca kültüre alınmışlardır (Şekil 3.4).

Şekil 3.4: Yarı katı kültürlerde ve sıvı kültürlerde inokülasyon olarak kullanılan çoklu sürgün materyali.

3.2.3. Biyoreaktör sistemleri ve çalışma mekanizmaları

Yapılan proje kapsamında iki farklı nöbetleşe besleme sistemine sahip biyoreaktör tasarlanmış ve oluşturulmuştur.

Geçici yağmurlama sistemi ile çalışan raflı biyoreaktör; ortam depolama birimi, kültür kabı, bitkilerin yerleştirildiği raf ve yağmurlama biriminden oluşmaktadır. Bu sistemde yine ortam depolama birimi silikon hortumlarla kültür kabına bağlanmıştır. Diğer sistemden farklı olarak besleme kültür kabının üstünden yapılmıştır. Besin ortamının üst kısmına yerleştirilen bir yağmurlama birimi sayesinde besin ortamı bitkilerin üzerine yağmur damlaları şeklinde beslenmiştir. Kültür kabı tabanında toplanan besin ortamı ise silikon hortumlar ile yine besin ortamı depolama birimine gönderilmiştir (Şekil 3.5).

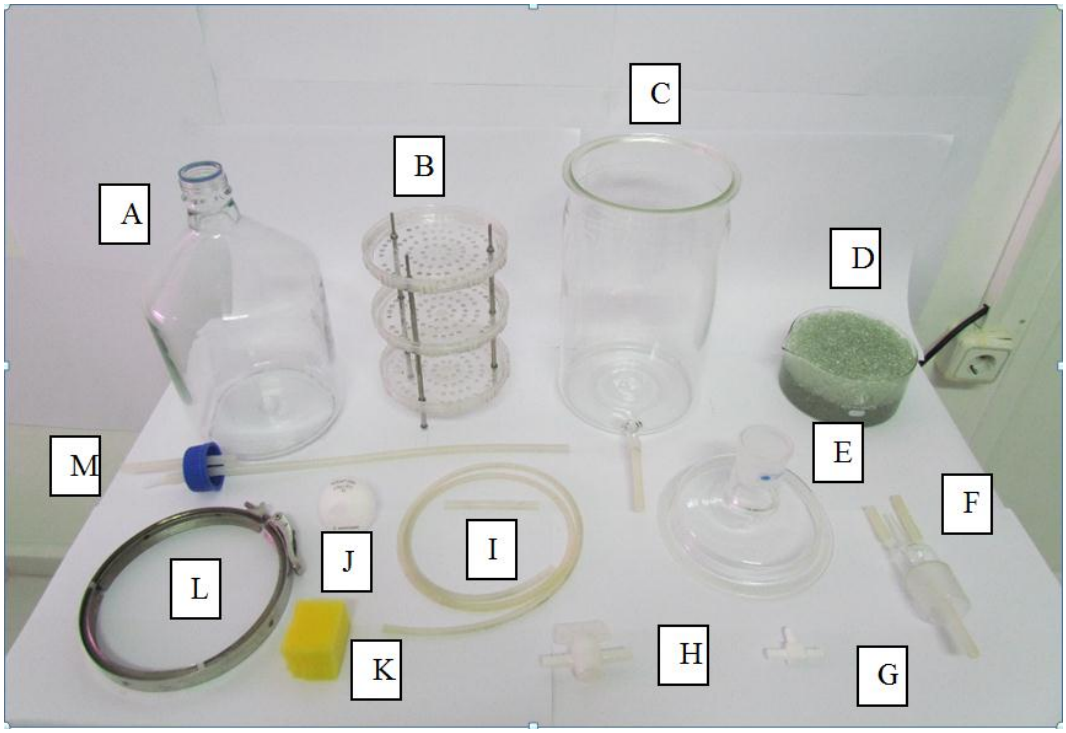


Şekil 3.5: Geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktör bileşenleri. A: Besin ortamı depolama ünitesi. B: Bitki inokülasyon rafı. C: Kültür Kabı. D: Bitki parçacıklarının besin ortamı hattına kaçmasını engellemek amacıyla cam boncuklar. E: Kültür kabı 1. kapağı. F: Kültür Kabı 2. kapağı. G: Besin ortamı hattı ile havalandırma hattını birleştirebilmek için T bağlantı elemanı. H: Yağmurlama aparatı.. I: Besin ortamı ve havalandırma hattını ayırmak için vana. J: Kültür kabı ve besin ortamı depolama birimi arasında bağlantı oluşturacak silikon hortumlar. K: Cam boncukların silikon hortumlara kaçmasını engellemek için sünger. L: Havalandırma sırasında steril hava sağlamak için 0,22µm por çapında hava filtresi. M: Kültür kabı 1. kapağını kapatmak için kelepçe. N: Besin ortamı depolama birimi çok çıkışlı kapağı.

Geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde peristaltik pompa araçlığı ile depolama biriminden alınan ortam kültür kabının 2. kapağındaki yağmurlama aparatına beslenmiştir. Yağmurlama aparatından sıvı besin ortamı yağmur damlaları şeklinde bitki inokülasyon rafındaki bitkilerin üzerine düşmesi sağlanmıştır. Besleme sırasında besin ortamı depolama birimi kültür kabından daha aşağıda bir seviyeye yerleştirilmiştir. Bu şekilde kültür kabının tabanında toplanan sıvı besin ortamı besin ortamı depolama birimine yerçekimi yardımı ile geri dönmüştür (Şekil 3.6).

Şekil 3.6: Geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktör.

Geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktör; ortam depolama birimi, kültür kabı ve bitkilerin yerleştirildiği raftan oluşmaktadır. Bu sistemde ortam depolama birimi silikon hortumlarla kültür kabına bağlanmıştır. Besleme peristaltik pompa ile silikon hortumlar aracılığıyla kültür kabının alt kısmından gerçekleştirilir. Tüm bitkiler sıvıya daldırıldıktan sonra besin ortam yine peristaltik pompa ile kültür kabından besin ortamı depolama birimine aktarılır. Bu sistemde besin ortamı depolama biriminin hacmi 5L, kültür kabının hacmi ise 6L'dir (Şekil 3.7)



Şekil 3.7: Geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktör bileşenleri. A: Besin ortamı depolama ünitesi. B: Bitki inokülasyon rafı. C: Kültür Kabı. D: Bitki parçacıklarının besin ortamı hattına kaçmasını engellemek amacıyla cam boncuklar. E: Kültür kabı 1. kapağı. F: Kültür Kabı 2. kapağı. G: Besin ortamı hattı ile havalandırma hattını birleştirebilmek için T bağlantı elemanı. H: Besin ortamı ve havalandırma hattını ayırmak için vana. I: Kültür kabı ve besin ortamı depolama birimi arasında bağlantı oluşturacak silikon hortumlar. K: Cam boncukların silikon hortumlara kaçmasını engellemek için sünger. J: Havalandırma sırasında steril hava sağlamak için 0,22µm por çapında hava filtresi. L: Kültür kabı 1. kapağını kapatmak için kelepçe. M: Besin ortamı depolama birimi çok çıkışlı kapağı.

Geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde peristaltik pompa yardımı ile besin ortamı, depolama biriminden çekilerek kültür kabı içerisine bitki inokülasyon rafı tamamen sıvı besin ortamı, içerisinde kalıncaya kadar beslenmiştir. Sıvı besin ortamı en üst raftaki bitkilere ulaştıklan sonra peristaltik pompa yardımı ile kültür kabından tekrar besin ortamı depolama birimine beslenmiştir (Şekil 3.8).

Şekil 58: Geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktör.

3.2.4. Biyoreaktörlerde sıvı kültürlerin oluşturulması

Sıvı kültürler oluşturulurken, bitki materyali olarak 9 adet apikal ve/veya aksiler göz içeren çoklu sürgünler kullanılmıştır. Üç raf içeren biyoreaktörlerde rafların her birine 25 adet çoklu sürgün olacak şekilde toplamda her bir reaktörde 75 adet çoklu sürgün Algen Tarım ve Gıda Sanayi Ltd. Şti. bünyesinde kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) tabanlı sıvı modifiye ticari besin ortamında kültüre alınmıştır. Reaktörler 16 saat fotoperiyotta, 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 3000 ± 200 lux ışıkta 18 gün boyunca kültüre alınmışlardır.

Geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde ve geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde aynı sıklıkta ve sürede besleme yapılmıştır. Besleme süresi her 12 saatte bir kere 10 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. *Ex vitro* köklendirme

Biyoreaktörlerden ve yarı katı kültürlerden elde edilen çoklu sürgünler içerisinden 2cm ve daha uzun sürgünler her biri 2 cm boyunda kesilerek ayrılmıştır. Sürgünlerin alt kısımları köklendirme tozuna batırıldıktan sonra, 1:2 (v/v) oranında karıştırılmış torf-perlit karışımı içeren 45 gözlü viyollere dikilmişlerdir. Daha sonra viyoller 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 3000 ± 200 lux ışıkta 18 gün boyunca kültüre alınmışlardır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2: 10g Köklendirme tozu hazırlamak için gerekli bileşenler ve miktarları (g).

Bileşen	Miktar (g)
Talk Pudrası	9.1
IBA	0.1
Borik asit	0.2
Ticari Toz Fungusit (Captan)	0.6
Toplam	10.0

3.2.6. İstatistiki değerlendirme

Yapılan tez çalışmasında yapılan denemeler 3 tekerrürlü veya gruplu olarak gerçekleştirilmiştir. Veri analizleri tek yönlü varyans analizi ile gerçekleştirilmiştir. ANOVA analizinde veriler arasındaki farkın önemi belirlenirken $p< 0,05=\alpha$ olarak belirlenmiştir.

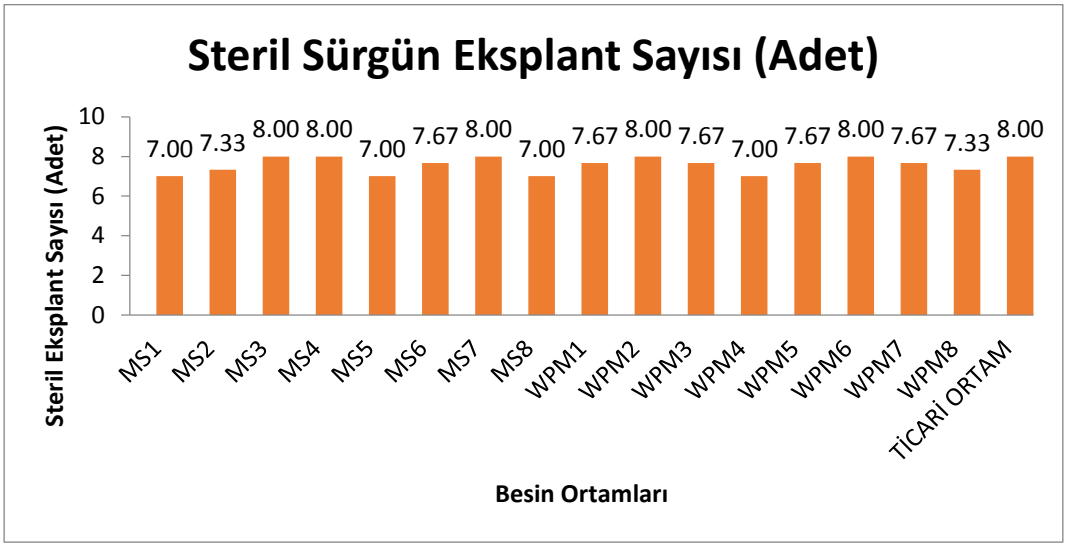
4. BULGULAR

4.1. Meristem dokularının alınması ve meristem kültürlerinin oluşturulması

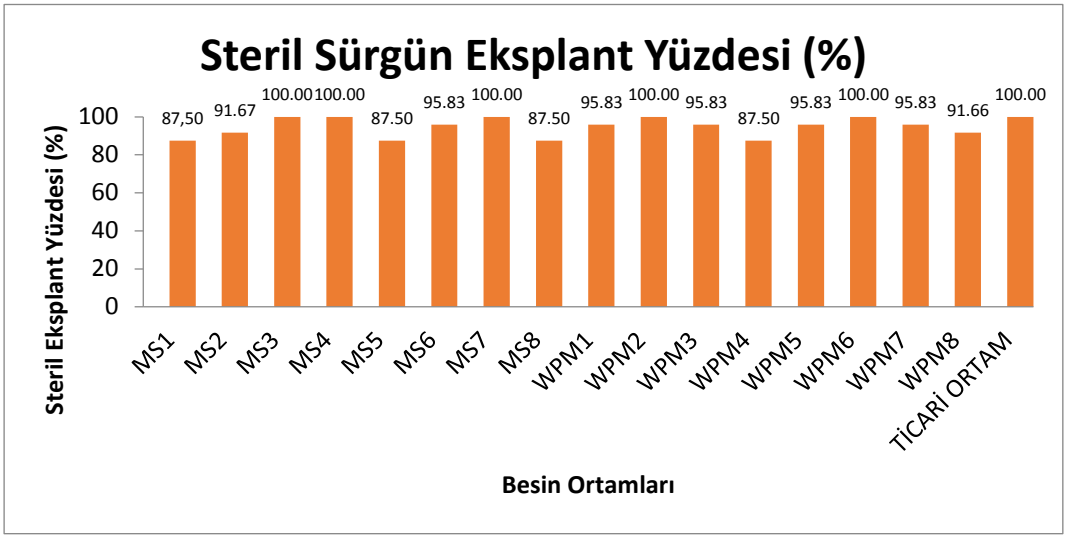
Meristem kültürleri için farklı hormon kombinasyonlarında 8 adet MS, 8 adet WPM ortamı ve Algen Tarım ve Gıda Sanayi Ltd. Şti. bünyesinde kullanılan MS tabanlı yarı katı modifiye ticari besin ortamı kullanılmıştır. Her bir ortamda 3 tekerrürlü denemeler kurularak her bir tekerrürde 8 meristem, toplamda her bir ortam için 24 adet meristem kültüre alınmıştır. En düşük sterilizasyon başarısı %87,5 en yüksek sterilizasyon başarısı ise %100 olarak belirlenmiştir. Meristemlerden elde edilen steril sürgün eksplant sayısı ve steril sürgün eksplant yüzde değerleri Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmektedir.

