

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜRKİYE'DEKİ ENDEMİK SIĞLA AĞACININ
(*Liquidambar orientalis* Mill.) GEÇİCİ DALDIRMA
SİSTEMİ İLE MİKROÇOĞALTIMININ
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZLEM BARAN AYAZ

MART

2018

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Özlem BARAN AYAZ tarafından hazırlanan TÜRKİYE'DEKİ ENDEMİK SİĞLA AĞACININ (*Liquidambar orientalis* Mill.) GEÇİCİ DALDIRMA SİSTEMİ İLE MİKROÇOĞALTIMININ ARAŞTIRILMASI tezinin 21/03/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Betül BÜRÜN (Jüri Başkanı, Danışman)

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Ergun KAYA

İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Bengi ERDAĞ
Biyoloji Anabilim Dalı,

İmza:

Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

İmza:

Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Betül BÜRÜN

İmza:

Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

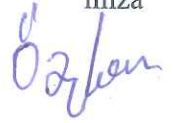
Savunma Tarihi: 21/03/2018

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yaptığımı da beyan ederim.

Özlem BARAN AYAZ

21/03/2018

imza



ÖZET

TÜRKİYE'DEKİ ENDEMİK SIĞLA AĞACININ (*Liquidambar orientalis* Mill.) GEÇİCİ DALDIRMA SİSTEMİ İLE MİKROÇOĞALTIMININ ARAŞTIRILMASI

Özlem BARAN AYAZ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Betül BÜRÜN

Mart 2018, 66 sayfa

Bu çalışmada *Liquidambar orientalis* bitkisinin sürgün ucu kültürü ve yarı-katı ortamlara göre daha az işgücü gerektiren sıvı besin ortamında periyodik daldırma sistemiyle mikroçoğaltımının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan *L. orientalis* tohumları Kasım-Aralık aylarında Köyceğiz-Marmaris yöresi sığla ormanlarından toplanmıştır. Yüzeysel sterilizasyonun ardından tohumlar, ½ Murahige-Skoog (MS) ortamında kültüre alınmıştır. Kültüre alınan tohumlarda %71.25-90 çimlenme olmuştur. ½ MS ortamında gelişen 4 haftalık in vitro fidelerden yarı-katı MS ve Woody Plant Medium (WPM) ortamlarında sürgün ucu kültürleri yapılmıştır. Sürgün ucu kültürlerinde, her iki ortama da bitki büyüme düzenleyicisi olarak 0.2 mg/L 6-benzilaminopurin (BAP) ve 0.05 mg/L Naftalen asetik asit (NAA) ilavesi yapılmıştır. Kültüre alınan sürgün uçlarının en iyi gelişimi bitki büyüme düzenleyicisi ilavesiz WPM besin ortamında olmuştur.

Ayrıca steril fidelerden 1. nodyumu içeren kısım kesilerek (8-10 mm) WPM sıvı besin ortamı içeren RITA® biyoreaktör sistemlerinde kültüre alınmış ve geçici daldırma ile gelişimleri araştırılmıştır. RITA® kaplarında eksplantların besin ortamına 15 dk daldırma süresinin 6 ve 8 saatte bir periyodik olarak uygulanması araştırılmıştır. Sekiz hafta sonra eksplantların canlılık yüzdesi, sürgünlerin boyu ve RITA® kabı başına sürgün yaş ağırlıkları tespit edilmiştir. 6 saatte 15 dk daldırma periyodunda canlı eksplant yüzdesi ve ortalama sürgün boyu bakımından daha iyi sonuçlar elde edilmiş ve bu daldırma periyodunda minimum bitki boyu 1.5 cm, maksimum bitki boyu 6 cm olmuştur. Sonuç olarak *L. orientalis* türünün geçici daldırma sisteminde (TIS) çoğaltımının optimize edilmesi amacıyla öncelikle eksplantların besin ortamına daldırılma süre ve sıklıklarının daha ayrıntılı araştırılması ve ortama ilave edilecek bitki büyüme düzenleyicileri için uygun kombinasyonların belirlenmesi çalışmaları yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Sığla Ağacı (*Liquidambar orientalis* Miller), Geçici Daldırma Sistemi (TIS), RITA[®], Mikroğoğaltım



ABSTRACT

INVESTIGATION OF MICROPROPAGATION OF ENDEMIC SWEETGUM TREE (*Liquidambar orientalis* Mill.) THROUGH TEMPORARY IMMERSION SYSTEM

Özlem BARAN AYAZ

Master of Science (M.Sc.) Thesis

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Betül BÜRÜN

March 2018, 66 pages

In this study, it is aimed to investigate the shoot tip culture of *L. orientalis* and to micropropagate through periodic immersion system on liquid medium which requires less labor than semisolid medium. The seeds of *L. orientalis* used in the study were collected from the sweetgum forests of Köyceğiz-Marmaris in November and December. After surface sterilization, the seeds were cultured on ½ Murahige-Skoog medium (MS). The cultured seeds were germinated between 71.25% and 90%. Shoot tips of the four-week in vitro seedlings that grown on ½ MS medium were cultured on semi-solid MS medium and Woody Plant Medium (WPM). In the shoot tip cultures, both media were supplemented with 2 mg/L 6-Benzylaminopurine (BAP) and 0.05 mg/L Naphthaleneacetic acid (NAA) as plant growth regulators. The highest development of those cultured shoot tips occurred on WPM medium without the plant growth regulator.

Moreover, the segments (8-10 mm) that include the first nodium of sterile seedlings were cultured in the RITA[®] systems of bioreactor which consist of liquid WPM medium and the development of them was researched with temporary immersion system. The 15 minutes immersion period as once 6 or 8 hours into nutrient medium of the explants in RITA[®] container was researched. After 8 weeks, the height of shoots, the percentages viability and the fresh shoot weights per each RITA[®] container were determined. In a 15 minutes immersion period at 6 hours, in terms of the percentages of viable explants and average shoot height better results were obtained, also, in this immersion period, minimum shoot height was 1.5 cm, maximum shoot height was 6 cm. Consequently, in order to optimize the micropropagation by the temporary immersion system (TIS) of *L. orientalis*, firstly the duration and frequency of immersion of explants into the nutrient medium should be researched in details additionally the suitable combinations for plant growth regulators to be added in the medium should be investigated.

Keywords: Sweetgum (*Liquidambar orientalis* Miller), Temporary Immersion System (TIS), RITA[®], Micropropagation





Canım Kızım Roza'ya.

ÖNSÖZ

Türkiye için relik endemik bir tür olan Anadolu Sığlası (*Liquidambar orientalis* Mill.) aynı zamanda ekonomik öneme sahip bir türdür. Bu türün yayılış alanı çeşitli sebeplerle gün geçtikçe daralmaktadır. Bu nedenle de sığla türünün korunması ve çoğaltım çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada, Anadolu sığla ağacından alınan eksplantların *in vitro* ortamda geçici daldırma sistemi biyoreaktörü kullanılarak hızlı ve ekonomik bir şekilde çoğaltılması, bu türün korunması ve ülkemiz ekonomisine katkı sağlaması amaçlanmıştır. Geçici daldırma sistemi ile sığla ağacının çoğaltımı literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışma, *L. orientalis*'in biyoreaktör sistemi ile *in vitro* üretim konusunda yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve yazım aşamasında yönlendirici katkılarıyla her zaman destek olan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Betül BÜRÜN'e, bitki materyali temininde sürekli yardımda bulunan Muğla Orman Fidanlık Müdürü Sayın İzzet BOLATKIRAN ve ekibine, ayrıca çalıştığımız sistemin kullanımıyla ilgili bize katkı sağlayan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ergun KAYA'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tüm çalışmalarım süresince yanımda olup destek olan, varlığıyla mutlu olduğum sevgili eşim Oğuz AYZ ve son laboratuvar çalışmalarında benimle olan güzel kızım Roza'ya yanımda oldukları için teşekkür ederim. Beni bu günlere getiren, her koşulda yanımda olduklarını ve desteklerini hissettiğim sevgili babam Cevdet BARAN ve canım annem Nezahat BARAN'a sonsuz teşekkürler. Ayrıca tezimi maddi olarak destekleyen Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Kapsam ve Amaç.....	1
1.2. Kaynak Özetleri	5
1.2.1. Geçici daldırma sistemi biyoreaktörleri.....	5
1.2.1.1.RITA® sistemi	7
1.2.1.2. Twin-Flask (BIT) sistemi.....	8
1.2.1.3. Ebb-and-Flow sistemleri.....	9
1.2.1.4. Termo-Foto biyoreaktör TIS	10
1.2.1.5. Hybrid Ebb-and-Flow	12
1.2.1.6. Kabarcıklarla daldırma biyoreaktörü.....	13
1.2.1.7. Rocker sistemi	14
1.2.1.8. Rotating Drum Bioreactor sistemi	15
1.2.2. Düşük maliyetli ve tek kullanımlık biyoreaktörler	15
1.2.2.1. Optima biyoreaktörler.....	16
1.2.2.2. Growtek biyoreaktörler	17
1.2.2.3. Setis biyoreaktörler	18
1.2.3. Geleneksel mikroçoğaltım teknikleri ile yarı-katı ve sıvı ortam kültürleri	19
1.2.4. Geçici daldırma sistemlerinin avantajları	20
1.2.5. Biyoreaktörler ile mikroçoğaltım.....	21
2.MATERYAL VE METOT	36
2.1.Bitki Materyali	36
2.2.In Vitro Kültür Çalışmaları için Kullanılan Besin Ortamlarının Hazırlanması	37
2.2.1.Sürgün ucu kültürü.....	38
2.2.1.1. Yarı-katı MS besin ortamının hazırlanması.....	39

2.2.1.2. Tohumların yüzeysel sterilizasyonu ve steril fidelerin elde edilmesi .	39
2.2.1.3.Sürgün uçlarının kültüre alınması	40
2.2.2.Geçici daldırma sistemi ile RITA® biyoreaktörlerinde sürgün ucu kültürü	42
2.2.2.1. Steril fidelerin elde edilmesi	42
2.2.2.2.Sıvı WPM besin ortamının hazırlanması	42
2.2.2.3.RITA® biyoreaktörlerinin sterilizasyonu.....	42
2.2.2.4.Sürgün ucu eksplantlarının RITA® sisteminde kültüre alınması.....	43
2.3. İstatistiki Analiz	44
3.BULGULAR	45
3.1. Sürgün Ucu Kültürü.....	45
3.1.1.Steril fidelerin elde edilmesi	45
3.1.2.Sürgün uçlarının gelişimleri.....	45
3.2. RITA® Biyoreaktörlerinde Sürgün Ucu Kültürü	48
3.2.1.RITA® biyoreaktörlerine aktarılacak sürgün uçları için steril fide elde edilmesi	48
3.2.2.Geçici daldırma sistemi ile RITA® biyoreaktörlerinde sürgün ucu kültürü	49
4.TARTIŞMA VE SONUÇLAR	52
4.1. <i>Liquidambar orientalis</i> Tohumlarının Çimlenme Durumu	52
4.2. <i>Liquidambar orientalis</i> (Anadolu Sığılası)'in <i>In Vitro</i> Çoğaltım Çalışmaları ..	53
4.3.Geçici Daldırma Sistemi ile RITA® Biyoreaktörlerinde Yapılan Çalışmalar ..	55
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. MS ve WPM besin ortamlarına ait bileşenler	38
Çizelge 3.1. Daldırma periyoduna göre sürgün boyu, canlılık yüzdesi ve RITA® kabı başına bitki yaş ağırlıkları	45
Çizelge 3.2. Daldırma periyoduna göre gelişen sürgün ucu yüzdesi, sürgün boyu ve RITA® kabı başına bitki yaş ağırlıkları	49



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sığla ağacının muğla bölgesindeki yayılış alanları.....	2
Şekil 1.2. Sığla (<i>Liquidambar orientalis</i>) ormanından bir görünüm	3
Şekil 1.3. Geçici daldırma sisteminin farklı bileşenlerini gösteren diyagram	6
Şekil 1.4. RITA® sisteminin teknolojik tasarımı ve çalışma prensibi	8
Şekil 1.5. TWİN-FLASK sistemi tasarımı ve çalışma prensibi	9
Şekil 1.6. Gel-git akışlı (EBB&FLOW) sistem	10
Şekil 1.7. Termo-foto biyoreaktör sistemi ve çalışma prensibi	11
Şekil 1.8. Hibrit gel-git akışlı sisteminin tasarımı ve çalışma prensibi.....	12
Şekil 1.9. Kabarcık sistemi ile daldırma biyoreaktörünün tasarımı ve çalışma prensibi	13
Şekil 1.10. ROCKER TIS'in teknolojik tasarımı.....	14
Şekil 1.11. Döner tamburlu biyoreaktör sisteminin teknolojik tasarımı	15
Şekil 1.12. Düşük maliyetli ve tek kullanımlık biyoreaktörlerin teknolojik tasarımları	16
Şekil 1.13. Optima biyoreaktörü	17
Şekil 1.14. Growtek biyoreaktörü	17
Şekil 1.15. Setis biyoreaktörlerinin tasarımı ve çalışma prensibi	18
Şekil 2.1. Sığla (<i>L. orientalis</i>) ağacının görünümü	36
Şekil 2.2. Yeni toplanmış ve kurutulmuş sığla kozalakları.....	37
Şekil 2.3. Sığla ağacı tohumlarının stereo mikroskop görüntüsü.....	37
Şekil 2.4. ½ MS besin ortamında kültüre alınan sığla tohumları.....	39
Şekil 2.5. Kültüre alınan tohumların kültür odasından bir görünümü	40
Şekil 2.6. 8 haftalık steril sığla fideleri	41
Şekil 2.7. Sürgün oluşum ortamlarına aktarılan sürgün uçları.....	41
Şekil 2.8. RITA® biyoreaktörlerinin sterilizasyonu	43
Şekil 2.9. RITA® sistemi	43
Şekil 2.10. RITA® biyoreaktörünün üst bölmesinde kültüre alınan eksplantların görünümü	44
Şekil 3.1. Kültüre alınan sığla tohumlarının çimlenme başlangıç ve gelişimleri.....	46
Şekil 3.2. Sürgün uçlarının ms ve wpm besin ortamlarında gelişimleri	47

Şekil 3.3. Sığla tohumlarının irilikleri.....	48
Şekil 3.4. RITA® biyoreaktörlerinde 6 saatte bir 15 dk daldırılan sürgün ucu eksplantlarının gelişimi.....	50
Şekil 3.5. RITA® biyoreaktörlerinde 8 saatte bir 15 dk daldırılan sürgün ucu eksplantlarının gelişimi.....	51



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Semboller

L	Litre
ml	Mililitre
g	Gram
mg	Miligram
m	Metre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
μm	Mikrometre
ppm	Parts per million
M	Mol
dk	Dakika
UV	Ultraviyole
%	Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
pH	Hidrojenin gücü (Power of Hydrogen)
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
WPM	Woody Plant Medium besin ortamı
BBD	Bitki büyüme düzenleyicileri
BAP	6-benzilaminopurin
NAA	Naftalen asetik asit
TDZ	Thidiazuron
IBA	Indol-3-bütirik asit
2.4-D	2.4-Diklorofenoksi asetik asit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit

NaOH	Sodyum hidroksit
HCl	Hidrojen klorür

Kısaltmalar

TIS	Temporary immersion system
RITA [®]	Récipient a Immersion Temporaire Automatique
BIT	Biorreactores de Inmersion Temporal
BIB [®]	Bioreactor of Immersion by Bubble
EUFORGEN	European Forest Genetic Resources Program
syn.	Synonim
½ MS	Yarım kuvvet MS
ha	Hektar alan
Mill.	Miller
Var.	Varyete
vb.	Ve benzeri
vd.	Ve diğerleri

1.GİRİŞ

1.1.Kapsam ve Amaç

Daha önceki yıllarda Hamamelidaceae familyasına dahil edilen *Liquidambar* cinsi, bitki taksonomistlerinin son yıllarda yaptığı çalışmalar sonucu (Angiosperm Phylogeny Group-APG III sistemine göre) Saxifragales takımının Altingiaceae familyasına dahil edilmiştir. *Liquidambar* cinsi dört farklı tür ile (Doğu Asya'da iki tür, Kuzey Amerika'da bir tür, Batı Asya'da bir tür olmak üzere) Kuzey Amerika'dan Doğu Asya'ya kadar geniş bir coğrafik alana dağılmıştır. Bu türlerden *Liquidambar acalycina* Chang (Chang sığılası) ve *Liquidambar formosana* Hance (Çin sığılası) Güney Çin, Kuzey Kore, Güney Kore, Tayvan, Laos, Kuzey Vietnam'da, *Liquidambar orientalis* Miller (Anadolu sığılası) Güneybatı Türkiye ve Rodos'ta, *Liquidambar styraciflua* L. (Amerikan sığılası) ise Kuzey Amerika'nın doğusunda yayılış gösterir (Ickert-Bond vd., 2005; Baran-Ayaz vd., 2015). *Liquidambar orientalis* (syn. *Liquidambar imberbe*) (Anadolu sığılası), Doğu Akdeniz elementi olarak jeolojik üçüncü zaman dilimine ait relikt endemik bir taksondur (Öztürk vd., 2008). Ülkemizde kuzeyde Çine çayı boyunca, güneyde Eşen çayının denize yakın kısımlarında, doğuda Silifke ve batıda Bodrum dolaylarında yayılır. Esas yayılış alanı Muğla olup özellikle Dalaman ve Köyceğiz Deltasıyla, Marmaris ve Fethiye'de kıyı düzlüklerinde bulunur (Şekil 1.1.). Denizden en uzak olan ve en yüksek yayılış yeri Denizli Acıpayam'dır (1000 m). Ayrıca Denizli'nin Günlük çayı kenarlarında (400 m), Antalya Aksu vadisi Aksu çayı kıyıları (100-250 m), Silifke Göksu nehri boyunca Göksu vadisinde (450 m) bulunur (Dirik, 1986; Alan vd., 2014).

Anadolu sığılası, ışık isteği yüksek olan bir türdür ve kuzey rüzgarlarına kapalı, sıcak ve nemli yerlerde yetişmektedir (Dirik, 1986). Düzlüklerde, nehir kenarı, bataklık alanlarda ve vadilerde yetişir. Besin maddelerince zengin topraklarda optimum büyüme göstermektedir (Dirik, 1986; Prada ve Arizpe, 2008).



Şekil 1.1. Sığla ağacının Muğla bölgesindeki yayılış alanları (Muğla Orman Bölge Müdürlüğü-Plan Proje Şube Müdürlüğünden alınmıştır, Ocak 2015).