Çizelge 4.1: Meristemlerden elde edilen steril sürgün eksplant sayısı (adet) ve yüzdesi (%).

Besin ortamları	Steril Sürgün Eksplant Sayısı (Adet)				Steril Sürgün Eksplant Yüzdesi (%)			
	I	II	III	Ortalama	I	II	III	Ortalama
MS1	7	6	8	7	87.5	75	100	87.50
MS2	8	8	6	7.33	100	100	75	91.67
MS3	8	8	8	8	100	100	100	100
MS4	8	8	8	8	100	100	100	100
MS5	7	7	7	7	87.5	87.5	87.5	87.50
MS6	7	8	8	7.67	87.5	100	100	95.83
MS7	8	8	8	8	100	100	100	100
MS8	6	8	7	7	75	100	87.5	87.50
WPM1	7	8	8	7.67	87.5	100	100	95.83
WPM2	8	8	8	8	100	100	100	100
WPM3	7	8	8	7.67	87.5	100	100	95.83
WPM4	6	7	8	7	75	87.5	100	87.50
WPM5	7	8	8	7.67	87.5	100	100	95.83
WPM6	8	8	8	8	100	100	100	100
WPM7	8	7	8	7.67	100	8.5	100	95.83
WPM8	6	8	8	7.33	75	100	100	91.66
TİCARİ ORTAM	8	8	8	8	100	100	100	100



Şekil 61: Meristem alma işleminden sonra elde edilen steril sürgün eksplant sayısı (adet)



Şekil 4.27: Meristem alma işleminden sonra elde edilen steril sürgün eksplant yüzdesi (%)

Yapılan tek yönlü ANOVA analizi ile kültüre alınan meristem dokularının sterilizasyon başarıları değerlendirilmiştir ve elde edilen p değeri 0.38 (α=0.05 p>α) olarak belirlenmiştir. Bu durum farklı ortamlarda elde edilen steril sürgün eksplant sayıları arasındaki farkın anlamlı olmadığını, sterilizasyon başarısının ortama bağlı olarak değişmediğini göstermektedir (Çizelge 4.2).

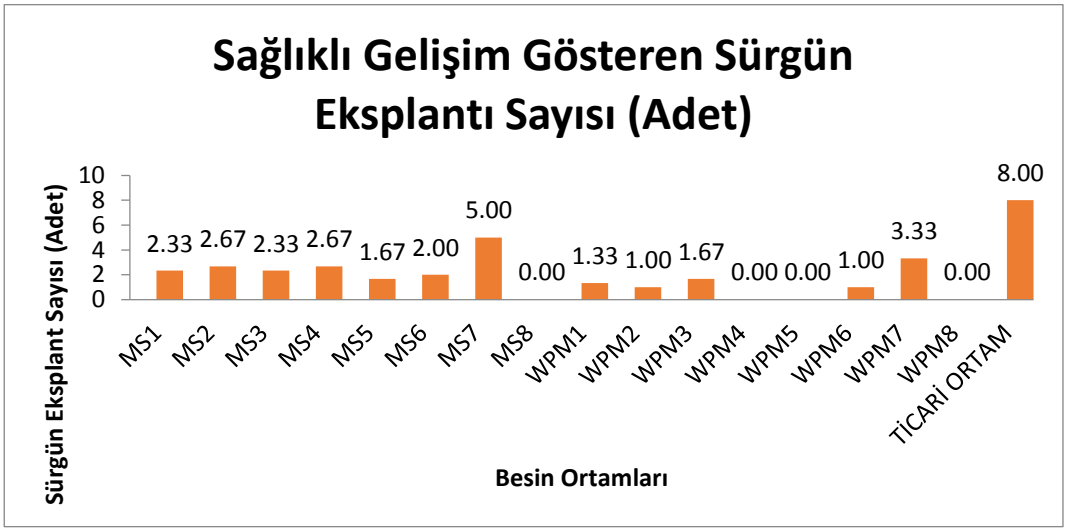
Çizelge 2.2: Meristem alma işleminden sonra elde edilen steril sürgün eksplant sayılarının tek yönlü ANOVA analizleri

Varyans Kaynağı	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-değeri*	*F ölçütü*
Gruplar Arasında	7.69	16	0.48	1.11	0.38	1.95
Gruplar İçinde	14.67	34	0.43			
Toplam	22.35	50				
α=0.05, P=0.38>α						

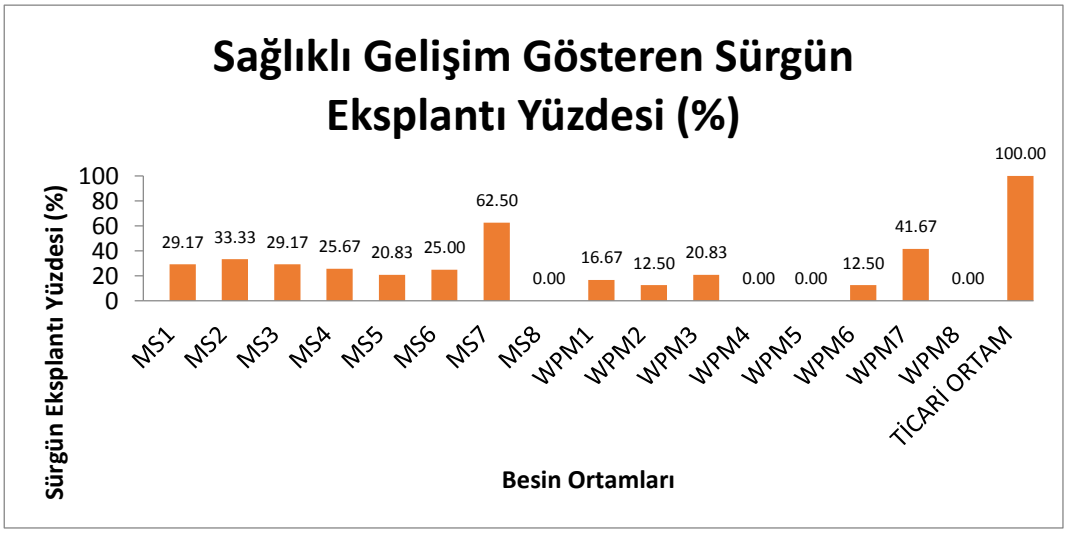
Farklı kombinasyonlardaki MS ve WPM ortamlarında kültüre alınan meristemlerin sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplantı sayıları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Buna göre; MS8, WPM4, WPM5 ve WPM8 ortamlarında sağlıklı sürgün gelişimleri saptanmamıştır. Sağlıklı gelişim göstermeyen sürgün eksplantlarında aşırı kallus oluşumu ve morfolojileri bozuk yaprak oluşumları veya sürgün uçlarında nekroz oluşumu gibi gelişim bozuklukları gözlenmiştir. En başarılı sonuç ticari ortamlarda kültüre alınan meristemlerden elde edilmiştir. Kültüre alınan 24 meristemin %100'ünden de sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplantı gözlenmiştir. Ticari ortamlardan sonra en yüksek sağlıklı sürgün eksplantı gelişim oranı %62.5 ile MS7 ortamında belirlenmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.3, Şekil 4.4).

Çizelge 4.3: Farklı ortamlarda kültüre alınan meristemlerden sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplant sayısı (adet) ve yüzdesi (%).

Besin ortamları	Sağlıklı Gelişim Gösteren Eksplant Sayısı (Adet)				Sağlıklı Gelişim Gösteren Eksplant Yüzdesi (%)			
	I	II	III	Ortalama	I	II	III	Ortalama
MS1	2	3	2	2.33	25	37.5	25	29.17
MS2	4	3	1	2.67	50	37.5	12.5	33.33
MS3	1	3	3	2.33	12,5	37.5	37.5	29.17
MS4	3	3	2	2.67	37.5	37.5	25	25.67
MS5	2	2	1	1.67	25	25	12.5	20.83
MS6	3	2	1	2	37.5	25	12.5	25
MS7	6	4	5	5	75	50	62.5	62.5
MS8	0	0	0	0	0	0	0	0
WPM1	2	0	2	1.33	25	0	25	16.67
WPM2	1	2	0	1	12.5	25	0	12.5
WPM3	1	2	2	1.67	12.5	25	25	20.83
WPM4	0	0	0	0	0	0	0	0
WPM5	0	0	0	0	0	0	0	0
WPM6	1	0	2	1	12.5	0	25	12.5
WPM7	5	3	2	3.33	62.5	37.5	25	41.67
WPM8	0	0	0	0	0	0	0	0
TİCARİ ORTAM	8	8	8	8	100	100	100	100



Şekil 4.3: İki aylık kültür süresi sonunda farklı yarı katı ortamlarda sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplantı sayısı (adet).



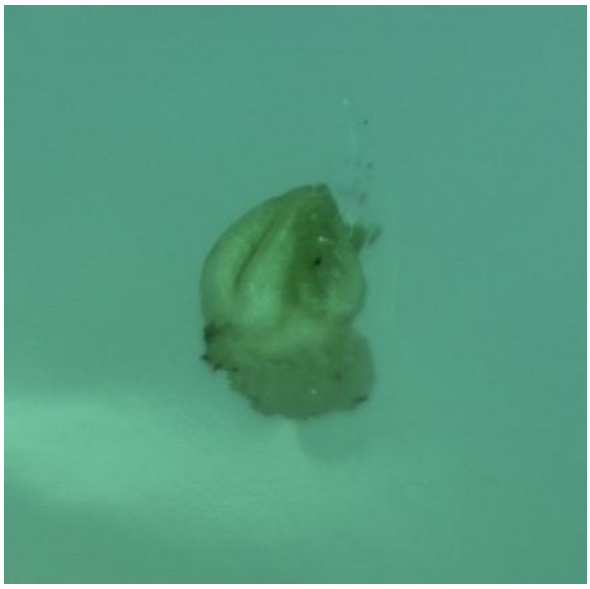
Şekil 4.4: İki aylık kültür süresi sonunda farklı yarı katı ortamlarda sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplantı yüzdesi (%)

Yapılan tek yönlü ANOVA analizinde farklı yarı katı besin ortamlarında gelişim gösteren sağlıklı sürgün eksplantı sayıları değerlendirilmiştir ve elde edilen p değeri 0'a çok yakın bir değer olarak bunmuştur (α=0.05, P=1.2E-11<α). Bu durum farklı ortamlarda kültüre alınan meristemlerinden gelişim gösteren sağlıklı sürgün eksplant sayıları arasındaki farkın anlamlı olduğunu göstermektedir. En yüksek sağlıklı eksplant sayısı ticari ortamlarda kültüre alınan meristemlerden elde edilmiştir (Çizelge 4.4).

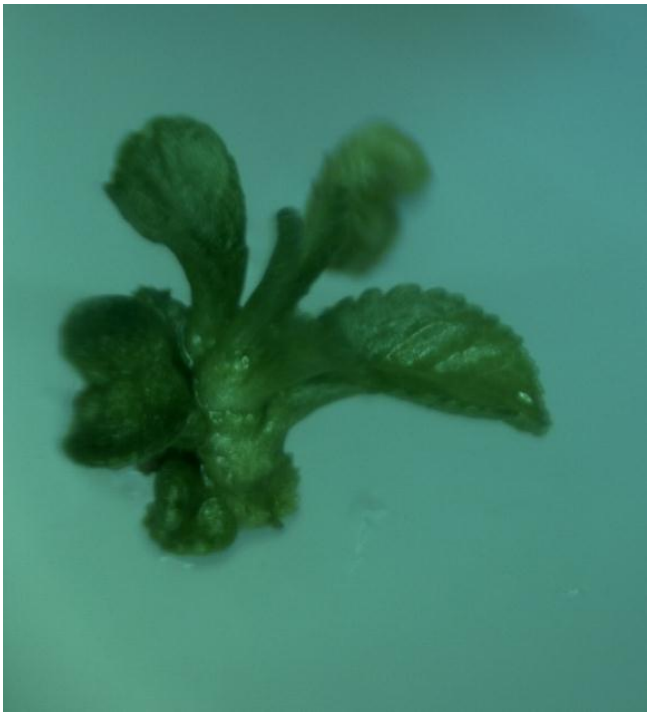
Çizelge 4.4: Farklı ortamlarda kültüre alınan meristemlerden sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplant sayısı değerlerinin tek yönlü ANOVA analizi

Varyans Kaynağı	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-değeri*	*F ölçütü*
Gruplar Arasında	199.49	16	12.46	16.73	1.20E-11	1.95
Gruplar İçinde	25.33	34	0.75			
Toplam	224.82	50				
α=0.05, P=1.2E-11<α						

Kültüre alınan meristemlerden sağlıklı sürgün gelişimi gösterenler 1 haftalık karanlık kültür sonrasında porttüpler alimünyum folyodan çıkartılarak gözlenmişlerdir. Bir hafta sonunda meristem hacimlerinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.5). 16 saat fotoperiyotta 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 3000 ± 200 lux ışıkta kültüre alınan meristemler 2 hafta sonunda yeni yaprak oluşumları göstermeye başlamışlardır (Şekil 4.6). İki aylık kültür sürelerinin sonunda yeni yaprak ve sürgün oluşumları oldukça belirgin hale gelmeye başlamışlardır (Şekil 4.7). Bu aşamadan sonra sağlıklı gelişim gösteren sürgün eksplantları 26 günde bir altkültüre alınmışlardır.