Anadolu sığlasının önemi, endemik bir tür olmasının yanı sıra bitkide gövdenin yaralanması sonucu meydana gelen ‘sığla yağı’ndan da kaynaklanmaktadır. Türkiye’de Günlük ağacı olarak da bilinen Anadolu sığla ağacından elde edilen sığla yağı (balzam) iyi bir antiseptik ve parazit öldürücüdür. Pomat ve yakı halinde uyuz ve mantar gibi cilt hastalıklarında yararlıdır. Mide hastalıklarının tedavisinde, astım, bronşit gibi solunum yollarını tedavisinde de kullanılmaktadır. Sığla yağı ekonomik açıdan önemlidir. Amerika ve Türkiye’deki türler fiksator olarak parfümeride, kozmetikte ve eczacılıkta bazı ilaçların hazırlanmasında, ciklet ve tütünlerin kokulandırılmasında ayrıca, sinamik asit, sinamik alkol gibi kimyasal maddelerin doğal kaynağı olarak kullanılmaktadır (Öztürk vd., 2008; Aydınöz ve Bulut, 2014). Sığla yağı elde etmek üzere uygulanan gövde yaralanmaları ağacın zarar görmesine sebep olmaktadır. Yerleşim alanı ve tarım alanı açma gibi bazı nedenlerle de sığla orman alanları daralmış ve kalitesi bozulmuştur (Atay, 1985). Anadolu sığla orman alanının 1949’da 6.312 hektar iken, 2014’te yaklaşık 2.000 hektara kadar düştüğü belirtilmektedir. Bu alanın %60’lık bölümü Köyceğiz-Dalyan Özel Çevre Koruma Bölgesi sınırlarında bulunmaktadır (Özmen, 2011; Ürker, 2014) (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Sığla (*Liquidambar orientalis*) ormanından bir görünüm (Köyceğiz Sığla Ormanı, 11 Ağustos 2017).

Anadolu sığlası 2001 yılında EUFORGEN (European Forest Genetic Resources Program) tarafından değerli yapraklılar (Noble Hardwoods) grubuna alınarak, Avrupa çapında korunacak bir tür olarak kabul edilmiştir (Velioglu vd., 2008; Özmen, 2011; Öztürk vd., 2014; Baran-Ayaz vd., 2015).

Liquidambar orientalis türünün Türkiye florasında var. *orientalis* ve var. *integriloba* olmak üzere iki varyetesi bulunmaktadır. Marmaris, Köyceğiz, Fethiye bölgesindekiler var. *integriloba*, Muğla-Yatağan, Muğla-Yılanlı ve Aydın-Umurlu bölgesindekiler var. *orientalis* olarak belirtilmektedir (Velioglu vd., 2008). Anadolu sığlası 30-35 m yüksekliğe kadar büyüyen, yaprak döken ve monoik bir ağaçtır. Mart ayından Mayıs ayına kadar çiçeklenir, meyve Kasım ayından Aralık ayına kadar olgunlaşır ve tohumlar rüzgarile dağılır. Ağaç her yıl meyve üretir, ancak verimli ağaçlar üç yılda bir daha üretkendir. Ekolojik ve ekonomik önemi olan bu bitkinin çoğaltılması tohum ile olmaktadır (Prada ve Arizpe, 2008). Yumuşak odun çelikleri (softwood) ile çoğaltılmasının da mümkün olduğu (Öztürk vd., 2008); ayrıca aşılama ile üretimde de %90'ın üzerinde başarı sağlandığı belirtilmektedir (Genç ve vd., 1993'e atfen Parlak, 2012). Bunlara ek olarak Anadolu sığlası için yeni bir üretim yöntemi olarak ağaç gövdelerinde görülen ur benzeri oluşumlar (1-3 cm çapında) ile üretilebileceği ve konunun ayrıntılı araştırılması gerektiği de belirtilmektedir (Parlak,

2012). Son yıllarda birçok bitkideki mikroçoğaltım çalışmaları gibi *Liquidambar* türlerinin de doku kültürü teknikleri ile mikroçoğaltımı üzerinde çalışılmaktadır (Surgun ve Bürün, 2017).

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (apikal meristem vb.) veya organ (kök vb.) gibi çeşitli bitki kısımlarından (çeşitli bitki kısımları=eksplant) yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanabilir. Mikroçoğaltım aynı zamanda klonal çoğaltım olarak da bilinir. Bitkilerin uygun hormon, besin ihtiyaçları ve de kültür istekleri yeterince bilindiği takdirde tüm bitki türlerinin mikroçoğaltılması mümkündür. Bu teknik sayesinde hastaliksız bitkiler ve kültür sırasında meydana gelen somaklonal varyasyondan dolayı yeni çeşit ve genotipler elde edilebilmekte ayrıca, diğer tekniklere göre daha kısa kültür süresi ile daha az anaç kullanılarak daha yüksek üretim sağlanabilmektedir. Doku kültürü ile bitkilerin çoğaltılması pahalı olmasına karşın, iş gücünü azaltan otomasyon ve robotizasyon teknikleri kullanıldığında, kısa sürede fazla sayıda bitki ekonomik olarak üretilebilmektedir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Doku kültürü tekniklerinde genellikle yarı-katı (semi-solid) besin ortamları kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda yarı-katı besin ortamı üzerinde yetiştirilen eksplantların belirli bir süreden sonra agar varlığından dolayı kararmaya başladığı görülmüştür. Bu nedenle de yarı-katı çoğaltım ortamları bitki materyalinin periyodik olarak yeni besiyerine aktarımını (alt kültür) gerektirmektedir (Kitto, 1997). Bu aktarmalar sırasında kontaminasyon riski çok yüksektir. Ayrıca bitkilerin ticari amaçla seri üretimleri için gerekli otomasyon sağlanamadığından üretim maliyeti de artmaktadır (Özden-Tokatlı vd., 2007). Buna karşın sıvı (likit) kültür sistemlerinde yapılan mikroçoğaltım çalışmaları, jelleştirici ajanların kullanıldığı katı ortamdaki mikroçoğaltım çalışmaları ile karşılaştırıldığında, kontaminasyon riskinin ve

maliyetin daha düşük olduğu uygulamalardır (Etienne ve Berthouly, 2002). Bu nedenle de sıvı ortamda yapılan mikroçoğaltım çalışmaları ticari amaçlı mikroçoğaltım için daha fazla tercih edilmektedir. Sıvı ortamdaki *in vitro* kültürlerin avantajlarının yanında genellikle asfiksi (asphyxia-havasız kalma, havasızlıktan boğulma), su ile kaplanmış görünüm-camsılaşma (hyperhydricity-vitrification) ve kompleks bir ekipmana gereksinim duyulması gibi teknik sorunlar da görölmektedir. Sıvı ortamdaki kültürlerin bu dezavantajlarını azaltan geçici daldırmaya dayalı yeni bir kültür tekniği geliştirilmiştir (Teisson ve Alvard, 1995). Geçici daldırma, sıvı ortamdaki *in vitro* kültürlerdeki söz konusu sorunları gideren bir tekniktir (Teisson vd., 1996).

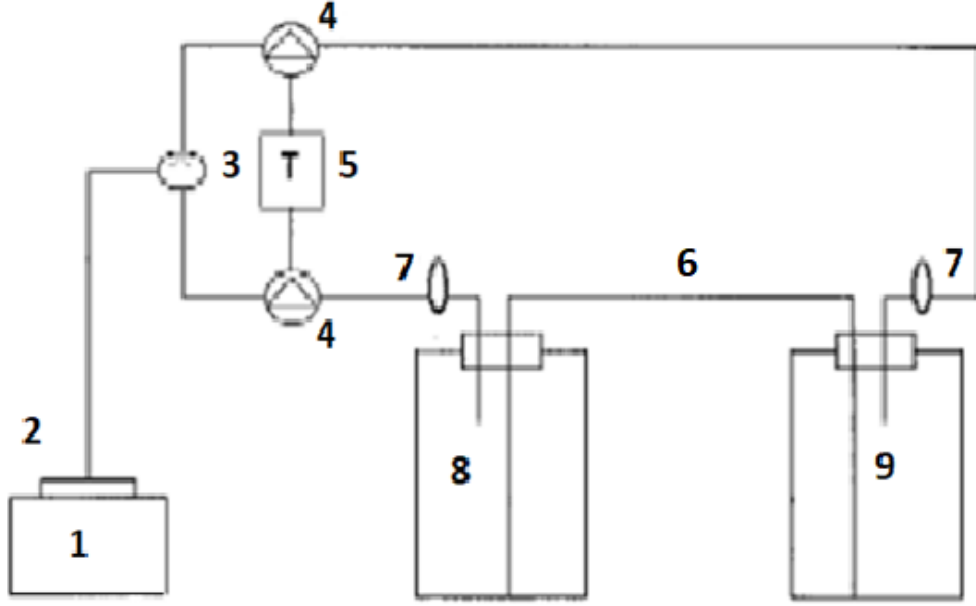
Tisserat ve Vandercook (1985), periyodik olarak boşaltılan ve daha sonra taze ortam ile yeniden doldurulan bir sistem tasarlamışlardır. Aitken-Christie ve Davies (1988), bitkinin agarlı ortamdaki kültüründen sonra sıvı ortama aktarılması şeklinde yarı otomatik bir kültür sistemi geliştirmişlerdir. Simonton ve arkadaşları (1991), belirlenen bir zamanlamaya göre, sıvı bitki kültür ortamına uygulanan programlanabilir bir mikroçoğaltım cihazı geliştirmişlerdir. Daha sonra Alvard ve arkadaşları (1993) tarafından bitki çoğaltımı için geçici daldırma sistemi tarif edilmiştir. Ticari ismi RITA® olan bu sistem, çeşitli bitki türlerinde başarıyla kullanılmış ve çoğalma oranında önemli bir artış sağlamıştır (Lorenzo vd., 1998; Baran-Ayaz vd., 2017).

Bu tez çalışmasında, geçici daldırma sisteminin bu özellikleri gözönüne alınarak bölgemizde yetişen ve endemik bir tür olan sığla ağacının bu teknik ile mikroçoğaltımının araştırılması amaçlanmıştır.

1.2. Kaynak Özetleri

1.2.1. Geçici daldırma sistemi biyoreaktörleri

Geçici daldırma sistemi biyoreaktörleri ilk defa Haris ve Mason (1983) tarafından geliştirilmiş ve sistemin ilk çizimi şekil 1.3'te verilmiştir. İlk başarılı bitki



Şekil 1.3. Geçici daldırma sisteminin farklı bileşenlerini gösteren diyagram (Jimenez vd., 1999)

(1) Hava kompresörü, (2) Güçlendirilmiş PVC boru sistemi (çap: 10 mm), (3) Basınç düzenleme istasyonu, (4) Üç yönlü selenoid elektrovalf, (5) Programlanabilir zamanlayıcı, (6) Otoklavlanabilir silikon tüp (çap: 6 mm), (7) Sterilizasyon filtresi (0.22 µm, Mmidisart 2000, Sartorius AG) (8) Kültür şişesi, (9) Besin ortamı rezervuar kabı.

rejenerasyonu *Solanum tuberosum* ve *Coffea arabicani*'nin somatik embriyolarından elde edilmiştir (Etienne ve Berthouly, 2002). Bitki mikroçoğaltımı için tanımlanan geçici daldırma sistemleri 4 kategoride toplanmıştır. Sistemin işleyişine göre: yan yatmış ve sallanan makineler; Bitki materyalinin tamamen daldırılması ve besin ortamının yenilenmesi; Kısmi daldırma ve sıvı besin ortamını yenileme mekanizması; Sıvı ortamın pnömatik sürüştü transferi ile besin ortamının yenilenmesi olmadan tamamen daldırma şeklindedir (Etienne ve Berthouly, 2002). Bakteri kültürleri için geliştirilen biyoreaktörler mikroçoğaltım için uygun bulunmamıştır. Bakteri kültürü için geliştirilmiş olan ve kabarcıkla havalandırılan biyoreaktörlerde, bitki hücrelerinin hassasiyeti nedeniyle mekanik hasar oluşmaktadır. *In vitro* kültürlerde sıvı ortamın avantajları nedeniyle mikroçoğaltımda sıvı ortamların kullanılması için sis biyoreaktörler geliştirilmiş ayrıca, agarlı ortamdaki kültürlere sıvı ortam eklenmesi veya durağan sıvı ortam kültürlerinde bitkileri desteklemek için kağıt köprü, selüloz blok veya süngerler gibi kültür desteklerini içeren bazı prosedürler de geliştirilmiştir. Ancak, mikroçoğaltım için

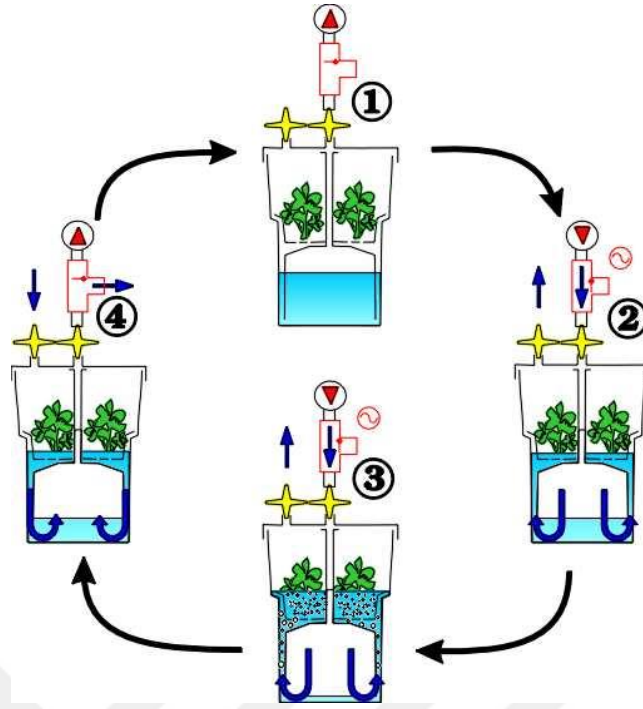
geçici daldırma, yani bitkiler ile besin ortamı arasında geçici temas, sıvı ortamdaki sürekli temastan daha fazla tercih edilmiştir ve sis biyoreaktörlerine benzer bir ilkeye dayalı olarak geçici daldırma biyoreaktörleri kullanıma sunulmuştur (Etienne ve Berthouly, 2002).

1.2.1.1.RITA® sistemi

RITA® (Otomatik geçici daldırma kabı), *in vitro* bitki kültürleri için TIS (Temporary Immersion System) (CIRAD, dağıtımçı VITROPIC, Fransa) geliştirilmiştir. Sistem, iki bölmeli otoklavlanabilir tek bir polipropilen kaptan (500 ml) oluşmaktadır (Georgiev vd., 2014). RITA® biyoreaktörleri, kafes destekli bir tepsiyle merkeze monte edilmiş, bir plastik boruyla ayrılmış, üst bölmede bitki materyali ve aşağıda besin ortamını depolayan iki bölmeli bir kaptır. Alt bölmeye uygulanan basınç, besleyici ortamı bir üst bölmeye itmekte ve bitkiler basınç uygulandığı sürece daldırılmaktadır. Daldırma süresi boyunca, bitkiler nazikçe karıştırılmakta ve aparatın üst kısmındaki çıkıştan basıncın çıkması ile kültür kabı içindeki atmosfer yenilenmektedir (Fedakar vd., 2012) (Şekil 1.4.).

RITA® sistemi, özellikle yavaş kurutulma koşulları sunmak için iyi yapılandırılmıştır (Murch vd., 2004). Bitki materyali üst bölmedeki bağıl nem ile kültür edilebilmekte ve bu alt bölmeye yerleştirilen doymuş fizyolojik serum tipi çözelti ile kontrol edilebilmektedir (Etienne ve Berthouly, 2002).

RITA® TIS'in avantajları, basit ve güvenilir olması, aparatlar için sağlam bir (kompakt) alan, çoğaltma amaçlı kültüre alınan bitki materyali için sıvı ortamın tamamen ayrılmasıyla yeterli bağıl nem seviyesinin desteklenmesi ve kullanım kolaylığıdır. Bu sistemin başlıca dezavantajları, besin ortamının yenilenmemesi ile güçlü bir havalandırma ve CO₂ ile zenginleştirme seçeneklerinin olmamasıdır (Georgiev vd., 2014).

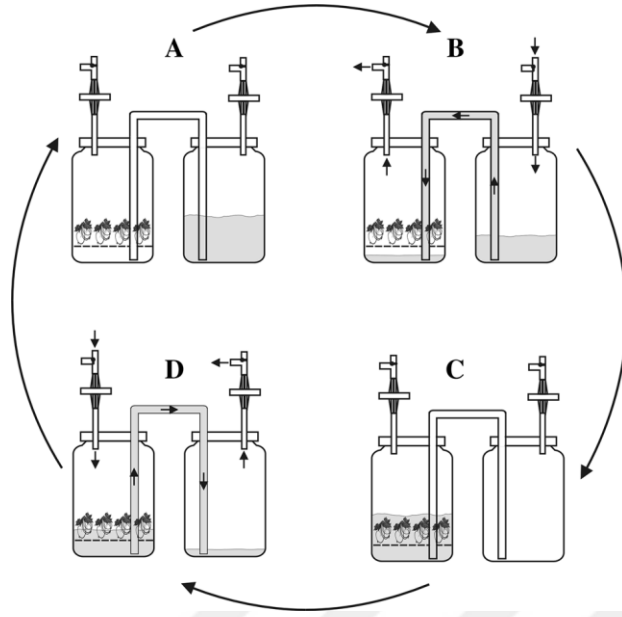


Şekil 1.4. RITA® sisteminin teknolojik tasarımı ve çalışma prensibi (<http://vitropic.pagesperso-orange.fr/rita/en/fonction.htm>).

(1) Bitkiler poliüretan köpük bir disk üzerine yerleştirilmiştir. (2) Membran filtreden steril olarak içeriye itilen yüksek basınçlı hava alt bölmeye ulaşır ve sıvı ortamı, bitkilerin bulunduğu üst bölmeye doğru hareket ettirir. (3) Steril bir hava akımı, sıvı ortamı durmadan çalkalayıp oksijen vererek kültür kabı içindeki havayı yeniler. (4) Hava akışı durdurulduğunda, kabın her iki bölümündeki basınç ayarlanır ve sıvı ortam yerçekimi ile kabın tabanına geri döner. Bitkiler kılcal çekim ile ince bir film tabakası ile örtülü kalır.

1.2.1.2. Twin-Flask (BIT) sistemi

İlk geliştirilen TIS'lerden biri olan Twin-Flask sistemi (ikiz şişeler sistemi), temelde bir U borusu (cam veya plastik) veya bir silikon tüp ile birbirine bağlanan iki kaptan (geniş ağızlı şişeler veya kavanozlar) oluşmaktadır. Kaplardan biri kültür haznesi işlevi görürken (kültür kabı), diğeri besin ortamı depolama tankı olarak kullanılmaktadır (Georgiev vd., 2014). Pnömatik olarak çalışan geçici bir daldırmayı sağlamanın en kolay yolu, şekil 1.5.'te görüldüğü gibi 250 ml'den 10 L'ye kadar iki cam veya plastik şişenin tüp ile birbirine bağlanması ve diğer alıcı içine besin ortamını itmek için aşırı basınç uygulamaktır (Etienne ve Berthouly, 2002).