Şekil 4.5: Bir haftalık karanlık kültürden sonra meristem görünümü



Şekil 8: Kültüre alındıktan 3 hafta sonra meristem kültürlerinde sürgün ve yaprak oluşumu

Şekil 4.7: Kültüre alındıktan 2 ay sonra meristem kültürlerinde sürgün ve yaprak gelişimleri.

4.2. Yarı katı besin ortamlarında ve biyoreaktörlerde sürgün çoğaltımı

Yapılan çalışmada yarı katı kültürlerde ve biyoreaktörlerde 9 adet apikal ve aksiler göz içeren çoklu sürgünler kültüre alınmıştır. Ayrıca kültüre alınan çoklu sürgünlerin kültür öncesinde yaş ağırlıkları, kültür sonrasında yaş ağırlıkları, ortalama sürgün uzunlukları ve kültür süresi sonrasında apikal ve aksiler göz sayıları tespit edilmiştir. Tespit edilen göz sayılarından yola çıkarak bir çoğaltım katsayısı elde edilmiştir. Buna göre; çoğaltım katsayısı kültür sonunda elde edilen toplam apikal ve aksiler göz sayısının, kültür başlangıcındaki çoklu sürgünlerin apikal ve aksiler göz sayına bölünmesi ile elde edilmiştir. Buna göre en yüksek çoğaltım katsayısı geçici yağmurlama sistemi ile çalışan raflı biyoreaktörde 7.29, ikinci en yüksek çoğaltım katsayısı geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde 5.03, en düşük çoğaltım katsayısı ise yarı katı kültürlerde 4.30 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5: Biyoreaktör sistemlerinde ve yarı katı kültürlerden kültür süresi sonunda elde edilen apikal ve aksiler göz miktarları (adet) ve çoğaltım katsayıları.

	Geçici Daldırma Prensibi İle Çalışan Raflı Biyoreaktör			Geçici Yağmurlama Sistemi İle Çalışan Raflı Biyoreaktör			Yarı Katı Kültürler		
	Alt Raf	Orta Raf	Üst Raf	Alt Raf	Orta Raf	Üst Raf	1. Tek.	2. Tek.	3. Tek.
Kültüre Alınan Toplam Apikal/Aksiler Göz Sayısı (Adet)	225	225	225	225	225	225	225	225	225
Kültür Sonunda Toplam Apikal/Aksiler Göz Sayısı (Adet)	1567	1045	784	1510	1635	1775	948	969	985
Çoğaltım Katsayısı	6.96	4.64	3.48	6.71	7.27	7.89	4.21	4.31	4.38
Ortalama Çoğaltım Katsayısı	5.03			7.29			4.30		

Yapılan tek yönlü ANOVA analizinde biyoreaktörlerdeki raflar arasındaki çoğaltım katsayısı farklılıkları değerlendirilmiştir ve P= 0.034<α şeklinde bulunmuştur. Bu durumda her iki biyoreaktör sistemindeki raflardan ve yarı katı kültürlerden elde edilen sürgün sayılarının birbiri ile aynı olmadığı, aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmaktadır. Buna göre en fazla apikal ve aksiler sürgün çoğaltımı gerek adet ve gerekse yaş ağırlık bakımından geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörden ve reaktörün de özellikle üst rafından elde edilmiştir (Çizelge.4.6, Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6: Biyoreaktör sistemlerindeki farklı raflardan ve yarı katı kültürlerden elde edilen apikal ve aksiler sürgün uç sayıları için tek yönlü ANOVA analizi.

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	737659.56	2	368829.78	6.256	0.034	5.143
Gruplar İçinde	353736.67	6	58956.11			
Toplam	1091396.23	8				
α=0.05, P= 0.034<α						

Çizelge 4.7: Biyoreaktörlerden ve yarı katı kültürlerde kültür başlangıcında ve kültür sonunda elde edilen çoklu sürgünlerin yaş ağırlık değerleri.

	Geçici Daldırma Prensibi İle Çalışan Raflı Biyoreaktör			Geçici Yağmurlama Sistemi İle Çalışan Raflı Biyoreaktör			Yarı Katı Kültürler		
	Alt Raf	Orta Raf	Üst Raf	Alt Raf	Orta Raf	Üst Raf	1. Blok	2. Blok	3. Blok
İnokülasyon yaş ağırlığı (g)	2.90	2.90	3.20	2.70	3.10	3	5.60	5.20	4.50
Kültür Sonundaki Yaş Ağırlığı (g)	61.20	42.56	41.31	64.54	65.98	75.91	43.32	49.88	44.13

Biyoreaktörler ve yarı katı kültürlerde inokülasyon ve kültür sonundaki çoklu sürgünlerin yaş ağırlık değerlerinin karşılaştırılması için yapılan tek yönlü ANOVA analizinde P= 0.019<α olarak bulunmuştur. Bu durum her iki biyoreaktör sistemindeki raflardan ve yarı katı kültürlerden elde edilen kültür sonundaki yaş ağırlık değerlerinin (g) birbiri ile aynı olmadığını ve aralarındaki

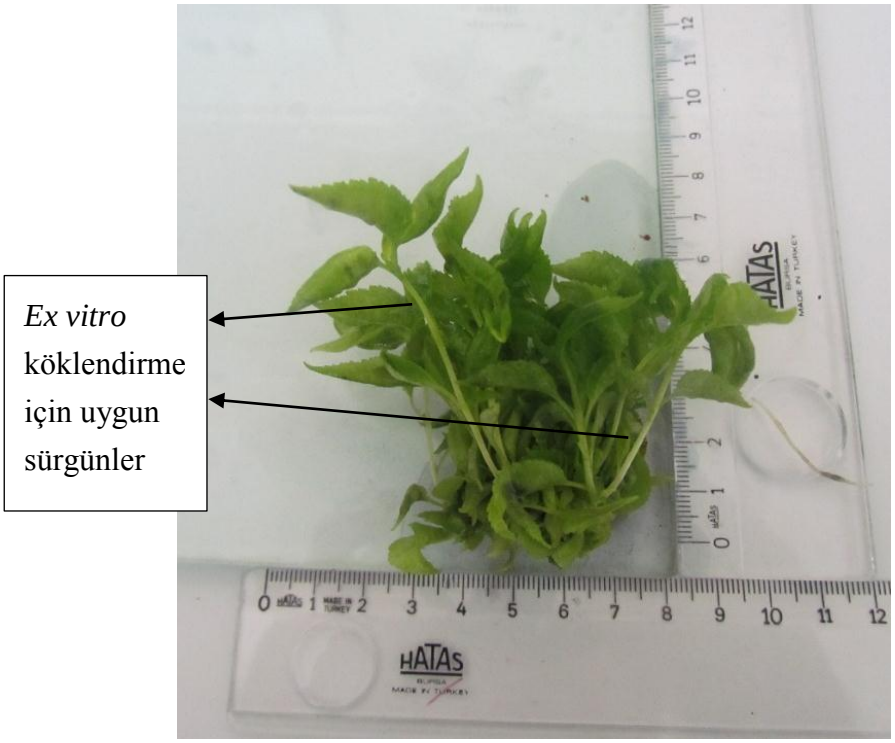
farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. Kültür süresi sonunda en fazla çoklu sürgün yaş ağırlığı geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde ve reaktörün üst rafından elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8: Biyoreaktör sistemlerindeki farklı raflardan ve yarı katı kültürlerde kurulan farklı bloktaki denemelerden elde edilen kültür sonundaki yaş ağırlık (g) değerleri için tek yönlü ANOVA analizi.