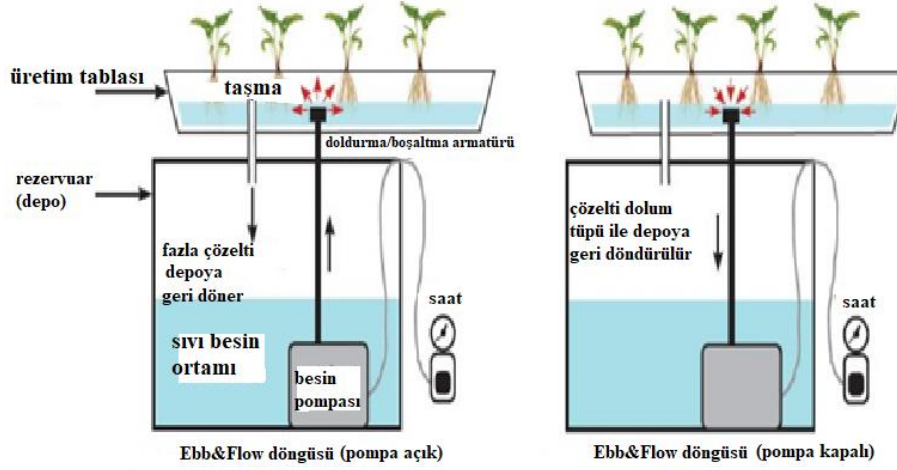
Şekil 1.5. Twin-Flask sistemi tasarımı ve çalışma prensibi (Georgiev vd., 2014).

(A) Durağan faz, (B) Sıvı ortamın, aşırı basınç ile depolama tankından kültür kabına itilmesi, (C) Daldırma fazı, (D) Aşırı basınç ile besin ortamının depolama tankına geri dönmesi.

BIT sisteminin tasarımı basit, güvenilir ve kullanımı kolaydır. Ayrıca düşük maliyeti, sterilitenin uzun süre korunabilmesi ve yaygın erişilebilirliği de avantajları arasında sayılabilir. Twin-Flask sistemlerinin en büyük dezavantajlarından biri kapsamlı otomasyonudur (zaman saati ve iki-üç yollu selenoid valf ihtiyacı olması). Ayrıca besin ortamını yenileme ve havalandırma seçeneklerinin olmamasıdır. Twin-Flask sistemleri bitki fidelerinin, sürgünlerin, nodal tomurcukların ve embriyo kültürlerinin çoğaltılmasında başarıyla kullanılmıştır (Georgiev vd., 2014).

1.2.1.3. Ebb-and-Flow sistemleri

Ebb-and-Flow (Gel-git akışlı sistem) sistemleri Twin-Flask sistemlerinin basitleştirilmiş bir modifikasyonu olarak tanımlanabilir (Şekil 1.6.). Sistem, bir kültür bölmesi olarak işlev gören geniş ağızlı büyük bir kap ve ortam depolama tankı olarak işlev gören daha küçük bir kap olmak üzere iki kaptan oluşmaktadır. Her iki kap da taban kısımlarında bulunan harici bağlantı noktaları ile birbirlerine bağlanmıştır. Büyük kap, bitki eksplantlarının poliüretan köpük desteğine yerleştirildiği kültür odasıdır. Poliüretan destek durağan faz boyunca yeterli nemin



Şekil 1.6. Gel-Git akışlı (Ebb&Flow) sistem (<https://gardenculturemagazine.com/techno-gardens/hydroponics/what-is-hydroponics-top-5-techniques/>)

(%85-90) korunmasını ve daldırma fazı sürecinde ise hava geçişlerini sağlamaktadır. Daha küçük olan kap, besin ortamı depolama tankıdır ve kültür bölmesinin altına yerleştirilmiştir.

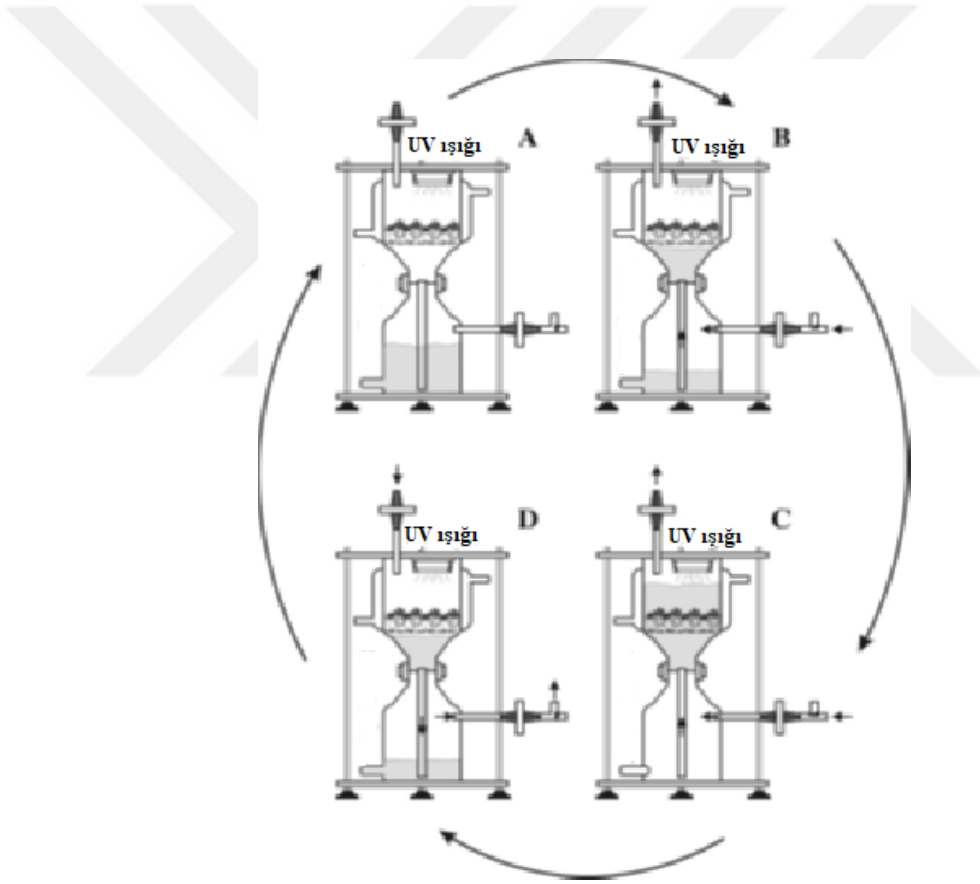
Ebb-and-Flow sistemlerinin avantajları; basit ve güvenli yapısı, basitleştirilmiş otomasyon ve daha düşük enerji girdisi olarak belirtilmiştir. Kültür kabındaki düzensiz ışık dağılımı, havalandırma ve CO₂ ile zenginleştirme seçeneklerinin olmaması sistemin başlıca dezavantajları arasında sayılmaktadır (Georgiev vd., 2014).

1.2.1.4. Termo-Foto biyoreaktör TIS

Bu TIS biyoreaktörü yalnızca Antarktik çimeni (Antarctic) (*Deschampsia antarctica* E. Desv.)'nun mikroçoğaltımı ve sekonder metabolit üretimi için geliştirilmiştir. Biyoreaktör, paslanmaz çelik bağlantı yerleri ve borularla birbirine bağlı olan ısıya dayanıklı iki cam kaptan oluşmaktadır. Üst bölüm kültür odası olarak kullanılmaktadır. Sıcaklığın hassas kontrolü için üst kapağa monte edilmiş bir su kabı ve bir UV ışık kaynağı ile donatılmıştır. Bitki materyali, kültür odasının içine yerleştirilmiş paslanmaz çelik bir ekran ile desteklenmektedir. Alt bölme ise besin ortamı depolama tankı olarak kullanılmaktadır. İki harici bağlantı noktası dizayn

edilmiştir; üstteki hava temini için, diğeri de ortamın ve örneklerin doldurulması için kullanılmaktadır (Şekil 1.7.).

Termo-foto biyoreaktörlerin başlıca avantajları, UV ışını ve sıcaklığın hassas kontrolü için seçenekler sunmasıdır; bu ekstermofil bitkilerin (extremophile plants) yetiştirilmesi için çok önemlidir. Bununla birlikte, karmaşık ve pahalı yapısı bu tasarımın başlıca tartışma konusu olmaktadır. Termo-foto biyoreaktörleri gibi aynı prensiple çalışan, cam şişeler veya NALGENE filtrasyon sistemleri kullanılarak düşük maliyetli bir TIS de geliştirilmiştir. Georgiev ve arkadaşları (2014), TIS'lerin hiçbirinin termo-foto biyoreaktörlerin sahip olduğu hassas sıcaklık kontrolü ile rekabet edecek düzeyde olmadığını söylemektedirler (Georgiev vd., 2014).

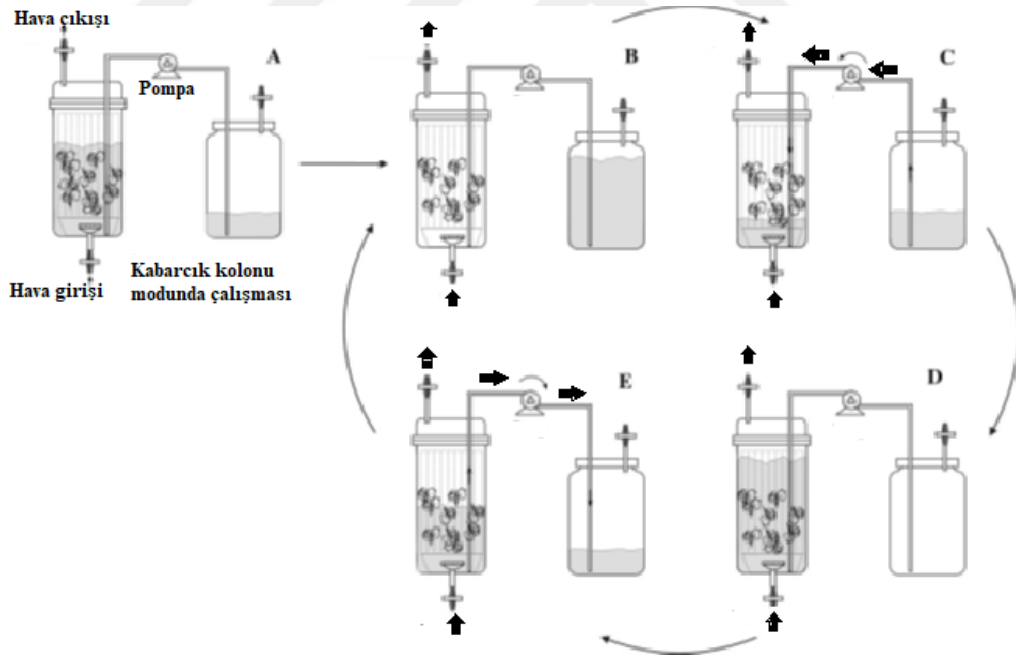


Şekil 1.7. Termo-Foto biyoreaktör sistemi ve çalışma prensibi (Georgiev vd., 2014).

(A) Durağan faz, (B) Sıvı ortamın kültür odasına itilmesi, (C) Daldırma periyodu, (D) Hava kaynağı durduktan sonra besin ortamının yerçekimi etkisi ile depolama tankına dönmesi.

1.2.1.5. Hybrid Ebb-and-Flow

Doymuş boru şeklindeki konvektif akışlı hibrit gel-git sistemi, yalnızca yüksek yoğunluklu saçak kök kültürleri için geliştirilmiştir (Şekil 1.8.). Bu sistem, inokülasyondan sonraki ilk günlerde kabarcık kolonu olarak işlev gören bir hibrit biyoreaktördür ve daha sonra anahtarlar yardımı ile Twin-Flask sistemi olarak çalıştırılmaktadır. Kabarcık kolonu olarak başlangıç işlemi, güvenli üniform bir dağılım ve transforme edilen (dönüştürülen) saçak köklerin immobilizasyonu (sabitleştirilmesi) için gereklidir. Bu sabitleştirme işlemi gerçekleştiğinden sonra, reaktör Twin-Flask sistemi olarak çalışmaya başlar. Peristaltik pompa, besin maddesini depolama tankından kültür bölmesine aktarmada ve tersi şekilde kültür bölmesinden depolama bölmesine aktarmada kullanılır. Kullanılan besin ortamı hava ile önceden doyurulmuştur, bu nedenle yoğun olarak büyüyen köklerin çok iç bölgelerine kadar oksijen sağlayabilir (Georgiev vd., 2014).



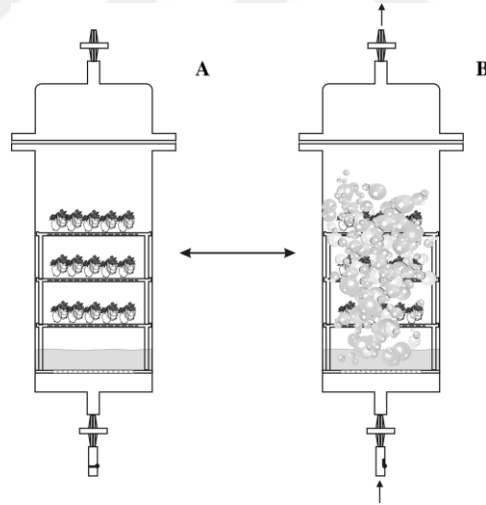
Şekil 1.8. Hibrit gel-git akışlı sisteminin tasarımı ve çalışma prensibi (Georgiev vd., 2014).

(A) Dönüştürülmüş tüy kökleri düzgün dağılılıp hareketsiz hale gelene kadar kabarcık kolonu modunda çalışması, (B-E) Twin-Flask sisteminde çalışması.

Bu hibrit biyoreaktörün başlıca avantajı, yüksek yoğunluklu kök kütlelerinin kültürü boyunca oksijen transferinin iyileştirilmiş olmasıdır. Başlıca dezavantajları, karmaşık tasarım, karmaşık çalışma düzeni, yalnızca kök kültürleri ile sınırlı kullanım, sabit (immobilize olan) kök biyokütlelerinin hasatının zorluğu olarak sıralanmaktadır (Georgiev vd., 2014).

1.2.1.6. Kabarcıklarla daldırma biyoreaktörü

Kabarcıklarla daldırma biyoreaktörü (BIB-Bioreactor of Immersion by Bubbles), sıvı ortam yerine köpük üzerine yayılmış eksplantların geçici daldırılmasına dayanan tamamen yeni bir kültür sistemidir. Sistem, mikro gözenekli (170-220 µm por genişliği) bir plak tarafından çapraz olarak iki bölüme ayrılmış tek bir cam silindirden oluşmaktadır (Şekil 1.9.). BIB ticari olarak Brezilyada 1.5 L ölçekli üretilmektedir. Son araştırmalar, BIB'nin çay ağacı (*Melaleuca alternifolia*) ve orkidenin (*Oncidium leucoxylum*) çoğaltılmasında RITA® TIS'den daha iyi büyüme ve eksplant başına daha fazla sayıda sürgün sağladığını göstermektedir.



Şekil 1.9. Kabarcık sistemi ile daldırma biyoreaktörünün tasarımı ve çalışma prensibi (Georgiev vd., 2014).

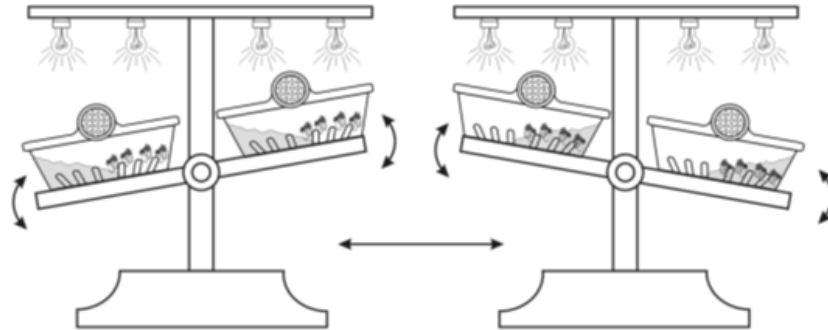
(A) Maruz kalma periyodu; (B) Daldırma periyodu. Hava verilir ve köpük oluşur. Eksplantlar, kabarcık formdaki kültür ortamına batırılır. Havalandırma durduğunda, sıvı drenajından dolayı köpük yoğunluğu zamanla azalır ve eksplantlar gaz ortamına maruz kalır.

Ayrıca basit yapısı, büyüme odası alanından daha iyi yararlanma, düşük stres ve daha iyi gaz alışverişi de sistemin avantajları arasında bulunmaktadır. Sistemin dezavantajları, besin ortamının yenilenememesi, güçlü havalandırmanın ve CO₂ ile zenginleştirmenin olmaması ve pahalı oluşudur. Bununla birlikte, besin ortamında Tween 20 (deterjan) bulunması ve aynı zamanda sıvı drenajının uzun zaman alması bazı hassas bitki türlerinin çoğaltımı için BIB uygulamasını kısıtlayabilmektedir (Georgiev vd., 2014).

1.2.1.7. Rocker sistemi

Sallanma hareketli bu sistemin kültür kapları, otoklavlanabilir şeffaf polikarbonattan üretilmiştir. Geniş yan ağız açıklığı dikdörtgen şeklinde olup, içinde membran filtre bulunan geniş vidalı bir kapakla kapatılmıştır. Çalkalama (rocker) sistemlerinde, kültür kaplarını belirli bir açıda eğmek için mekanik bir platform kullanılmaktadır; böylece besin ortamı, kültür kabının bir ucundan diğerine ve tam tersi şekilde hareket etmektedir (Şekil 1.10.) (Georgiev vd., 2014).

Bu sistemin en büyük avantajı, bir raf üzerine çok sayıda kültür kabının yerleştirilebilir olması ve ek bir havalandırma bağlantısı gerektirmemesidir. Ayrıca, üst boşluğun nemi koruyabilmesi, ışığa kolay erişim, büyük ölçekli üretimler için kullanımının kolay olması da avantajları arasında sayılmaktadır. Sistemin dezavantajları arasında elektromanyetik olarak eğim platformlarını gerektirmesi, büyüme odasında fazla yer kaplaması, eksplantların sıvı ortamdan tamamen ayrılmaması, besin ortamının yenilenememesi ve yüksek enerji maliyeti sayılabilir (Georgiev vd., 2014).