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	955.53	2	477.76	8.18	0.019	5.143
Gruplar İçinde	350.44	6	58.41			
Toplam	1305.97	8				
α=0.05, P= 0.019<α						

Sürgün çoğaltımı için biyoreaktörlerde ve yarı katı ortamlarda kültüre alınan çoklu sürgünlerde 2cm ve daha fazla uzunluğa sahip ve düzgün büyüyerek kıvrılmayan sürgünler *ex vitro* köklendirme için en uygun sürgünler olarak belirlenmiştir. Bu nedenle çoklu sürgünlerde bulunan sürgünlerin ortalama sürgün uzunlukları ile uzunluğu 2cm ve daha fazla olan sürgün sayıları saptanmıştır. Uzunluğu 2cm ve daha fazla olan sürgünlerin sayısı en fazla 98.33 adet olarak geçici yağmurlama sistemi ile çalışan raflı biyoreaktörde belirlenmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Çizelge 4.9).

Şekil 4.8: Geçici daldırma prensibi ile çalışan biyoreaktörden 18 gün sonra elde edilen çoklu sürgün



Şekil 4.9: Geçici yağmurlama prensibi ile çalışan biyoreaktörden 18 gün sonra elde edilen çoklu sürgün.

Şekil 4.10: Yarı katı kültürlerde 26 günlük kültürden sonra oluşan çoklu sürgün.

Çizelge 4.9: Sıvı kültürlerde ve yarı katı kültürlerde sürgün uzunluğu (cm) ve 2cm'den uzun sürgün sayısı (adet).

	Geçici Daldırma Prensibi İle Çalışan Raflı Biyoreaktör			Geçici Yağmurlama Sistemi İle Çalışan Raflı Biyoreaktör			Yarı Katı Kültürler		
	Alt Raf	Orta Raf	Üst Raf	Alt Raf	Orta Raf	Üst Raf	1. Blok	2. Blok	3. Blok
Ortalama Sürgün Uzunluğu (cm)	2.96	2.64	2.32	2.65	2.76	2.94	2.03	2.00	2.05
Uzunluğu 2cm ve daha uzun sürgün sayısı (Adet)	102	92	84	94	97	104	70	76	72
Ortalama uzunluğu 2cm ve daha uzun sürgün sayısı (Adet)	92.67			98.33			72.67		

4.3. Yarı katı besin ortamlarında ve biyoreaktörlerden elde edilen 2cm uzunluğundaki sürgünlerin *ex vitro* köklendirilmesi

Biyoreaktörlerden ve yarı katı kültürlerden elde edilen 2cm boyunda ve daha uzun sürgünler kesilerek çoklu sürgün demetlerinden ayrıldıktan sonra, köklendirme tozu ile muamele edilerek *ex vitro* köklendirme işlemi ile tam bitkicik oluşumu sağlanmıştır. Farklı kültür yöntemlerinden gelen sürgünlerde köklenme başarıları da farklı olmuştur. En yüksek köklenme başarısı, sürgünlerin %93.22'sinin köklendiği geçici yağmurlama sistemi ile çalışan raflı biyoreaktörden elde edilen sürgünlerde belirlenmiştir. En düşük köklendirme başarısı ise %73.12 ile geçici daldırma prensibine dayalı çalışan raflı biyoreaktörden elde edilen sürgünlerde gözlenmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10: Biyoreaktörlerden ve yarı katı kültürlerden elde edilen 2cm uzunluğundaki sürgünlerden köklenen sürgün sayısı (adet) ve yüzdesi (%)

	Geçici Daldırma Prensibi İle Çalışan Raflı Biyoreaktör			Geçici Yağmurlama Sistemi İle Çalışan Raflı Biyoreaktör			Yarı Katı Kültürler		
	Alt Raf	Orta Raf	Üst Raf	Alt Raf	Orta Raf	Üst Raf	1. Tek.	2. Tek.	3. Tek.
Köklendirmeye Alınan Sürgün Sayısı (Adet)	102	92	84	94	97	104	70	76	72
Köklenen Sürgün sayısı (Adet)	70	62	70	88	89	96	63	68	66
Ex vitro Köklenme Yüzdesi (%)	68.63	67.39	83.33	93.61	91.75	94.31	90.00	89.47	91.67
Ortalama *Ex vitro* Köklenme Yüzdesi (%)	73.12			93.22			90.38		

Biyoreaktörler ve yarı katı kültürlerden elde edilen sürgünlerin *ex vitro* köklendirme verilerini kıyaslamak için yapılan tek yönlü ANOVA analizinde $P= 0.006<\alpha$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.11). Bu durum her iki biyoreaktör sistemindeki raflardan ve yarı katı kültürlerden elde edilen 2cm uzunluğundaki sürgünlerin köklenme yüzdeleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. En yüksek köklenme oranı, geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörden elde edilen sürgünlerde belirlenmiştir.

Çizelge 4.11: Biyoreaktör sistemlerindeki farklı raflardan ve yarı katı kültürlerden elde edilen 2cm boyundaki sürgünlerin köklenme yüzdeleri için tek yönlü ANOVA analizi.

Varyans Kaynağı	SS	df	MS	F	P-değeri	F ölçütü
Gruplar Arasında	710.39	2	355.19	13.045	0.006	5.143
Gruplar İçinde	163.37	6	27.23			
Toplam	873.76	8				
$\alpha=0.05$, $P= 0.006<\alpha$						

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan tez çalışmasında Maxma 14 Delbard® Brokforest kiraz meyve anacının mikroçoğaltımı için yüzey sterilizasyonu yapılmadan meristem dokularını alma yöntemi belirlenmiştir. Bu yöntemle alınan meristemlerden %94,85 oranında steril meristem kültürleri elde edilmiştir. Oluşturulan yarı katı ortamlarda ve biyoreaktörlerde kültüre alınan çoklu sürgünler; çoğaltım katsayısı, ortalama sürgün uzunluğu, uzunluğu 2cm ve daha fazla olan sürgün sayısı kültür sonrası sürgün yaş ağırlığı ve *ex vitro* köklenme verimleri açısından değerlendirilmiştir. Belirlenen parametreler ışığında en başarılı sonuçlar geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörden elde edilmiştir. Geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde kültüre alınan çoklu sürgünlerde; çoğaltım katsayısı 7.29, ortalama sürgün uzunluğı 2.12cm, uzunluğu 2cm ve daha fazla olan ortalama sürgün adedi 98, ortalama sürgün yaş ağırlığı 68.81g ve *ex vitro* köklenme oranı %93,22 olarak belirlenmiştir.

Literatürde Maxma 14 Delbard® Brokforest (*Prunus mahaleb* x *Prunus avium*) kiraz meyve anacının mikroçoğaltımında başlangıç kültürleri oluşturmak amacı ile yapılan sterilizasyonda genellikle NaOCl (sodyum hipoklorit) çözeltisinin farklı konsantrasyonları kullanılmaktadır. Bu durum kültüre alınan bitki materyalinde nekroz oluşumlarına sebep olmaktadır (Muna et. al., 2000). Bu zararı önlemek amacı ile Muna et. al. 2000 yılında yaptıkları çalışmada, sterilizasyon sırasında $HgCL_2$ çözeltisi kullanmışlardır. Yaptığımız çalışmada *in vitro* başlangıç kültürlerinin oluşturulmasında bitki materyali olarak meristem doku kullanılmıştır. Meristem kültürleri oluşturulurken sürgünler, kullanılan özel bir teknik sayesinde herhangi bir sterilizasyon uygulamasına tabii tutulmamışlardır. Yapılan bu çalışma başlangıç kültürleri oluşturulurken yapılan sterilizasyondan kaynaklanan doku hasarlarını önleme açısından büyük önem arz etmektedir.

Meristemler kültüre alınırken besin ortamı olarak 30mg/L sükroz, 6g/L agar, farklı konsatrasyon ve kombinasyonda BAP, IBA ve NAA içeren MS, WPM bazlı ortamlar ve Algen Tarım ve Gıda Sanayi Ltd. Şti. tarafından geliştirilen modifiye MS tabanlı ticari besin ortamı ile karşılaştırılmıştır. Çalışmalar sırasında ticari ortam dışındaki yarı katı ortamlarda meristemlerden bazılarının anormal gelişim gösterdikleri saptanmıştır. Bunlar; yaprak morfolojilerinde bozulmalar, sürgün uçlarında nekroz oluşumları ve aşırı kallus oluşumu şeklinde kendini göstermiştir. Diğer taraftan ticari ortam bileşimi içerisinde kültüre alınan bitkiler %100 oranda

sağlıklı gelişim göstermişlerdir. Bu sebeple biyoreaktörlerdeki sıvı kültürdeki çalışmalar sadece agarsız ticari besin ortamı üzerinden sürdürülmüştür.

Kültüre alındıktan sonra ilk 1 hafta karanlık ortada tutulan meristemlerin bir hafta sonunda primordiyaları belirgin hale gelmiştir. Fenolik bileşik oluşumunu ve oksidasyonunu engellemek amacı ile yapılan bu işlem başarılı olmuştur. Kültüre alınan meristemlerin hiçbirinde kararma gözlemlenmemiştir. Yeni gelişen yapraklar WPM ve MS ortamlarında morfolojik bozukluklar göstermişlerdir. Ayrıca yine WPM ve MS ortamlarında 2 haftadan itibaren kallus oluşumları artmış ve sürgün gelişimi yavaşlamıştır.

Karanlık ortamdan 16 saatlik fotoperiyotta kültüre alınan meristem kültürlerinde ışıklı ortamdaki kültürlerinin 2-3. haftasında gerçek yaprak oluşumları gözlenmiştir.

Geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde kültüre alınan çoklu sürgünler 2. günde uzamaya başlayarak yer çekiminin aksi doğrultuda yönelmeye başlamışlardır. Geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde bu yönelim daha geç gerçekleşerek 6. günde gözlemlenmiştir. Her iki biyoreaktör sisteminde de kültürün 6. gününde ise sürgün altlarında yeşil kalluslar ve yeni sürgünler oluşmaya başlamıştır 10-15. günlerinde ise yeşil kalluslar yerlerini çoğunlukla küçük sürgünlere bırakmıştır. Kültür süresinin son günlerinde ise yeni oluşan sürgünler uzama göstermişlerdir.

Çoklu sürgünlerin gelişim aşamaları sıvı ve yarı katı kültürlerde benzer şekilde gerçekleşmiştir. İlk önce yeşil kallus ve yeni sürgün oluşumları gözlenmiş ardından yeşil kallus dokusundan sürgün oluşumları devam etmiş ve oluşan yeni sürgünler uzamıştır. Bunula birlikte, bu aşamaların gözlenmesi yarı katı kültürlerde daha geç gerçekleşmiştir. Yeşil kallus ve yeni sürgünlerin oluşumu yarı katı kültürlerde kültür süresinin 7.-10. günler arasında, yeşil kalluslardan sürgün oluşumu 10.-20. günler arasında sürgün uzaması ise son 6 gün içerisinde gerçekleşmiştir.

Literatürde Maxma 14 Delbard® brokforest (*Prunus mahaleb* x *Prunus avium*) kiraz meyve anacının sıvı kültürde çoğaltımı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışma, hem sıvı kültürlerin oluşturulması açısından önem taşımakta, hem de tasarlanan biyoreaktörler ile büyük ölçekte üretim açısından bir ilk olma özelliği taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda sıvı kültürlerde

daha yüksek bir çoğaltım katsayısı ve daha çok sayıda sürgün elde edilmiştir. Ortalama sürgün uzunlukları da yarı katı kültürlerden daha fazladır. Bununla birlikte geçici yağmurlama prensibi ile çalışan raflı biyoreaktörde, geçici daldırma prensibi ile çalışan raflı biyoreaktöre kıyasla raflar arasında daha homojen bir üretim gerçekleştirilmiştir. Bunula birlikte her iki reaktörde üretim sonucunda raflar arasında sürgün çoğaltımında, oluşan sürgünlerin yaş ağırlıklarında ve elde edilen sürgünlerin köklenme ve aklimatizasyon verimlerinde farklılıklar görülmüştür. Elde edilen bulgular arasındaki farklar yapılan tek yönlü ANOVA analizi ile de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve raflar arasında belirlenen üretim sonuçları arasında farklar olduğu gösterilmiştir.

6. ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma sadece kiraz meyve anaçlarının değil diğer sert çekirdekli meyve anaçlarında da kullanılabilecek otomasyona uygun bir biyoreaktör sunmaktadır. Yapılan bu çalışma meyve anaçlarının klonal çoğaltımı alanında biyoreaktör tasarım ve optimizasyonu için yapılacak birçok çalışmaya ışık tutacaktır.

Devam eden çalışmalarda tasarlanan ve üzerinde çalışılan biyoreaktörlerin optimizasyonu üzerinde yoğunlaşılabilir ve bu şekilde daha iyi sonuçlar elde edilebilir. Yapılacak olan optimizasyon ve ölçek büyültme işlemleri ile daha büyük hacimlerde sürgün üretimi klonal çoğaltım sürecindeki maliyetleri düşürücü etki gösterecektir.

Reaktörler ile yapılan üretimlerde raflar arasındaki sonuçlarda farklılıklar gözlenmektedir. Ölçek büyültme işlemlerinde raflar daha homojen üretim yapacak şekilde tasarlanabilirler veya tek raflı yatay reaktörler dizayn edilebilir. Tek raflı yatay biyoreaktörlerin daha fazla alan kaplayacağı unutulmamalıdır.

Besin depolama biriminden reaktöre beslenen besin ortamı beslemenin olmadığı dinlenme anlarında bir filtrasyon sisteminden geçirilerek olası enfeksiyon riskleri azaltılabilir.