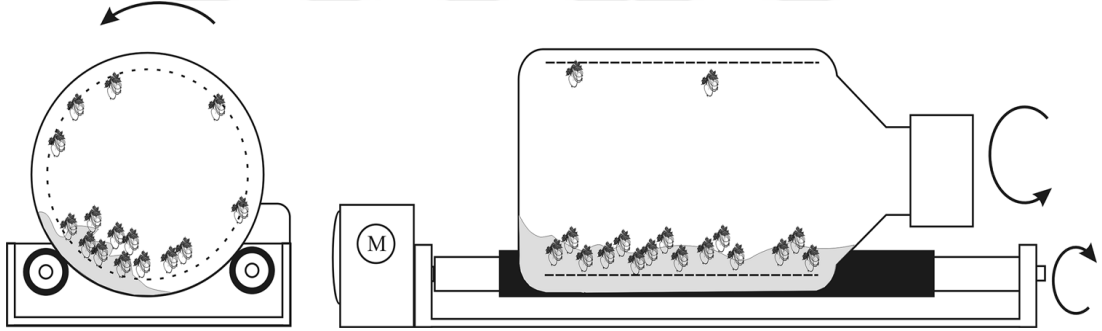


Şekil 1.10. Rocker TIS'in teknolojik tasarımı (Georgiev vd., 2014).

1.2.1.8. Rotating Drum Bioreactor sistemi

Döner tambur sistemi, bir makara tertibatı ve üzerine uzanan otoklavlanabilir bir plastik veya cam şişeden oluşmaktadır (Şekil 1.11.). Eksplantları desteklemek için şişeye, paslanmaz çelik bir ağ veya poliüretan bir köpük yerleştirilmiştir. Makara aparatı düşük hızda döndüğünde, sabitleştirilmiş olan eksplantlar periyodik olarak besin ortamına daldırılmakta ve hava ortamına (besin ortamından çıkarılarak) maruz bırakılmaktadır.

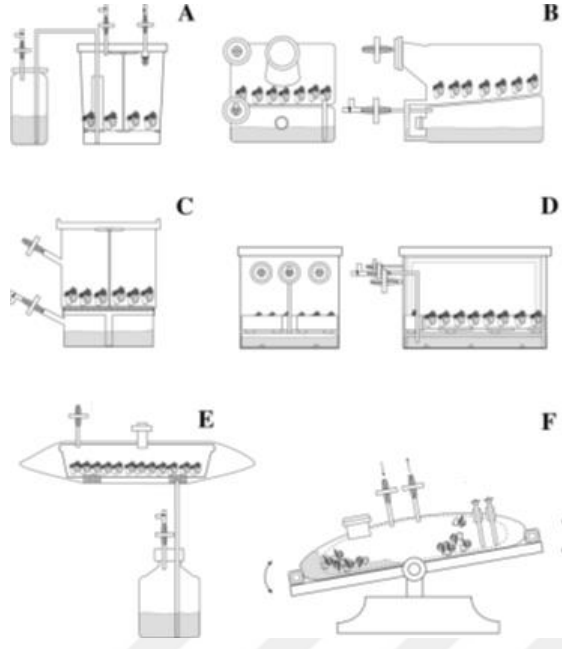
Döner tambur sisteminin avantajları, basit bir yapı olması, düşük yatırım maliyeti, üst boşlukta nemin korunması ile embriyo, sürgün ve saçak kök kültürleri için uygun olmasıdır. Döner platform gerektirmesi, daldırma ve maruz kalma sürelerinin kontrollü olmaması, büyüme odasında fazla yer kaplaması, eksplantların sıvı ortamdan tamamen ayrılmaması, hava değişimi ve CO₂ ile zenginleştirmenin olmaması ve besin ortamının yenilenememesi sistemin başlıca dezavantajları arasında sayılmaktadır (Georgiev vd., 2014).



Şekil 1.11. Döner tamburlu biyoreaktör sisteminin teknolojik tasarımı (Georgiev vd., 2014).

1.2.2. Düşük maliyetli ve tek kullanımlık biyoreaktörler

TIS ekipmanları için öncelikle yatırım maliyetlerini azaltmak, yer ve emekten tasarruf etmek amaçlanmıştır ve son yıllarda geliştirilen bazı TIS ekipmanları piyasaya sürülmüştür. Hepsinin ortak özelliği basit tasarımlı, ucuz ve değiştirilebilir plastik unsurlar olmalarıdır. Sistemlerin tek kullanımlık birkaç çeşidi de bulunmaktadır (Şekil 1.12.) (Georgiev vd., 2014).



Şekil 1.12. Düşük maliyetli ve tek kullanımlı biyoreaktörlerin teknolojik tasarımları (Georgiev vd., 2014).

(A) RALM biyoreaktörü, (B) Setis geçici daldırma biyoreaktör sistemi, (C) PLANTIMA sistemi, (D) PLANTFORM biyoreaktörü, (E) Box-in-Bag ve (F) WAVE biyoreaktörü

Biyoreaktör RALM Brezilya'da üretilmiş bir TIS çeşididir ve Twin-Flask sistemine göre çalışmaktadır. PLANTIMA Tayvan'da üretilmiştir ve bitki çoğaltımı için kullanılan, RITA® ilkesine benzer şekilde çalışan küçük hacimli bir TIS sistemidir. RITA® sisteminin çalışma ilkesini kullanan başka bir TIS, PLANTFORM biyoreaktörüdür.

Box-in-Bag ise Ebb-and-Flow prensibi ile çalışan tek kullanımlık bir TIS'dir. WAVE biyoreaktörü, önceden sterilize edilmiş tek kullanımlık kültür poşetlerini içeren, mekanik olarak sallanan bir platformdur (Georgiev vd., 2014).

1.2.2.1. Optima biyoreaktörler

Maksimum 10 L kapasiteye sahip olan Optima biyoreaktörleri mekanik olarak sallanarak karıştırma ve oksijen aktarımını sağlamak için özel bir dış platform (Şekil 1.13.) tarafından çalkalanmaya dayanmaktadır. Bu kültür kabı aynı zamanda, kap ve çevre arasındaki gaz transferinde daha fazla esneklik sağlamaktadır (Fedakar vd., 2012).



Şekil 1.13. Optima bioreaktörü (Fedakar vd., 2012).

1.2.2.2. Growtek bioreaktörler

Growtek olarak adlandırılan tek kullanımlık otoklavlanabilir bioreaktör kabında silikon membran olarak yan bir boru bulunmaktadır. Şekil 1.14.'de gösterildiği gibi bu silikon yan tüp ile ortam içeriğini bozmadan değişiklik yapılabilir.

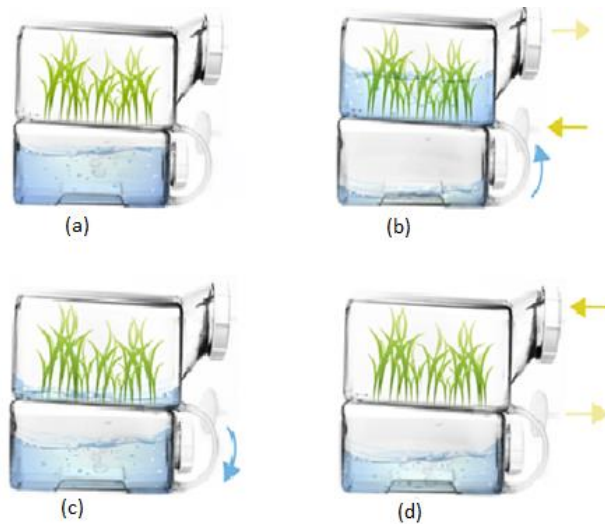


Şekil 1.14. Growtek bioreaktörü (<http://plant-biotechnology.tripod.com/ssi/growtek.html#>).

Yani besin ortamı ilavesi ya da besin ortamının boşaltılması sağlanmakta, bu sayede de bitki doku kültürünün tüm aşamaları (aseptik tohum çimlenmesi ve geçici daldırma ile gelişim) bir kap içinde tamamlanabilmektedir (Fedakar vd., 2012; <http://plant-biotechnology.tripod.com/ssi/growtek.html#>). Ayrıca besin ortamındaki katılaştırıcı maddelerin ortadan kaldırılması ile toplam maliyetin %75'i ve katılaştırıcılardaki yabancı maddelerden kaynaklanan büyüme sorunları giderilmektedir. Uygun çap ve yükseklik (çap X yükseklik: 100 X 150 mm) bitkilerin daha uzun süre büyümesine yardımcı olabilir (<http://plant-biotechnology.tripod.com/ssi/growtek.html#>)

1.2.2.3. Setis biyoreaktörler

Setis sistemi Belçika'da üretilmiş olup Ebb-and-Flow TIS sistemi ile benzer şekilde çalışmaktadır (Georgiev vd., 2014). Daha önce de belirtildiği gibi TIS teknolojisi, bitki materyalinin kısa süreli ve düzenli aralıklarla büyüme ortamına daldırılması ilkesidir. Bu daldırmalar bitkilerin besin maddelerini alması için yeterlidir (Fedakar vd., 2012). Setis biyoreaktörlerin çalışma mekanizması; durağan faz (Şekil 1.15a), daldırma fazı (Şekil 1.15b), tahliye aşaması (Şekil 1.15c) ve havalandırma fazı (Şekil 1.15d) olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır (Şekil 1.15.) (<http://www.setis-systems.be/about/about-setis/>).



Şekil 1.15. Setis biyoreaktörlerinin tasarımı ve çalışma prensibi (<http://www.setis-systems.be/about/about-setis/>).

Durağan fazda (a), basınç ile hava sağlanmamakta, besin maddeleri gaz ortamında, ortam kabında ve bitki materyalinde kalıntı olarak bulunmaktadır. Biyoreaktör çoğunlukla bu evrede tutulur. Daldırma fazında (b), besin ortamını üst kültür bölümüne aktarmak için sıkıştırılmış hava ortam kabına verilmektedir. Bitki materyali sıvı bir ortamda kalır ve besin alımları gerçekleşir. Boşaltma aşamasında (c), büyüme ortamı yerçekimi kuvvetleri tarafından besin ortamı bölmesine geri dönmektedir. Havalandırma fazında (d) ise ortam içindeki havanın yenilenmesi için sıkıştırılmış hava kültür kabına verilmektedir (Fedakar vd., 2012; <http://www.setis-systems.be/about/about-setis/>).

1.2.3. Geleneksel mikroçoğaltım teknikleri ile yarı-katı ve sıvı ortam kültürleri

Geleneksel çoğaltım teknikleri seçilen çoğaltma materyallerinin klonlanması üzerine çeşitli avantajlar sunarken, mikroçoğaltım maliyetli ve öngörülemeyen problemlerle karşılaşılan bir üretim teknolojisi olabilmektedir. Yarı-katı ortamdaki kültürlerde, bitki dokularının aseptik olarak çıkarılması el ile yapılmakta ve çok sayıda küçük kap kullanılmaktadır. Bitkilerin yarı-katı ortamda mikroçoğaltımında, belli bir süre sonra ortamdaki besinlerin tükenmesi nedeniyle (genellikle 4-6 haftadan sonra) alt kültürler ile bitkisel materyalin taze ortama periyodik transferi gerekmektedir. Ayrıca, kültürde sürekli ve hızlı bir şekilde doku büyümesi ve çoğalması, kültür kabının boyutu ile sınırlı olmaktadır. Kısaca agarlı kültürler otomasyonu zorlaştırmaktadır. Süs bitkileri, meyve ağaçları gibi bitkilerde çok yüksek bir birim değeri ile yüksek üretim maliyetleri, genel olarak mikroçoğaltımın ticari kullanımını sınırlamaktadır. İşgücü genel üretim maliyetlerinin %40-60'ını oluşturmaktadır. Materyali kültür ortamına yerleştirme mikroçoğaltımın en pahalı kısmı olmaktadır. Dokuların transferi, işin önemli bir parçası ve en teknik kısmıdır. Ayrıca temizleme, doldurma ve taşıma için de çok sayıda kap kullanılmaktadır. Diğer büyük maliyetler, iklimlendirme sırasında sürgün ve kök hiperhidrisitiden kaynaklanan kayıplardır (Etienne ve Berthouly, 2002). Sıvı kültürlerde yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında ise en çok karşılaşılan zorluklardan biri, bitki eksplantlarının sürekli sıvı ortamda bulunmasından kaynaklanan ve gövde çoğaltımını azaltan vitrifikasyon sorunudur. Bu nedenle son zamanlarda, bitki eksplantlarının sürekli sıvı içinde kalması yerine

periyodik olarak sıvı içerisinde daldırılmasını sağlayan geçici daldırma biyoreaktör sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler otsu ve odunsu bitkilerin kitle çoğaltımı için başarıyla kullanılmaktadır (Özden-Tokatlı vd., 2007).

1.2.4. Geçici daldırma sistemlerinin avantajları

Bitki mikroçoğaltımında sıvı kültür sistemleri çok daha uygun kültür şartları sağlayabilmekte, sterilizasyon mikrofiltrasyonla mümkün olmakta, besin ortamı kap değiştirmeden kolayca yenilenebilmekte ve bir kültür periyodundan sonra kap temizliği çok daha kolay olmaktadır. Yarı-katı ortamlardaki kültürler ile karşılaştırıldığında, çok daha büyük kaplar kullanılabilen ve aktarım süreleri azaltılmaktadır. Birçok türden bitki dokuları yarı-katı ortama göre sıvı ortamda daha iyi gelişmiştir. Örneğin, şeftalide (*Prunus persica* L.) daha çok sayıda sürgün, buğday (*Triticum aestivum*) ve pamukta (*Gossypium hirsutum*) daha fazla somatik embriyo üretilmiştir. Somatik embriyogenez organogenez ile karşılaştırıldığında, daha az emek isteyen bir biyoreaktör protokolüdür. Aitken-Chtistie ve Jones (1987)'a göre organogenez otomasyonu için bir kültür sistemindeki sürgünler ya da somatik embriyolar, transfer edilmeden önce uzun bir süre aynı kap içinde üretilmelidir. Böylece bitki gelişimi ve iklimlendirme için sürgün ya da somatik embriyolar uygun bir şekilde elde edilebilmektedir (Etienne ve Berthouly, 2002).

Mikroçoğaltımda, mikroyumru oluşturma ve somatik embriyogenez için geçici daldırmanın (TIS'in) olumlu etkileri belirtilmektedir. Daldırma süresi veya frekansı, sistemin verimliliği için en belirleyici parametredir. Ayrıca, esas olarak besin ortamı hacmi ve kültür kabı hacminin optimizasyonu özellikle sürgün çoğaltımı için çok önemli olmaktadır. Geçici daldırma genellikle bitki materyalinin kalitesini artırmakta, bu da sürgün gücünün artması ve morfolojik olarak normal somatik embriyoların frekansının artması ile sonuçlanmaktadır. Sıvı ortamın sebep olduğu hiperhidrisiti durumu, kültürü ciddi bir şekilde etkiler, ancak bu geçici daldırma kültür sistemleri ile ortadan kaldırılabilir ya da daldırma sürelerinin ayarlanması ile kontrol edilebilir (Etienne ve Berthouly, 2002). Geçici daldırma, katı ve sıvı kültür avantajlarını bir araya getirmektedir. Katı kültürler havalanma sağlar ancak, besin ortamı ile tam temas sağlamaz. Sıvı kültür ortamı ise etkili bir besin alımına izin

verir ancak, sıklıkla hiperhidrisiti görülür. Oysa otomatik geçici daldırma sistemleri ile yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında hiperhidrisitiye rastlanmamıştır (Escalona vd., 1999). Ayrıca geçici daldırma ile çoğaltılan bitki materyallerinin iklimlendirme aşaması da, yarı-katı ya da sıvı ortamda elde edilen materyallerdekinden daha iyi sonuç vermektedir (Etienne ve Berthouly, 2002).

Geleneksel tekniklerle mikroçoğaltım, yoğun emek isteyen bir yöntemdir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Paek ve arkadaşları (2005), klonal çoğaltımda modifiye hava asansörünü kullanarak, kabarcık kolon biyoreaktörleri (balon tipi bir kabarcık biyoreaktörü) ile daha az emek ve düşük maliyet sağlamışlardır. Sürgün, tomurcuk kümeleri ve somatik embriyoların çoğaltımı için geçici daldırma sistemlerini önermişlerdir. Biyoreaktörlerin basit tasarımı, modüler ve bağımsız doğası, kullanım kolaylığı ve transferler için gerekli işgücünü azaltmaları mikroçoğaltımın maliyetini düşürmektedir (Akula vd., 2000; Robert vd., 2006).

Üretim maliyetlerinin azaltılmasında etkili parametreler şunlardır:

1. İş gücünde ciddi bir azalma;
2. Raf alanında azalma;
3. Kullanılan kapların sayısında azalma;
4. Daha üstün biyolojik verimlilik (Akula vd., 2000; Etienne ve Berthouly, 2002; Georgiev vd., 2014).

1.2.5. Biyoreaktörler ile mikroçoğaltım

Liquidambar cinsinde biyoreaktörler ile herhangi bir mikroçoğaltım çalışmasına rastlanmamıştır. Ancak gerek odunsu gerek otsu diğer bazı bitkilerde biyoreaktörler ile yapılan pek çok mikroçoğaltım çalışması bulunmaktadır. Geçici daldırma sisteminin kullanıldığı bazı çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Alvard ve arkadaşları (1993), muzda beş farklı sıvı kültür ortamında meristem çoğaltımını araştırmışlar ve katı kültür ortamı ile karşılaştırmışlardır. Çalışılan uygulamalar: Katılaştırılmış kültür ortamı (uygulama 1); Bitkilerin sıvı ortama daldırılması (uygulama 2); Selüloz kültür destekli sıvı ortam (uygulama 3); Bitkilerin sıvı ortama kısmi daldırılması (uygulama 4); Kabarcıklanma ile havalanan sıvı ortam

(uygulama 5); Her 2 saatte bir 20 dk için geçici daldırma ile sıvı ortam (uygulama 6)'dır. 20 günün sonunda, istatistiksel olarak üç kültür grubu olarak farklı çoğalma oranları gözlenmiştir:

- Basit sıvı ortamda (uygulama 2) ve selüloz tabaka üzerinde (uygulama 3) sürgünler az gelişmiş ya da hiç gelişmemiştir.
- Katılaştırılmış ortamdaki sürgünler (uygulama 1), kısmi daldırma (uygulama 4) ve kabarcıkla havalandırılan ortamdaki (uygulama 5) sürgünlerde çoğalma oranları 2.2-3.1 aralığında bulunmuştur.
- En yüksek çoğalma oranı (>5) her 2 saatte 20 dk sıvı ortam ile geçici daldırılan eksplantlarda (uygulama 6) görülmüştür.

Kuru maddenin birikmesinde ise farklı uygulamalarda iki kültür grubu oluşmuştur: En düşük ağırlık (0.5 g civarında) 1., 2., 3. ve 4. uygulamalarda gözlenmiş ve birikim kabarcıkla havalandırılan sıvı ortamdaki eksplantlarda ve geçici daldırmaya tabi olan eksplantlarda 2-5 kat daha fazla olmuştur. En yüksek çoğalma oranları ve ağırlık artışları havalandırılan uygulamalarda (4. ve 5. uygulama) gözlenmiştir. Havalandırılan bu sistemlerde hiperhidrisiti görülürken eksplantların geçici daldırılmasında görülmemiştir (Alvard vd., 1993).