Yapılacak olan bu ve benzeri tüm çalışmalar Türkiye'de meyve anaçları klonal çoğaltım sektöründe maliyetleri oldukça azaltacak ve ülkemizin dünya pazarında da söz sahibi olmasına yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Arencibia, A., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B. and Garcia-Gonzales, R. 2013. Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Scientia Horticulturae* 160: 49-53pp.

Bolsu, A., Akça, Y., 2011, Mahlep anacı üzerine aşılı 5 kiraz çeşidinin bazı morfolojik özellikleri ile meyve kalite özelliklerinin belirlenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, Tokat, 15s.

Cui, H. Y., Murthy, H., Moh, S., Cui, Y. Y., Lee, E. J., and Paek, K. Y. 2014. Production of biomass and bioactive compounds in protocorm cultures of Dendrobium candidum Wall ex Lindl. using balloon type bubble bioreactors. *Industrial Crops and Products* 53:28-33pp.

Debnath, S. (2010). Adventitious shoot regeneration in a bioreactor system and EST-PCR based clonal fidelity in lowbush blueberry (Vaccinium angustifolium Ait.). *Scientia Horticulturae* 128: 124-130pp.

Demiral, S., Ülger, S., 2008, Gisela 5 kiraz anacının doku kültürü ile çoğaltılması üzerine bir araştırma, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 21, Antalya, 4s.

Demirtaş, İ., Sarısu, H., C., 2011, Kiraz Yetiştiriciliği, Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, 11, 12s.

Driver, J. A., Kuniyuki, A. H., 1984. In vitro-propagation of paradox walnut rootstock. HortScience 19, 507–509pp.

Ducos, J., Chantanumat, P., Vuong, P., Lambot, C., and Pétiard, V. 2007. Mass Propagation of Robusta Clones: Disposable Plastic Bags for. *Acta Hort.*764: 33-40pp.

Eroğul, D., 2012, Kiraz yetiştiriciliğinde anaçların kullanımı, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 9(2), 5s.

Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (a), "Production quantities by country" http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E (Erişim tarihi: 1 Ağustos 2015).

Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division (b), "Trade Crops and Livestock Products" http://faostat3.fao.org/download/T/TP/E (Erişim tarihi: 1 Ağustos 2015).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, "Meyve/Asma Fidan ve Üretim Materyali İle Çilek/Sebze Fidesi İthalat Uygulama Genelgesi (2014/2)" http://www.tarim.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Genelgeler/BUGEM/MEYVE%20İTHALAT%20GENELGESİ%202014-2.pdf (Erişim tarihi 1 Ağustos 2015)

Günal, F., 2006, Gisela 5 (P. cerasus x P. canescens) ve Maxma 14 (P. mahalep) anaçlarından invitro da sürgün elde edilmesi üzerine değişik BAP VE 2,4-D düzeylerinin etkilerinin belirlenmesi, Süleyman Demirel üniversitesi, fen bilimleri enstitüsü, bahçe bitkileri anabilim dalı yüksek lisans tezi, Isparta, 56s.

Güçlü, F., Koyuncu, F., Şan, B., 2010, Bazı Klon Kiraz Anaçlarının Doku Kültürü Yöntemiyle Çoğaltılması, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 14-2s.

George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G., 2008, Plant Propagation By Tissue Culture, Springer, 504p.

Hepaksoy, S., 2004, Bazı kiraz anaçlarının mikroçoğaltımı üzerinde araştırmalar. I. Gelişme ve çoğalma, Ege Üniversitesi Ziraat Fak. Dergisi, 41, İzmir, 11s.

Hosseini, A. R. D., Moghadam, E. G., Khorasani, S. K., Bihamta, M. R., 2011, Effects of Growth regulators on micropropagation of some mahaleb dwarf genotypes (Prunus mahaleb L.), Scholars Research Library, 3, USA, 7p.

Hvoslef-Eide, K. A., Preil, W., 2005, Liquid Culture Systems For In Vitro Plant Propagation, Springer, 578p.

Reynoird, J. P., 2013, Coordinator of the Int. MSc Plant Breeding, La Salle University, Kişisel iletişim.

Jin, M., Piao, X., Park, S., and Lian, M. 2013. Micropropagation using a bioreactor system and subsequent acclimatization of grape rootstock '5BB'. *Scientia Horticulturae* 164: 35-40pp.

Kitin, P., Iliev, I., Scaltsoyiannes, A., Nellas, C., Rubos, A., Funada, R., 2005, A comparative histological study between normal and fasciated shoots of Prunus avium generated in vitro, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82, Japan, 11p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Klerk, G. J., and Brugge, J. 2011. Micropropagation of dahlia in static liquid medium using slow-release tools of medium ingredients. *Scientia Horticulturae* 127: 542-547pp.

Lloyd, G., McCown, B., 1980, Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia lotifolia by use of shoot type culture, Proc. Int. Plant Prop. Soc., 30p.

Marbun, C., Toruan-Mathius, N., Utomo, R., and Liwang, T. 2015. Micropropagation of Embryogenic Callus of Oil Palm(*Elaeis guineensis* Jacq.) Using Temporary Immersion System. *Procedia Chemistry* 14:122-129pp.

Morel, G. M., Wetmore, R. H., 1951. Tissue culture of monocotyledons. Am. J. Bot. 38, 138–140pp.

Muna, A., Ahmad, A., Mahmoud, K., Abdul-Rahman, K., 2000, In vitro propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59p.

Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 15, 24p.

Quoirin, M., Lepoivre, P., Boxus, P., 1977. Un premier bilan de dix années de recherche sur les cultures de méristèmes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux (in French). Compte rendu des recherches, 1976–1977. Station des Cultures Fruitières et Marrîchères de Gembloux, pp. 93–117pp.

Shaik, S., Dewir, Y., 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: 180-186pp.

Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K., Therios, I., 2013, In vitroplant regeneration from leaf explants of the cherry rootstocks CAB-6P, Gisela 6, and MxM 14 using sodium nitroprusside, In vitro Cellular and Developmental Biology, Greece, 9p.

Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K., Therios, I., 2013, Effects of exogenous L-arginine on in vitro rooting, chlorophyll, carbohydrate, and proline concentrations in the sweet cherry rootstock MxM14 (Prunus avium x L. Prunus mahaleb L.), Plant Biotechnol Rep., (7), 8p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

S**cherer, R., Garcia, A., Fraga, H., Vesco, L., Steinmacher, D., and Guerra, M.** 2013. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus var*.comosus). *Scientia Horticulturae* 151:38-45pp.

Welander, M., Persson, J., Asp, H., and Zhu, L. 2014. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae* 179: 227-232pp.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladıktan sonra 2005 yılında Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümünü kazandı. 2011 yılında lisans öğrenimini tamamlayarak Biyomühendis ünvanını aldı. 2011 yılında Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı. Yüksek Lisans süresince özel bir bitki doku kültürü laboratuvarında çalışmaya başladı ve orada AR-GE ve Proje Geliştirme Müdürü olarak halen devam etmektedir.