Etienne ve arkadaşları (1997), *Hevea brasiliensis* (Mill Arg)'in somatik embriyogenezi için geçici daldırma kültür sistemini test etmişlerdir. Embriyogenik kallus, rejenerasyon için katılaştırılmış bir ortama (Phytigel, Sigma, St Louis, MO) ve geçici daldırma için tasarlanmış bir kaptaki sıvı ortama yerleştirilmiştir. Geçici daldırma tekniği, embriyo gelişimi ve olgunlaşma, daha sonra da kurutulma ve çimlenme için katılaştırılmış ortama göre bazı avantajlara sahip bulunmuştur. Bu sistemde sıvı ortam içinde somatik embriyo üretimi, yarı-katı bir ortamdakinden 3-4 kat daha fazla olmuştur. Geçici daldırma, anormal embriyoların sayısını yarı yarıya azaltmış ve somatik embriyo gelişimi senkronize olmuştur. Geçici daldırma ile çimlenme boyunca kök gelişimi (+ %60) ve artan senkronizasyon ile kombine olan epikotil çıkışı (+ %35) büyük ölçüde teşvik edilmiş ve iş yükü önemli ölçüde azaltılmıştır (Etienne vd., 1997).

Lorenzo ve arkadaşları (1998), geliştirilmiş bir geçici daldırma sistemi ile şeker kamışında sürgün elde etmek üzere bir protokol ortaya koymuşlardır. İki aşamalı

olan bu protokol, eksplant olarak meristemler kullanılarak 1 mg L^{-1} paklobutrazol ilaveli 50 ml kültür ortamında 30 gün boyunca gerçekleştirilen kültürde eksplant başına en yüksek sürgün oluşumu (çoğalma oranı) elde edilmiş (1. aşama), bunu takiben (2. aşama) sürgünler 15 gün boyunca 1.0 mgL^{-1} giberellik asite maruz bırakılarak sürgün uzaması sağlanmıştır. Bu çalışmada, üç mikroçoğaltım prosedürü, katı ve sıvı kültür ortamı ile geçici daldırma sistemi karşılaştırılmıştır. Geçici daldırma sistemi ile klasik mikroçoğaltım protokollerine göre çoğalma oranı 2 katına çıkarılmış ve maliyet %46 düşürülmüştür. Geçici daldırma, sürgün oluşumunu ve sürgün boyunu artırmıştır. Bu sonuç, katı ve sıvı kültür ortamı avantajlarının kombinasyonundan kaynaklanmaktadır. Katı kültür ortamında mikroçoğaltım bitkiye hava değişimi sağlamak; ancak besin alımı eksplant taban yüzeyi ile sınırlı olmaktadır. Diğer taraftan, sıvı kültür ortamı ile mikroçoğaltımda, besin alınımı artmakta fakat hiperhidrisiti sık görülmektedir yani suyla kaplanan doku görünümü ve daha özel olarak yapraklarda camlaşma (vitrikasyon) da dahil olmak üzere morfolojik ve fizyolojik bozukluklar ve sürgünlerde çeşitli derecelerde düzensiz büyüme karakterize edilmektedir. Geçici daldırma sisteminde ise eksplantlar, sadece birkaç dakika için kültür ortamı ile temas etmektedir. Daldırılan tüm eksplant yüzeyi ile besin alınımı sağlanmaktadır. Bu iki özellik genellikle, klasik sıvı kültür prosedüründe bir arada değildir. Lorenzo ve arkadaşları (1998) geçici daldırma sistemini optimize etmek için bazı deneyler de gerçekleştirmişlerdir (çoğalma oranını artırmak dışında). Optimizasyon sonuçlarına göre, eksplant başına 50 ml kültür ortamı kullandıklarında çoğalma oranı yükselmiştir. Ancak, daha büyük bir ortam hacmi, daha düşük bir çoğalma oranına neden olmuştur. Paklobutrazolun kullanılması sürgün boyunun azalmasına sebep olmuştur (Paklobutrazolun giberellin sentezi inhibitörü oluşu nedeniyle). Bu engelleme aynı zamanda çoğalma artışının nedeni olabilir, çünkü ortamdaki tüm besinler sürgünün uzamasından çok sürgün oluşumu için kullanılmıştır. Paklobutrazol ilaveli ortamda sürgün oluşumundan sonra, sürgünler için bir uzama aşaması gerekmektedir. Giberellik asit de sürgün uzamasını teşvik etmek için kullanılmıştır (Lorenzo vd., 1998).

Escalona ve arkadaşları (1999), geçici daldırma tekniğini kullanarak ananas bitkilerinin çoğaltımı için bir protokol tarif etmişlerdir. Bu prosedür üç farklı aşamadan oluşmaktadır: Sürgün oluşumu, tomurcuk farklılaşması ve uzaması.

Protokolde başlangıç materyali olarak sıvı kültürlerden elde edilen *in vitro* sürgünler kullanılmıştır. Geçici daldırma tekniğinin değerlendirilmesi için, katı ve sıvı kültürler de kullanılarak çoğalma oranı, yaş ve kuru ağırlıkları karşılaştırılmıştır. Geçici daldırma sisteminde kültüre alınan eksplantların (yaklaşık 2-3 cm uzunlukta iki küçük sürgünlü *in vitro* bitkiler), test edilen diğer sistemlerden daha yüksek çoğalma oranına sahip olduğu görülmüştür. Geleneksel sıvı ortam ve katı ortamda elde edilen çoğalma oranlarına göre geçici daldırma sisteminde sırasıyla %300 ve %400 artış görülmüştür. Yaş ağırlık sürgün proliferasyonunun artması ile ilişkili bulunmuş ancak, sıvı ortam ile geçici daldırma sistemi kültürleri arasında kuru ağırlık bakımından hiçbir fark olmamıştır. Bu çelişkiyi geçici daldırma sistemi kültüründe yaprakların az gelişmiş olması ile açıklamışlardır. Geçici daldırma sistemi ile ananasın mikroçoğaltımında paklobutrazolun kullanımı, yaprak gelişimini sınırlarken yoğun tomurcuk kümeleri oluşumunu desteklemekte, böylece sürgün oluşum aşamasında gereksiz yaprak büyümesi engellenmiş olmaktadır (Escalona vd., 1999).

Jimenez ve arkadaşları (1999), patatesteki mikroyumru üretimi için 4 L'lik kaplar ile bir geçici daldırma sistemi tasarlamışlardır. Bu kültür tekniği katı kültürlerle kıyasla bazı avantajlar sağlamıştır: Sürgün uzunluğunda üç kat artış, bitki başına daha fazla sayıda nod ve iyileştirilmiş canlılık. Geleneksel şişelerde mikroyumru üretimindeki temel sorunlar, yumruların veriminin düşük olması (1-1.5 yumru/bitki) ve arazi koşullarına doğrudan transferini sınırlayan bir durum olarak yumru kökü boyutunun yetersiz olmasıdır. 12 ünitelerden oluşan sistemde, 10 L'lik polikarbon şişelerin her birine 150 tek nod içeren eksplantlar konulmuştur. Kültürde 9 hafta sonra, test edilen her iki çeşit için de (Desiree ve Atlantic) tekli nod başına ortalama 2.8 ile 3.1 arasında yumru elde edilmiştir. Yumruların ağırlığı ve büyüklüğü katı ortamından daha yüksek bulunmuştur. Kök uzunluğu katı ortamda yetiştirilen bitkilere göre yaklaşık üç kat fazla olmuştur. Ayrıca kültür süresi boyunca hiperhidrisiti belirtisi görülmemiştir. Geçici daldırma, patates mikroyumru üretimi için ayrıca, dikim mevsimi boyunca sürgün üretimi için faydalı bir seçenek olarak sunulmuştur (Jimenez vd., 1999).

Mordocco ve arkadaşları (2009), Avusturalya'da yetiştirilen ticari şeker kamışı çeşitlerinin büyük miktarlarda üretimi için, SmartSett® denilen enine kesit ince hücre tabakası kültür sistemini kullanarak hızlı, doğrudan bitki rejenerasyonu elde edilen

sistemi geliştirmişlerdir. Bu sistemde, şeker kamışının genç henüz açılmamış yapraklarının 1,5-2 mm kalınlığında enine kesitleri kullanılmış ve bir şeker kamışı sapından 12-16 hafta içinde 2.000 kadar bitkicik üretilmiştir. SmartSett®'in faydaları; tek bir ana bitkiden büyük miktarda bitkiciklerin üretimi, sap yerine yaprak dokularından bitkiciklerin üretimi, geleneksel sürgün çoğaltımına kıyasla çoğaltım süresinin kısalması ve hastalısız bitki materyali elde edilmesidir. Diğer mikroçoğaltım prosedürlerinde olduğu gibi SmartSett®'te de, bitkicik üretimi için işgücü büyük maliyet oluşturmaktadır (Mordocco vd., 2009). Mordocco ve arkadaşları (2009), işgücünü azaltmak ve verimliliği artırmak için, bir yarı-otomatik mikroçoğaltım sistemi olan SmartSett® (sürgün indüksiyon ortamı) sistemini, RITA® geçici daldırma biyoreaktörü (TIS) ile entegre etmişlerdir. Eksplantların doğrudan RITA® ünitelerinde (TIS) kültüre alınması durumunda dokuların çoğu için sürgünlerin uyarılmasının başarısız olduğu belirtilerek TIS'de etkili bir bitki üretimi için öncelikle yarı-katı ortamda sürgün oluşumu bir ön koşul olarak görülmüştür. TIS kültürleri için öncelikle 7 ya da 14 gün boyunca yarı-katı bir SmartSett® sürgün indüksiyon ortamı üzerinde ön kültür yapılmış olan eksplantlar ile geçici daldırmaya başlanması sürgün rejenerasyonunda kayda değer bir iyileşme göstermiştir. Araştırmacılar, şeker kamışında (üç farklı kültüvar) agarlı SmartSett® sürgün indüksiyon ortamında kültüre alınan enine ince yaprak parçalarını RITA® için başlangıç materyali olarak kullanmışlardır. RITA®'ya aktarmadan önce yarı-katı ortamda sürgün oluşumu başlamış, RITA® kültürlerinde daldırma frekansı, eksplant boyutu ve genotip sistemin verimliliğini (her bir birim kültürde üretilen bitkilerin sayısı) belirlemiştir. 14 gün uyarılan kültürler ile başlatılan RITA® geçici daldırmada öncelikle yaprak eksplantlarından organogenezis için daldırma sıklığının etkisini araştırmışlardır. RITA®'da her 12 veya 24 saatte 1 dk daldırma ile kültürde 45 gün sonra kap başına ortalama 275 sürgün üretimi başarılmıştır. Her 24 saatte 1 dk'lık daldırma, TIS'lerdeki maksimum bitki üretimi için en uygun periyot olarak bulunmuştur. Her 6 saatte 1 dk daldırma en düşük sürgün sayısını üretmiş ve kontaminasyon düzeyini artırmıştır. Ayrıca araştırmacılar RITA® kültür koşullarının maksimum bitki üretimi için kültüvara göre de optimize edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Sonuçlar, yaprak parçaları eksplant olarak kullanılarak RITA® TIS ile yüksek frekansta şeker kamışı fide üretiminin elde edilebilir olduğunu

göstermektedir. Eksplantlardan gelişen sürgünler, başarılı bir şekilde *in vitro*da köklendirilmiş ve *ex vitro* ortama alıştırılmışlardır (Mordocco vd., 2009).

Crescentia cujete L., tıbbi bileşikler olarak kullanılan bir dizi fitokimyasal maddelere sahip tıbbi bir ağaçtır. Murch ve arkadaşları (2004), bu bitkinin biyokimyasal analizleri ve tıbbi ürünlerinin üretimi için, steril koşullarda kontrollü bir ortamda yüksek kaliteli dokularının üretilmesine dair herhangi bir rapora rastlamadıklarını belirterek çalışmalarının amaçlarını şu şekilde sıralamışlardır:

- *C. cujete* için *in vitro* fide kültürlerinin kurulması,
- aksenik (temiz) kültürlerin sürdürülmesi ve proliferasyon için yöntemler geliştirilmesi,
- *de novo* rejenerasyon için protokollerin geliştirilmesi ve
- *C. cujete*'nin büyük ölçekli üretimi için biyoreaktörlerin en uygun biçiminin belirlenmesi.

Murch ve arkadaşları (2004) tarafından yabancı olarak toplanmış olan *C. cujete* fidelerinden *in vitro* kültür yapılmış ve bu aksenik kültürler başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Nod içeren parçalardan sürgünler çoğaltılmış ve bunlar 1 µmol l⁻¹ kinetin içeren bir ortamda ardışık alt kültür yapma ile iki yıldan fazla bir süre boyunca muhafaza edilmiştir. Kültüre alınan yaprak sapı bölümlerinden rejenerasyon, 2,4-D ile TDZ kombinasyonlarını içeren bir kültür ortamı üzerinde başarılmıştır. Ayrıca aksenik kültürler, *C. cujete*'nin biyokütle üretimi amacıyla üç farklı kültür sisteminin (yarı-katı, sıvı ve geçici daldırma sistemi) verimliliğini test etmek için kullanılmıştır. Bitkilerin geçici daldırma sistemi biyoreaktöründe büyütülmesi, biyokütle (yaş-kuru ağırlık), yaprak sayısı, sürgün boyu ve köklenme verimliliği açısından önemli artışlarla sonuçlanmıştır. Biyoreaktörlerde yetiştirilen bitkiler sera koşullarında dış ortama transfer edilmiş ve canlılık oranları yüksek bulunmuştur. Bu denemeler, biyokimyasal karakterizasyon ve yüksek kaliteli tıbbi ürünlerin üretilmesi için, kontrollü steril bir ortamda *C. cujete*'nin çoğaltılması ve bitkiciklerin büyütülmesi konusunda optimize edilmiş parametreleri sunmaktadır (Murch vd., 2004).

Albarrán ve arkadaşları (2005), geçici bir daldırma biyoreaktörü kullanarak *Coffea arabica* L. somatik embriyolarının kütle rejenerasyonu için daldırma sıklığı,

daldırma süresi ve döngüsünü optimize etmişlerdir. Kısa süreli daldırmada, daldırma sıklığının artırılması (her 24, 12 ve 4 saatte 1 dk daldırma) embriyo üretimini (sırasıyla 480, 2.094 ve 3.081 embriyo/1L-biyoreaktör) uyarılmış ve kaliteyi iyileştirmiştir (sırasıyla %60, %79 ve %85). Diğer taraftan daldırma süresinde artış olması (1, 5 ve 15 dk) embriyo rejenerasyonunu (1 L biyoreaktör başına 2.094'den 428'e) engellemiş ve bunların morfolojik kalitelerini (%79'dan %49'a) olumsuz etkilemiştir. Her 24, 12 ve 4 saatte 1dk daldırma, her 12 saatte 5 dk daldırma, her 12 ve 4 saatte 15 dk daldırma süreleri ve daldırma frekansları embriyo rejenerasyonunun iyileştirilmesi için değerlendirilmiştir. Her 4 saatte bir uygulanan 15 dk'lık daldırma süresinde, embriyoların %90'ında hiperhidrisite belirtileri görülmüştür. Hiperhidrik embriyolar, normal torpido şeklindeki embriyolar ile karşılaştırıldığında, taze ağırlık ve su içeriği yüksek, su potansiyeli bakımından olumsuz ve daha yüksek K+ değerleri ile karakterize edilmiştir. Mikrograflar, düzensiz bir epidermisin varlığı ve rezervlerin bulunmayışı gibi, globüler aşamada yapısal problemlerin olduğunu göstermiştir. Daldırma döngüleri ne olursa olsun, somatik embriyolar zigotik embriyolardan çok farklı su içeriği ve mineral madde özellikleri sergilemiştir. Her 4 saatte 1 dk'lık daldırma uygulanması, başarılı bitki rejenerasyonu (%75), hiperhidrisite görülmeyen torpido şeklindeki embriyoların büyük miktarlarda üretimini sağlamıştır (Albárran vd., 2005).

Alister ve arkadaşları (2005), okalıptüs klonlarının ticari üretimi için geçici daldırma biyoreaktör sistemini (RITA[®]) yarı-katı ortam kültürleri ile karşılaştırmışlardır. RITA[®] kaplarında yetiştirilen altı okalıptüs klonundaki aksillar tomurcuk çoğalması, yarı-katı ortamdaki çoğalma ile karşılaştırıldığında verimde 4-6 kat artış gözlenmiştir. Ayrıca RITA[®] sisteminde üretilen bitkilerin dış ortama adaptasyonu daha iyi ve yüksek verimli olmuştur. En yüksek çoğalma, kap başına 50 sürgün ile başlanmış olunan ve ortama her 10 dk'da bir 30 sn daldırma periyodu ile elde edilmiştir. Çoğalma döngüleri yarı-katı sistemde 25-28 gün, RITA[®]'da ise 14-18 gün arasında değişmiştir. RITA[®] sistemi ile çoğaltılan bitkilerin soğuğa toleranslı ve daha yüksek bir köklenme yetkinliğine sahip olduğu görülmüştür. RITA[®] kökenli bitkilerin *ex vitro* köklenmesinin, yarı-katı ortamdaki bitkilerden önemli ölçüde daha iyi olduğu belirlenmiştir (Alister vd., 2005).

Ruffoni ve Savona (2005), süs bitkilerinin mikroçoğaltımının iyileştirilmesi için geçici daldırma sistemini tarif etmişlerdir. Doku kültürü teknikleriyle klonal üretimin, deneyimli personel ihtiyacı ve otomatik olmaması nedeniyle çiçek sektöründe sınırlamaları vardır. Eğer sıvı ortam içinde büyüme ile sadece doku hiperhidrasyonunu (aşırı sulu) kontrol etmek veya önlemek mümkün olabileceyse bu ilginç alternatif fırsatlar sağlayabilir. Bu olumsuz özelliğin üstesinden gelmek ve üretim oranını artırmak amacı ile, biyokütle ve sıvı ortam arasında geçici temas sağlayacak bir sistem oluşturulmuştur. Bu amaçla geliştirilen özel kap ile Teisson ve Alvard (1995) çalışmış ve bu CIRAD (Fransa) tarafından tescil edilmiştir. Bu çalışmada, süs bitkileri *Zantedeschia aethiopica* ve *Antoryum andraeanum* ile otomatik geçici daldırma biyoreaktörleri kullanılarak mikroçoğaltım denemeleri kurulmuştur. Eksplantlar önceden belirlenen yarı-katı çoğaltma ortamlarının bileşimindeki çoğaltma ortamında jelleştirici olmadan kültüre alınmıştır. Tüm kültürler için her biri 3 dk olmak üzere 8 daldırma işlemi programlanmıştır. Sistem, $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosentetik foton akış yoğunluğu (PPFD) 16 saatlik aydınlık bir fotoperiyot ve $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıktaki büyüme odasında çalıştırılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak benziladenin ve giberellik asit kullanılmıştır. Her 20 günde bir ortam yenilenmiş, biyokütle taze ağırlığı ve çoğalma oranı kaydedilmiştir. Her iki türde de çoğalma, sürgün büyümesi ve köklenme açısından ilgi çekici sonuçlar elde edilmiştir. TIS'de üretilen tüm bitkicikler dış ortama adapte edilmiştir. Sonuç olarak, her iki türün de bu sistem ile kültürünün iyi bir potansiyele sahip olduğu ve sanayi için yüksek ölçekli üretim sağladığı belirtilmiştir (Ruffoni ve Savona, 2005).

Daquinta ve arkadaşları (2007) çalışmalarında, *Caladium hortulanum* bitkisinin *in vitro* kültüründe genç yaprak saplarını kullanmışlardır. Bilindiği gibi *Caladium*'lar, güzel yaprakları nedeniyle yüksek maliyeti olan, oldukça değerli süs bitkileridir. Bu bitki grubunda *C. Hortulanum* türü önemli bir pazar payına sahiptir. Türün çoğaltılması 2.0 mgL^{-1} 6-benzilaminopurin (BAP) ile desteklenmiş yarı-katı MS besin ortamında sağlanmıştır. Dahası, geçici daldırma tekniği kullanılarak kütle çoğaltımını sağlamak üzere özgün bir prosedür tarif etmişlerdir. Bu prosedür, otomatik bir geçici daldırma sisteminde başlangıç olarak filizlenme aşamasını ve bunu takiben geleneksel kültür yöntemlerinin kullanımı ile gerçekleştirilen bir uzama

aşamasını kapsamaktadır. Bu çalışmada, yarı-katı ortamda yaprak saplarından üretilen *in vitro* sürgünler başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Kültürde 45 gün sonra çoğalma oranları, geleneksel kültürlere göre geçici daldırmanın kullanıldığı sistemde 12 kat daha fazla olmuştur. En yüksek çoğalma oranı, eksplantların dört hafta boyunca geçici daldırma sistemindeki filizlenme ortamındaki (MS + 2.0 mg/L 6-BAP) kültür ile elde edilmiştir. Tomurcuk kümelerinin, bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS besin ortamında dört hafta boyunca kültüre alınması ile fazla sayıda, uniform ve elverişli (yani iklimlendirme için hazır) bitkiler elde edilmiştir. Bitkiler, 1:1 zeolit: şeker kamışı filtre substratı üzerinde etkin bir şekilde (%92) dış ortama adapte edilmiştir. Bu sonuçlar bir ön bilgi niteliğinde olmasına rağmen metot ticari düzeyde kullanılmaktadır (Daquinta vd., 2007).

Sankar-Thomas ve arkadaşları (2008), *Camptotheca acuminata* için geçici daldırma sisteminde (TIS) somatik embriyogenez yoluyla bitki rejenerasyonu için bir protokol tanımlamışlardır. Somatik embriyolar, TIS'de yetiştirilen 14 günlük *C. acuminata* fidelerinden hipokotil parçalarının kültüre alınması ile elde edilmiştir. Hipokotil parçaları, eksplantların fiksasyonunu desteklemek için mekanik bir cihaz ile modifiye edilmiş kültür kaplarına yerleştirilmiştir. Kültürler $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF ışık yoğunluğu ile 16 saatlik bir ışık periyodu altında muhafaza edilmiştir. 16 haftalık inkübasyondan sonra, 35 g L^{-1} sukroz içeren ve hormon ilave edilmemiş MS besin ortamının bulunduğu mekanik cihazda embriyogenik kalluslar şekillenmiştir. Bitkicik rejenerasyonu için, kotiledon safhasındaki somatik embriyolar, üç farklı konsantrasyonda 6-benzilamino-purin (0.5, 1.0 ve 1.5 mg L^{-1} BAP) içeren ve bitki büyüme düzenleyici içermeyen ortamda kültüre alınmıştır. Genel olarak, TIS'de *Camptotheca* embriyolarının büyümesi ve gelişmesi için en etkili konsantrasyon 0.5 mg L^{-1} BAP olarak bulunmuştur. Somatik embriyoları bitkiciklere dönüştürme, 0.5 mg L^{-1} BAP ile nemlendirilmiş sterilsüstratlar üzerinde başarıyla gerçekleştirilmiştir. Kotiledon embriyolardan türetilen bitkicikler, *ex vitro* koşullara transfer edilmeden önce 0.5 mg L^{-1} IBA ile *in vitro*da köklendirilmiştir (Sankar-Thomas vd., 2008).

Grozeva ve arkadaşları (2009), iki tatlı biber çeşidinin (Hebar ve Stryama) katı ve sıvı kültür ortamında rejenerasyonunu araştırmışlardır. Biber (*Capsicum annuum* L.), diğer *Solanaceae* türlerinden farklı olarak, *in vitro* rejenerasyon kapasitesi açısından

inatçı bir tür olarak kabul edilmektedir ve mikroçoğaltım başarısı birkaç durum ile sınırlı kalmıştır. Kültür ortamının katı ya da sıvı olması ayrıca, bitki genotipi adventif sürgün organogenezini etkilemiştir. Çalışmada sıvı kültürler geçici daldırma RITA® biyoreaktörlerinde inkübe edilmiştir. 60 günlük kültür boyunca sıvı ortamda sürgün ucu büyümesi, lateral (yanal) sürgün sayısı, bitkilerin köklenme yüzdesi ve mikroçoğaltım katsayısı önemli ölçüde artmış ve kallus oluşumu görülmemiştir. (Grozeva vd., 2009).

Özden ve arkadaşları (2010), yarı-katı besin ortamı ve geçici daldırma biyoreaktör sistemi (TIS) kullanarak Edremit yağlık çeşidine ait zeytin fidelerinden alınan nodal tomurcukların *in vitro* çoğaltımı için farklı karbon kaynaklarının (sukroz, mannitol ve glukoz) ve bitki büyüme düzenleyicilerinin (zeatin ve dikegulak) etkilerini araştırmışlardır. Zeytin nodal tomurcuklarından elde edilen çoğaltım sonuçlarında, mannitol, glukoz ve sukroz içeren yarı-katı besin ortamında gövde/eksplant oranı 1.0 olarak elde edilirken, besin ortamına karbon kaynağı olarak sadece mannitolün eklenmesi ile gövde/eksplant oranının 1.5 olduğu saptanmıştır. Bulunan sonuçlar, besin ortamına karbon kaynağı olarak sadece mannitol eklenmesinin nodal eksplantların mikroçoğaltımı için yeterli olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde zeytin bitkisinin *in vitro* koşullarda güçlü apikal dominansa sahip olduğu görülmektedir ve bu nedenle de yarı-katı besin ortamında çoğaltılan zeytin gövdelerinde daha çok gövde oluşumu görülmüş ancak, TIS kullanıldığında zeytin gövdelerinde bu dominansın kırıldığı görülmüştür. Böylece yanal gövdeler gelişme göstermiş ve bunun çoklu gövde oluşumu üzerine olumlu etkisi olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, zeytin bitkisine ait nodal eksplantlardan en fazla gövde rejenerasyonu ve çoklu gövde oluşumu mannitol, zeatin ve dikegulak içeren sıvı besin ortamında TIS kullanılarak elde edilmiştir. Bu sonuçlar TIS ile zeytin bitkisinin hızlı mikroçoğaltımı için yararlı olabileceğini göstermektedir (Özden vd., 2010).

Scheidt ve arkadaşları (2011), *in vitro* çalışmalarda ürün maliyetinin azaltılması ve optimizasyonu için yeni *in vitro* tekniklerin geliştirilmesi gerekliliğini vurgulamışlardır. Bu amaçla, BIB® (Kabarcık ile daldırma biyoreaktörü) biyoreaktörünü tanıtmak ve *Melaleuca alternifolia* bitkilerinin *in vitro* büyümesi için geleneksel kültür ve RITA® (Otomatik geçici daldırma) biyoreaktörünü

karşılaştırmışlardır. *In vitro* beşinci alt kültürlerden elde edilen 1 cm uzunluğundaki bitkiler materyal olarak kullanılmıştır. Uygulamalar, (1) Polipropilen kapaklı 200 ml cam şişelerin kullanıldığı geleneksel kültür (kontrol), (2) RITA[®] biyoreaktörü, (3) BIB[®] biyoreaktörü olarak üç farklı teknik ile gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörlerde sürekli daldırma ve havalandırma kullanılmıştır. 30 g/L sukroz ve 200 ml'lik kültür ortamı için 1 damla Tween 20[®] (kabarcık oluşturmak için örnek deterjan) ilave edilmiş sıvı MS ortamı kullanılmıştır. BIB[®] biyoreaktörü ile elde edilen değerler; toplam yaş ağırlık (0.39 g), sürgün ağırlığı (0.27 g), yaş ağırlık artışı (3.1) (başlangıç ağırlığı ile son ağırlık arasındaki ilişki), toplam kuru ağırlık (0.036 g) ve sürgün kuru ağırlığı (0.033 g) *in vitro* kültürlerin en iyi sonucu olmuştur. Sonuç olarak BIB[®] biyoreaktörünün *M. alternifolia* bitkilerinin biyokütle akümülyasyonunda daha etkili olduğu bulunmuştur (Schedit vd., 2011).

Ashraf ve arkadaşları (2013), *Chlorophytum borivilianum*'dan saponinlerin üretimi amacıyla RITA[®] (otomatik geçici daldırma) sistemi ile mikroyumru elde etmek için daldırma sürelerinin ve ortam bileşiminin optimizasyonu üzerinde çalışmışlardır. Mikroyumru oluşumu ortamına her 60 dk'da bir 15 dk daldırma, ortalama önemli ölçüde daha yüksek mikroyumru sayısını, uzunluğunu ve büyüme indeksini (sırasıyla 16, 52 mm ve 16) vermiştir ayrıca, hiperhidrisite engellenmiştir. Mikroyumru oluşturma ortamının kültürün 6. haftasında veya daha erken 3. haftasında hormonsuz sıvı MS (MSO) besin ortamı ile değiştirilmesi karşılaştırıldığında, mikroyumruların ortalama sayısı, uzunluğu ve büyüme indeksi açısından anlamlı olarak farklı olduğu, ancak ortamın 9 hafta sonra değiştirildiği kültürlerle kıyaslandığında önemli farklılık olmadığı görülmüştür. TIS kökenli yumruların saponin içeriği tarlada yetiştirilen ana bitkinin yumrularıyla karşılaştırıldığında, mikroyumrularda 1-3 kat saponin artışı olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar, *C. borivilianum*'da mikroyumruların büyük ölçekli üretimi ve saponin üretimi için TIS'in gelecek vaad eden bir uygulama olduğunu göstermektedir (Ashraf vd., 2013).

Pérez ve arkadaşları (2013), mantar meşesi (*Quercus suber* L.)'nde somatik embriyo üretiminin geliştirilmesi için geçici daldırma sistemini (RITA[®]) kullanmışlardır. Somatik embriyogenez, seçilen nitelikli ve üretken ağaçlardan çok sayıda embriyo üretmeye olanak tanıyan etkili bir yoldur. Geçici daldırma sistemi (TIS), sıvı kültürün avantajlarını birleştiren ve sıvı kültür ile ilişkili problemlerden kaçınan,

yarı-katı veya sıvı kültüre alternatif bir sistemdir. Araştırmacılar, *Q. suber*'in embriyogenik kültürlerinin TIS ile çoğaltma verimliliğini etkileyen parametreleri değerlendirmişlerdir. Her 6 veya 4 saatte 1 dk daldırma frekansı ile taze ağırlık, her 12 saatte 1 dk daldırma frekansına göre 3.7 kat, yarı-katı ortamdaki kültürlere kıyasla da 7.5 kat artmıştır. Embriyogenik kültürlerin hücresel durumu daldırma frekansından etkilenmiştir; her 4 saatte 1 dk daldırma, tek ve tam gelişmiş kotiledon embriyoların oluşumunu teşvik ederken her 6 saatte 1 dk daldırma, proliferatif gelişim evrelerinin (embriyogenik kallus ve embriyo kümeleri) kitlesel çoğaltımı için en iyi bulunmuştur (Pérez vd., 2013).

García-Ramírez ve arkadaşları (2014), serada yetiştirilen *Bambusa vulgaris*'in aksillar tomurcuklarını, %2 sukrozlu ve 12.0 µM 6-benziladenin (BA) ilave edilmiş sıvı MS besin ortamında kültüre almışlardır. Birçok alt kültürlerden sonra eksplantlar, 0 (sitokin içeremeyen ortam), 6.0, 12.0, 18.0 µM BA ilave edilmiş sıvı MS ortamının kullanıldığı geçici daldırma sistemine aktarılmışlardır. Sistem, eksplantların her 6 saatte 1 dk daldırılmasına programlanmıştır. Morfolojik ve anatomik göstergeler ölçülmüştür. BA, *Bambusa vulgaris*'in *in vitro* çoğaltılmasında etkili bulunmuştur. En iyi sonuçlar, 6.0 µM BA konsantrasyonu ile TIS'de elde edilmiş olup, hiperhidrik sürgünlerin bulunmaması sürgün sayısını (5.1 sürgün/eksplant) artırmıştır. Sonuçlar, sürgünlerdeki su içeriğinin 12.0, 18.0 µM BA ilavesi ile arttığını göstermiştir. Dahası bu yüksek BA seviyeleri, lignin içeriğinin ve fenolik bileşiklerin daha düşük olarak birikimine sebep olmuştur. Toplam klorofil 6.0 µM BA kullanıldığında belirgin olarak artmış, fakat diğer uygulamalar ile her iki parametre de azalmıştır. Bu sonuçlar, *in vitro* çoğaltım boyunca sürgün/eksplant sayısını artırmak için kullanılabilir. Ayrıca bu tür için, *in vitro* kültür koşullarını optimize etmeye, *in vitro* çoğaltım yöntemlerini iyileştirmeye katkı sağlayacaktır (García-Ramírez vd., 2014).

Welander ve arkadaşları (2014) çalışmalarında, *Digitalis lutea* × *purpurea*, *Echinacea purpurea* ve *Rubus idaeus*'un mikroçoğaltımı için, geçici daldırma sistemi prensibine dayalı yeni bir kültür kabı Plantform biyoreaktörünün değerlendirmesini yapmışlardır. Biyoreaktördeki çoğalma oranı ve sürgün kalitesi agarlı ortamdakine benzer ya da daha iyi olmuştur. *Digitalis* ve *Rubus* için sürgün sayısı her iki sistemde de benzer bulunmuş, *Echinacea* ise biyoreaktörde daha kaliteli

ve önemli ölçüde daha yüksek sayıda sürgün vermiştir. *Digitalis* ve *Echinacea* için biyoreaktörlerde daha yüksek yaş ağırlık, *Rubus* için ise agarlı ortamda daha yüksek yaş ağırlık elde edilmiştir. Bununla birlikte, her üç tür için ölçülen kuru ağırlık, her iki sistemde de benzer bulunmuştur. Platform biyoreaktörün bitki mikroçoğaltımı için uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Welander vd., 2014).

Alvarenga-Venutolo ve Salazar-Aguilar (2015), doğal bir tatlandırıcı olan *Stevia rebaudiana* bitkisinin geçici daldırma sistemi ile kütle mikroçoğaltımını araştırmışlardır. *Stevia*'nın özelliği yapraklarında bulunan diterpenoit glikositlerden gelmektedir. *S. rebaudiana*'nın tohum çimlenme yüzdesi çok düşüktür ve üretilen bitkiler heterojen olduğundan, tarlada kütle çoğaltımı için uygun değildir. Bu araştırmada, otomatik geçici daldırma sistemi (RITA®) ve ikiz şişeler sistemi (BIT) ile yarı-katı kültür sistemi karşılaştırıldığında, *Stevia rebaudiana*'nın seri üretiminin artırılması için geçici daldırma cihazlarının kullanıldığı üretim prosesinin verimli olduğu saptanmıştır. Geçici daldırma sistemlerini (RITA® ve BIT) içeren uygulamaların çoğunda, düşük hiperhidrisite görülmüş, yeşil ve güçlü bitkiler üretilmiştir. Rejenere sürgünlerin en yüksek ortalaması RITA® sisteminde, her 8 saatte bir 10 dk daldırma ile elde edilmiştir. Aynı zamanda BIT ile her 12 saatte bir 10 dk daldırmada, yaş ve kuru ağırlık kütlesi ile boy artışı olan güçlü bitkiler üretilmiştir. Bu ticari bitkinin üretiminde geçici daldırma biyoreaktörlerin (RITA® ve BIT) kullanılması birçok avantaj sunmaktadır (Alvarenga-Venutolo ve Salazar-Aguilar, 2015).

Gutiérrez ve arkadaşları (2016), yaygın şekilde dev bambu olarak bilinen *Guadua angustifolia* için daha önceden rapor edilmiş ve düşük çoğalma ile sonuçlanmış olan yarı-katı ortam ile elde edilen çoğalma sonuçlarını, geçici daldırma sistemi olan RITA® kullanıldığında elde edilen çoğalma sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Sitokinin olarak 3.0 mgL⁻¹ BAP ilaveli MS besin ortamı içeren yarı-katı ortam kültürleri ve RITA®'larda sıvı kültürler kullanılmıştır. Ekipman olarak, her biri 200 ml kültür ortamı içeren 20 RITA® biyoreaktörü bulunmaktadır. Daldırmalar, 2 dk süreyle uygulanmak üzere iki farklı frekans aralığında (6 saat ve 8 saat) gerçekleştirilmiştir. *G. angustifolia*'nın 1, 2 veya 3 saplı büyük kümeleri uygulamalara bağlı olarak kültüre alınmıştır. En iyi sonuçlar, günde 4 defa daldırma (her 6 saatte bir) döngüsü ile orijinal eksplant başına (aksillar tomurcuklar) 2.7

sürgün çoğalma indeksi olarak elde edilmiş ve daha büyük rizomlar gelişmiştir. Genel olarak geçici daldırma sisteminde, sürgün çoğalma oranı ve rizom büyümesi açısından yarı-katı ortam koşullarından çok daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Gutiérrez ve arkadaşları (2016), *G. angustifolia*'nın ticari üretiminde kullanılmak üzere RITA® için uygulamaların geliştirilmesi ve daha ileri çalışmaların yapılmasını önermişlerdir (Gutiérrez vd., 2016).

Ramírez-Mosqueda ve Iglesias-Andreu (2016), gıda ve kozmetik endüstrisinde değerli bir kimyasal olan ve ekonomik öneme sahip vanilin (bitkinin kabuklarından elde edilir) elde etmek üzere vanilya bitkisi ile çalışmışlardır. Bu bitkinin geleneksel çoğaltımı, tohumların düşük canlılığı ve çok düşük çimlenme oranı ile sınırlı olmaktadır. *In vitro* mikroçoğaltım tekniklerinde kullanılan geçici daldırma sistemleri (TIS), alternatif bir çoğaltım mekanizmasını temsil etmektedir. Bu bakımdan araştırmacılar *Vanilla planifolia*'nın mikroçoğaltımının iki evresinde (çoğalma ve köklenme) üç farklı biyoreaktör sistemini karşılaştırmışlardır. Geçici daldırma biyoreaktörü (BIT®), yerçekimi daldırma biyoreaktörü (BIG) ve otomatik geçici daldırma biyoreaktörü (RITA®) değerlendirilmiştir. Çoğalma aşamasında sürgün sayısı en fazla BIT® (18.06 sürgün/eksplant) sisteminde, ardından RITA® (12.77 sürgün/eksplant) ve BIG (6.83 sürgün/eksplant) sistemlerinde olmuştur. Köklenme aşamasında, BIG ve RITA® sistemleri ile karşılaştırılan BIT® sisteminde daha fazla sayıda uzun kök elde edilmiştir. Bununla birlikte en yüksek klorofil içeriği BIG sisteminde bulunmuş, bunu RITA® ve BIT® sistemleri izlemiştir. BIT® sisteminde *in vitro* olarak çoğaltılan fidelerde %100 canlılık gözlenmiş, RITA® ve BIG sistemlerinde çoğaltılan fideler bu oranın gerisinde kalmıştır. Çalışmada elde edilen bulgular genel olarak, *V. planifolia* türünün ticari mikroçoğaltımının optimizasyonunda BIT® sisteminin üstünlüğünü onaylamıştır. Dahası bu sistem, RITA® sistemlerinin kullanımıyla ilişkili maliyetleri de düşürmektedir (Ramírez-Mosqueda ve Iglesias-Andreu, 2016).

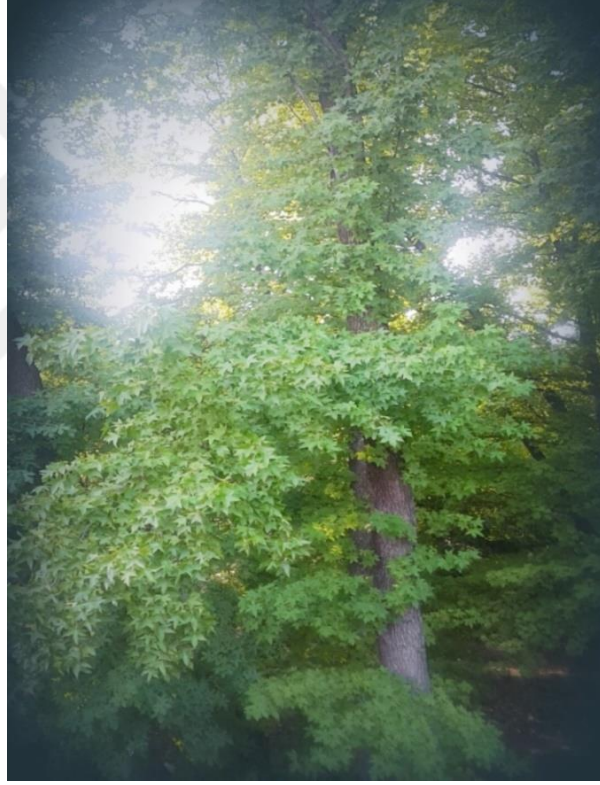
Ekonomik değeri yüksek olan bir orkide türü *Vanda tricolor* (*Vanda suavis*) ile çalışan Esyanti ve arkadaşları (2016), tüketici talebinin karşılanması amacıyla ince tabaka sıvı ortam ve geçici daldırma sistemi (TIS) biyoreaktörü ile mikroçoğaltım olanaklarını araştırmışlardır. Bu çalışmada, *V. tricolor*' un sürgün kültürü, hindistan cevizi suyunun eklendiği tam MS ortamında iki farklı sistemde (ince tabaka ve TIS

biyoreaktörü) yetiştirilmiştir. TIS biyoreaktöründe her 12 saatte 5 ve 10 dk'lık daldırma periyoduna ait iki farklı varyasyon belirlenmiştir. 21 gün sonra, hangi sistemin ve parametrenin verimli olduğunu belirlemek için her iki sistemde de biyokütle üretimi, görsel-canlılık analizi ve ortam kullanımı (iletkenlik ve şeker tüketimi), analiz edilmiştir. Sonuçlar, TIS biyoreaktöründe sürgünlerin ince tabaka sistemindekinden görsel olarak daha iyi ve daha canlı (yaşayabilir) olduğunu göstermiştir. İnce tabaka sistemi 4.854 g ile en yüksek şeker kullanımı ve 7.52 mS değeriyle en yüksek iletkenlik azalmasına sahip bulunmuştur. En büyük kütle üretimi, 0.056/gün büyüme oranı ile ince tabaka sisteminde gerçekleşmiştir. Bu çalışmada, görsel ve canlılık analizi, biyokütle üretimi ve ortam kullanımına dayanılarak, TIS biyoreaktörünün *V. tricolor*'un sürgün üretiminde daha verimli olduğu sonucuna varılmıştır (Esyanti vd., 2016).

2.MATERYAL VE METOT

2.1.Bitki Materyali

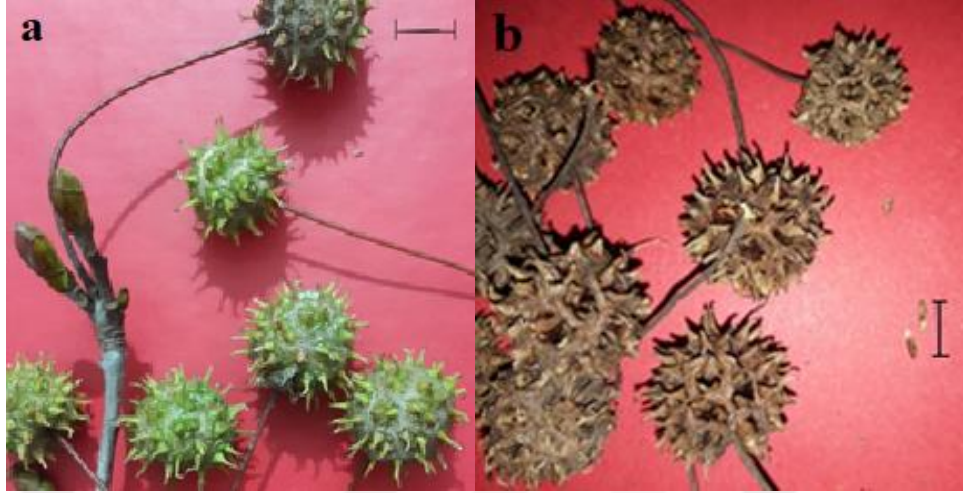
Liquidambar orientalis Miller (Anadolu sığlası) 30-35 metreye kadar boylanabilen, yaprak dökken ve monoik bir ağaçtır. Mart ayından Kasım ayına kadar çiçeklenir, meyve Kasım ayından Aralık ayına kadar olgunlaşır ve tohumlar rüzgar ile dağılır. Ağaç her yıl meyve üretir ancak verimli ağaçlar üç yılda bir daha üretkendir (Prada ve Arizpe, 2008) (Şekil 2.1.).



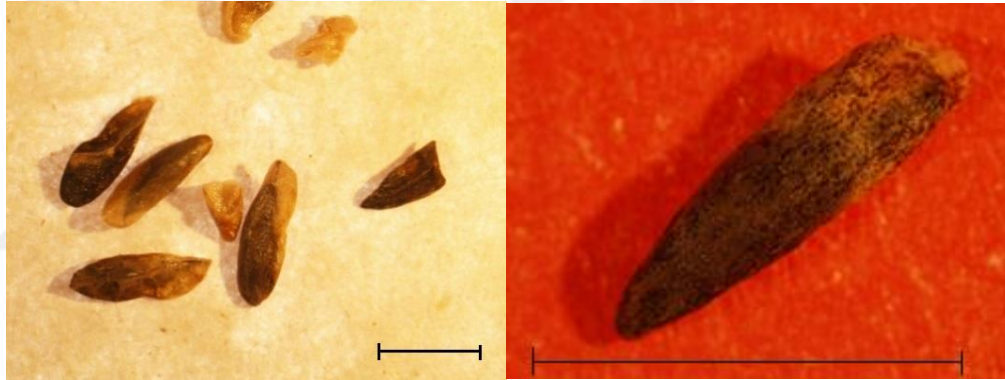
Şekil 2.1. Sığla (*L. orientalis*) ağacının görünümü (Köyceğiz Sığla Ormanı, 11 Ağustos 2017).

Çalışmamızda *L. orientalis* ağaçlarından kozalaklar 2015 yılı Kasım-Aralık aylarında toplanmış, oda sıcaklığında 15 gün kurutulduktan sonra (Şekil 2.2.) silkelenerek tohumların dökülmesi sağlanmış (Şekil 2.3.) ve tohumlar galvaniz sac kutularda 4 °C’de muhafaza edilmiştir (Muğla Orman Müdürlüğü).

Kullanılan tohumların bin dane ağırlığı 2.526 ± 0.05 g olarak bulunmuştur (Baran-Ayaz vd., 2015).



Şekil 2.2. Yeni toplanmış (a) ve kurutulmuş sığla kozalakları (b) (ölçü çizgisi = 1 cm).



Şekil 2.3. Sığla ağacı tohumlarının stereo mikroskop görüntüsü (ölçü çizgisi = 5 mm).

2.2. *In Vitro* Kültür Çalışmaları için Kullanılan Besin Ortamları ve Kültürler

Steril fidelerin elde edilmesinde yarı-katı $\frac{1}{2}$ Murashige-Skoog (MS) (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı, sürgün ucu kültürlerinde benzil amino purin (BAP: 6-Benzylaminopurine) ve naftalen asetik asit (NAA: α -naphthalenaceticacid) ilaveli yarı-katı (semi-solid) MS ve Woody Plant Medium (WPM) besin ortamları (Lloyd ve McCown, 1980), geçici daldırma sistemindeki kültürlerde ise sıvı WPM besin ortamı kullanılmıştır. MS ve WPM besin ortamları makro ve mikro element içerikleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. MS ve WPM besin ortamlarına ait bileşenler [SigmaBioSciencesCatalog, (1996)].

İNORGANİK MADDELER	MS Ortamı (mg/L)	WPM Ortamı (mg/L)
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	556.00
KNO ₃	1900.00	-
NH ₄ NO ₃	1650.00	400.00
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.25
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00	370.00
K ₂ SO ₄	-	990.00
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	8.60
H ₃ BO ₃	6.20	6.20
KH ₂ PO ₄	170.00	170.00
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
CaCl ₂ .2H ₂ O	439.59	96.00
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	-
KI	0.83	-
FeNaEDTA	36.70	36.70
VİTAMİNLER		
Myo-inositol	100.00	100.00
Nicotinic acid	0.50	0.50
Pyridoxine.HCl	0.50	0.50
Thiamine.HCl	0.10	1.00
Glycine	2.00	2.00

2.2.1.Sürgün ucu kültürü

Sürgün ucu kültürü deneyleri için steril fideleri elde etmek üzere öncelikle tohumların sterilizasyonu yapılmış ve yarı-katı ½ MS besin ortamında kültüre alınmıştır.

2.2.1.1. Yarı-katı MS besin ortamının hazırlanması

Steril fidelerin elde edilmesi için tohumlar ½ MS ortamında kültüre alınmıştır. Bunun için çizelge 2.1’de belirtilmiş olunan MS ortamı bileşimine göre yarı-güçlü (1/2) olacak şekilde 1 litre (L) ortam için gerekli miktarlar alınmıştır. Ayrıca 20 g/L sukroz ve 7 g/L agar eklenmiştir. Agar eklenmeden önce ortamların pH’ı 5.8 olacak şekilde ayarlanmıştır (0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl kullanılarak). Agar ilave edildikten sonra besin ortamları su banyosuna konulmuş yaklaşık 1 saat karıştırarak pişmesi sağlanmıştır. Hazır olan besin ortamları 30’ar ml olacak şekilde durham şişelerine konulmuş ve sonrasında otoklavda, 121 °C’de 1 atm basınçta 20 dk sterilize edilmiştir.

2.2.1.2. Tohumların yüzeysel sterilizasyonu ve steril fidelerin elde edilmesi

Çalışmamızda kullanılan tohumlar 2015’te Fethiye Muğla Orman Müdürlüğü *Liquidambar orientalis* tohum fidanlığından (tohumlar 2012 yılına aittir) temin edilmiştir.

Tohumları sterilizasyonu Baran-Ayaz vd. 2015’e göre yapılmıştır.

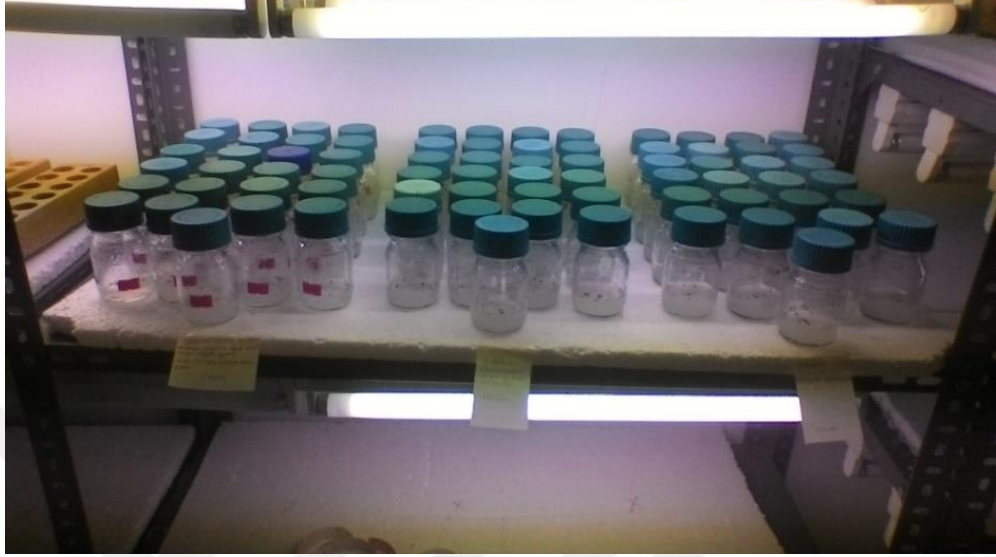
- Tohumlar öncelikle %70’lik etil alkolde 1 dk bekletilmiştir,
- Ardından H₂O₂ (%30-31) ile 15 dk muamele edilmiş,
- Son olarak steril distile su ile 3 kez yıkanmıştır.

Tohumlar Ocak 2015’te kültüre alınmıştır. Kültürler için, 30’ar ml ½ MS ortamı içeren 80 adet durham şişesine 3’er adet sığla tohumu ekilmiştir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. ½ MS besin ortamında kültüre alınan sığla tohumları.

Kültür ler 22 ± 2 °C’de 16/8 saat (aydınlık/karanlık) fotoperiyodik koşullarda, soğuk beyaz flüoresanlar ile 2000-2200 lux aydınlatmada inkübe edilmiştir (Şekil 2.5.). İki günde bir periyodik olarak yapılan gözlemler ile tohumların çimlenmesi ve enfeksiyon durumu belirlenmiş, ayrıca fidelerin gelişimi gözlenmiştir.



Şekil 2.5. Kültüre alınan tohumların kültür odasından bir görünümü.

2.2.1.3. Sürgün uçlarının kültüre alınması

Yarı-katı $\frac{1}{2}$ MS besin ortamında sığla tohumlarının kültüre alınması ile elde edilen steril sığla fidelerinin sürgün ucu kültürleri için yarı-katı MS ve WPM besin ortamları kullanılmıştır. Besin ortamları 2.2.1.1. başlığı altında belirtildiği gibi hazırlanmış ve kültür kabı olarak 2.5x15 cm’lik deney tüpleri kullanılmıştır. Her bir deney tüpüne 25 ml besin ortamı konulmuştur.

MS ve WPM besin ortamlarının her birine 0.2 mg/L BAP ile 0.05 mg/L NAA ilave edilmiş ayrıca, kontrol olarak da ortamlar bitki büyüme düzenleyici (BBD) ilavesiz olarak hazırlanmıştır. 8 haftalık steril fidelerin (Şekil 2.6.) sürgün uçları (8-10 mm) BBD içeren ve içermeyen besin ortamlarında kültüre alınmış, sürgünlerin gelişimi, yaprak rengi, sürgün uzunluğu ve kök oluşumları değerlendirilmiştir.

Steril sığla fidelerinden alınan sürgün uçları, 8-10 mm uzunlukta Şekil 2.6.’da işaretlendiği şekilde kesilmiş ve yukarıda belirtilen besin ortamlarında kültüre alınmıştır (Şekil 2.7.).



Şekil 2.6. 8 haftalık steril sığla fideleri (ölçü çizgisi 8-10 mm)



Şekil 2.7. Kültüre alınan sürgün uçları (1. gün)

2.2.2.Geçici daldırma sistemi ile RITA® biyoreaktörlerinde sürgün ucu kültürü

2.2.2.1.RITA® biyoreaktörlerine aktarılacak sürgün uçları için steril fide elde edilmesi

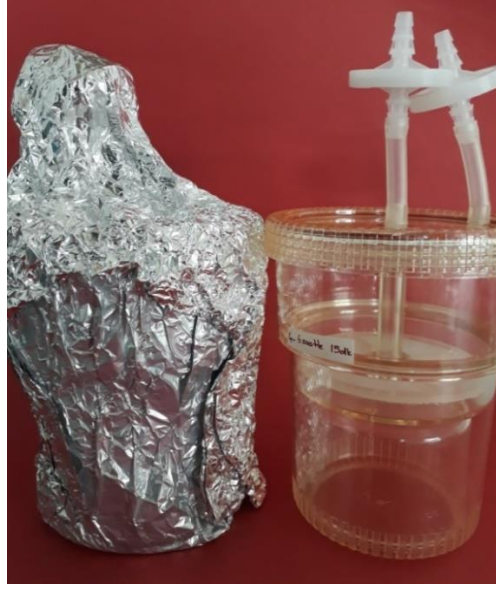
Sürgün ucu kültürü çalışması için öncelikle steril fidelerin elde edilmesi gereklidir. *L. orientalis* tohumları 2015 Kasım-Aralık aylarında Köyceğiz-Marmaris yöresi sığla ormanlarından toplanmıştır. Yarı-katı MS besin ortamında kültüre alınan sığla tohumlarından gelişen 8 haftalık fidelerin sürgün uçları (8-10 mm) RITA® biyoreaktörlerinde eksplant olarak kullanılmıştır.

2.2.2.2.Sıvı WPM besin ortamının hazırlanması

Geçici daldırma sisteminde sürgün ucu kültürleri için sıvı WPM besin ortamı kullanılmış ve çizelge 2.1.'de 1 L ortam için belirtilen miktarlar bir erlene konulmuş ve ortama 30 g/L sukroz ilave edildikten sonra, distile su ile bir litreye tamamlanmıştır. Ortamların pH'ı 5.8 olarak ayarlanmıştır (0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl kullanılarak). Besin ortamlarının bulunduğu erlenler alüminyum folyo ile sarılarak otoklav sepetlerine yerleştirilmiş ve otoklavda 121°C'de, 1 atm basınçta 20 dk sterilize edilmiştir.

2.2.2.3.RITA® biyoreaktörlerinin sterilizasyonu

Öncelikle RITA® biyoreaktörleri parçalarına ayrılarak tüm parçalar (hassas mikrofiltreler dışında) steril distile su ile yıkanmış ve kurulanmıştır. RITA® kaplarında bulunan hassas mikrofiltreler su ile temas ettirilmeden RITA® kaplarına takılmıştır. Filtrelerin otoklavdaki nemden etkilenmemesi amacıyla içi kurutulmuş olan RITA®'lar alüminyum folyo ile sarılarak (Şekil 2.8.) otoklavda 121°C'de, 1 atm basınç altında 20 dk sterilize edilmiştir. RITA® sistemi şekil 2.9.'da görüldüğü gibidir.



Şekil 2.8. RITA® biyoreaktörlerinin sterilizasyonu



Şekil 2.9. RITA® sistemi.

2.2.2.4. Sürgün ucu eksplantlarının RITA® sisteminde kültüre alınması

Hazırlanan ve otoklavda sterilize edilmiş olan sıvı WPM besin ortamı steril koşullarda (güvenlik kabini içinde) RITA® kaplarına aktarılmıştır. Her bir kaba 300

ml besin ortamı konulmuştur. Daha sonra yarı-katı ½ MS besin ortamında steril olarak gelişen 8 haftalık fidelerin sürgün uçları (yaklaşık 8-10mm'lik eksplantlar) sıvı WPM besin ortamının bulunduğu RITA® kabının üst kültür bölmesine, 10'ar adet olacak şekilde bırakılmıştır (Şekil 2.10.). Bu şekilde kültüre alınan eksplantları içeren RITA® sistemi 27.5 µE/m²/s ışık altında fotoperiyodik koşulda (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) 22±2°C sıcaklıkta olan kültür odasına yerleştirilmiştir.

Geçici daldırma sistemi ile RITA® kaplarında kültüre alınan sürgün ucu eksplantlarının gelişimi, 6 saatte 15 dk ile 8 saatte 15 dk daldırma süre ve sıklıklarına göre test edilmiştir.

8 hafta sonra kültür kapları boşaltılmış, sürgün gelişimi görülen eksplant sayısı, gelişen sürgünün boyu ve bir RITA® kabında gelişen sürgünlerin toplam ağırlığı (taze ağırlık) belirlenerek veriler istatistiki olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 2.10. RITA® biyoreaktörünün üst bölümünde kültüre alınan eksplantların görünümü.

2.3.İstatistiki Analiz

Sürgün boyu, canlı sürgün ucu sayısı ve yaş ağırlık üzerine 6 saatte 15 dk veya 8 saatte 15 dk daldırma periyotlarına göre bağımsız gruplar t-testi ($p > 0.05$) kullanılarak istatistiki olarak analiz yapılmıştır.

3.BULGULAR

3.1.Sürgün Ucu Kültürü

3.1.1.Steril fidelerin elde edilmesi

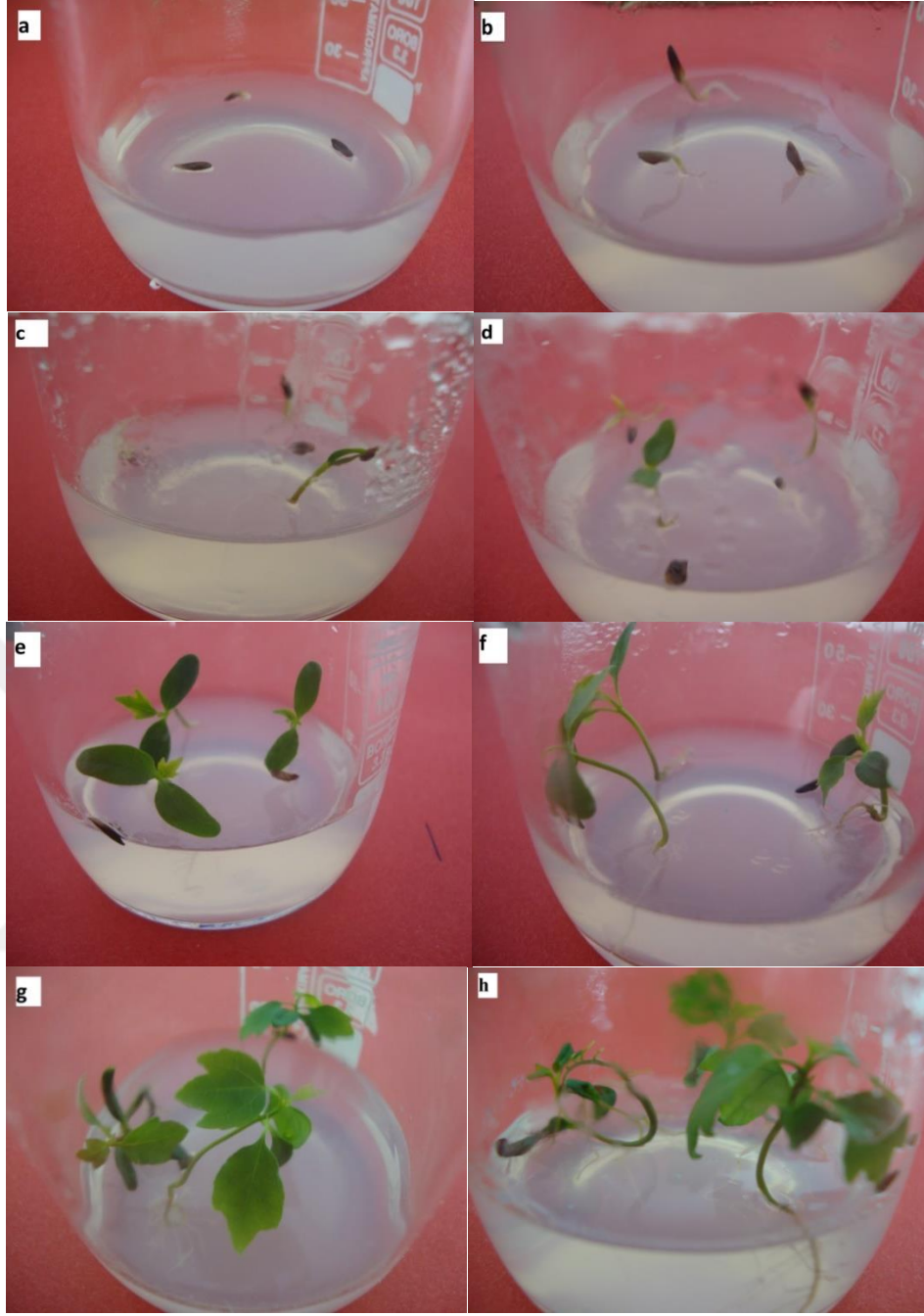
Sürgün ucu kültürü çalışmasında steril fide elde edilmesi amacıyla 80 adet durham şişesinin her birine 3'er adet olmak üzere 240 tohum ekilmiştir. Yüzeysel sterilizasyonu yapıp kültüre alınan tohumların iki günde bir periyodik olarak gözlemleri yapılmış (Şekil 3.1.), çimlenme 4. günde başlamış ve 20. günde tamamlanmıştır. Kültüre alınan sığla tohumlarında çimlenme yüzdesi %71.25, enfeksiyon yüzdesi ise %12.5 olarak bulunmuştur.

3.1.2.Sürgün uçlarının gelişimleri

Sürgün uçlarının kültüre alındığı iki besin ortamına (MS ve WPM) bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) olarak 0.2 mg/L BAP ve 0.05 mg/L NAA eklenmiştir. Kültüre alınan sürgün uçlarının BBD içeren ve içermeyen MS ve WPM besin ortamlarında canlı kalan ve gelişim gösterenlerin yüzdeleri çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

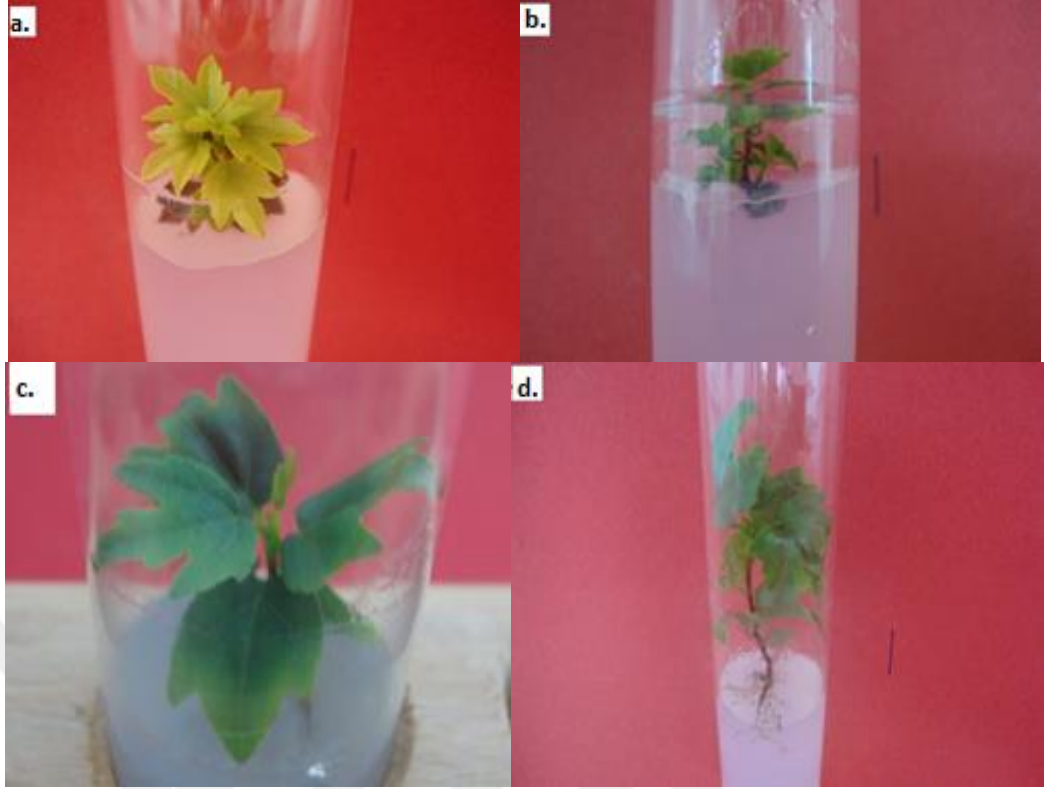
Çizelge 3.1. MS ve WPM besin ortamlarında kültüre alınan sürgün uçlarının gelişme durumu.

Besin ortamı ve BBD	Kültüre alınan eksplant sayısı	Kontamine olan eksplant sayısı	Canlı eksplantlar (%)
MS	106	17	83,96
WPM	50	8	84
MS+BBD	50	8	84
WPM+BBD	49	4	91.83



Şekil 3.1. Kültüre alınan siğla tohumlarının çimlenme başlangıç ve gelişimleri; a/3. gün, b/6. gün, c/9. gün, d/10. gün, e/14. gün, f/20. gün, g/28. gün, h/30. gün.

Şekil 3.2.'de farklı besin kombinasyonlarında gelişen sürgün uçlarına ait birer örnek gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Sürgün uçlarının MS ve WPM besin ortamlarında gelişimleri (62. gün) (ölçü çizgisi=1 cm) a. BBD ilaveli MS, b. BBD ilaveli WPM, c. BBD ilavesiz MS ve d. BBD ilavesiz WPM yarı-katı besin ortamı.

0.2 mg/L BAP ve 0.05 mg/L NAA ilave edilmiş MS besin ortamına aktarılan ve gelişme görülen sürgün uçlarında gelişen yaprakların renginin genellikle açık yeşil olduğu görülmüş olup (3.2.a.), erken solmalar meydana gelmiştir. Sürgün uçlarında kök oluşumu neredeyse hiç görülmemiştir.

0.2 mg/L BAP ve 0.05 mg/L NAA ilave edilmiş WPM besin ortamına aktarılan sürgün uçlarının yaprakları koyu yeşil renkte, sürgün uzunluğunda artışlar olmuş fakat sürgünlerin köklenmesi çok az olmuştur (Şekil 3.2.b.).

BBD ilavesiz MS besin ortamında kültüre alınan ve gelişen sürgün uçlarında yaprak sayısı yüksek ancak, boğum araları kısa olduğundan sürgün boyu uzun olmamıştır (Şekil 3.2.c.).Gelişen sürgün uçlarında çok geç köklenme görülmüştür (yaklaşık 4 ay) bazılarında ise kök oluşumu görülmemiştir.

BBD ilavesiz WPM besin ortamında kültüre alınan ve gelişen sürgün uçlarında yaprak renginin genellikle koyu yeşil olduğu (Şekil 3.2.d.), sürgün gelişiminin

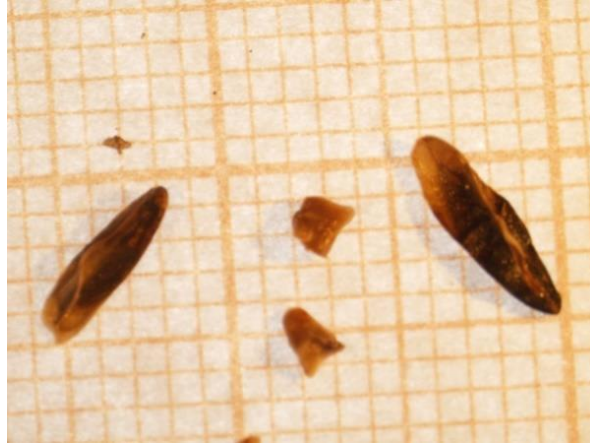
(yaprak sayısı ve sürgün uzunluğu bakımından) diğer ortamdakilere kıyasla daha kısa zamanda (2 ay sonra) daha iyi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca gelişen sürgün uçlarının kök yapısı güçlü ve uzun bulunmuştur.

BBD ilavesiz WPM besin ortamında sürgün uçlarında iyi bir gelişmenin gözlenmesi ile öncelikle RITA® biyoreaktörlerinde (geçici daldırma sistemi) sürgün ucu kültürü için bitki büyüme düzenleyici ilavesiz WPM besin ortamının kullanılmasına ve kültürün başarısında en önemli faktör olarak belirtilen eksplantların besin ortamına daldırma periyodunun belirlenmesi için 6 saat ve 8 saatte bir daldırmanın araştırılmasına karar verilmiştir.

3.2. RITA® Biyoreaktörlerinde Sürgün Ucu Kültürü

3.2.1.RITA® biyoreaktörlerine aktarılacak sürgün uçları için steril fide elde edilmesi

RITA® biyoreaktörleri ile yapılacak olan çalışma için Köyceğiz-Marmaris yöresi *L. orientalis* ormanından toplanan tohumlar (Şekil 3.3.) öncelikle yarı-katı ½ MS besin ortamında kültüre alınmıştır.



Şekil 3.3. Sığla tohumlarının irilikleri.

Tohumların çimlenmesi 7. günde başlamış olup 18. günde tamamlanmıştır. Tohumlarda çimlenme başarısı %90 olarak bulunmuştur.

3.2.2.Geçici daldırma sistemi ile RITA® biyoreaktörlerinde sürgün ucu kültürü

RITA® biyoreaktörleri ile mikroçoğaltımda önemli parametreler olarak eksplantların besin ortamına daldırma sıklığı ve daldırma süresinin olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda öncelikle 15 dk'lık daldırma süresinin 6 ve 8 saatte bir periyodik olarak uygulanması araştırılmıştır. Buna göre gelişme gösteren sürgün ucu yüzdesi, gelişen sürgünlerin boyu ve ortalama bitki yaş ağırlığı çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Daldırma periyoduna göre gelişen sürgün ucu yüzdesi, sürgün boyu ve RITA® kabı başına bitki yaş ağırlıkları.

Daldırma periyodu	Gelişme gösteren sürgün ucu (%)	Sürgün boyu (ortalama) (cm/bitki)	Yaş ağırlık (ortalama) (g/bitki)
6 saatte 15 dk	80.00 ± 15.27	2.87 ± 0.42	0.24 ± 0.23
8 saatte 15 dk	56.67 ± 6.66	2.37 ± 0.53	0.26 ± 0.98

± standart hata değeridir.

Bağımsız gruplar t-testine göre ($p > 0.05$) gelişme gösteren sürgün ucu yüzdesi, sürgün boyu ve yaş ağırlık üzerine 6 saatte 15 dk veya 8 saatte 15 dk daldırma periyotlarının istatistiki olarak önemli bir etkisi görülmemiştir. Ancak, 6 saatte 15 dk geçici daldırmaya tabi olan sürgün uçlarında uzama daha fazla olmuş ve köklenme ve/veya kök gelişimlerinin, 8 saatte 15 dk uygulamasına göre daha uzun ve daha güçlü olduğu görülmüştür (Şekil 3.4.). Çalışmamızda kültür süresinin uzaması ile bazı sürgünlerin ilk gelişen yapraklarının 7. haftanın sonuna doğru kararmaya başladığı da gözlenmiştir.

RITA® biyoreaktörleri ile sürgün ucu kültüründe 8 saatte 15 dk daldırılan sürgün uçlarından gelişen bitkilerin kök gelişimleri 6 saatte 15 dk olarak daldırılanların kök gelişimlerine göre daha zayıf bulunmuştur. Bazı sürgünlerin uzunluğu iyi olmasına karşın hiç köklenmediği gözlenmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.4. RITA® biyoreaktörlerinde 6 saatte bir 15 dk daldırılan sürgün ucu eksplantlarının gelişimi (8 haftalık) (ölçü çizgisi = 1cm).



Şekil 3.5. RITA® biyorektörlerinde 8 saatte bir 15 dk daldırılan sürgün ucu eksplantlarının gelişimi (8 haftalık) (ölçü çizgisi = 1cm).

4.TARTIŞMA VE SONUÇLAR

4.1.Liquidambar orientalis Tohumlarının Çimlenme Durumu

Efe (1987) tarafından *L. orientalis* tohumlarının laboratuvar koşullarında 1 hafta, arazi koşullarında ise 15 günde çimlendiği belirtilmektedir. Öztürk ve arkadaşları (2008) Muğla, Aydın, Denizli, Isparta, Antalya ve Burdur'dan toplanan taze tohumları petri kaplarında ve serada toprakta çimlendirmişlerdir. Laboratuvar koşullarında 15-25°C'de 7 günde çimlenen tohumlar, serada saksıda 15°C'de normal gün ışığı koşullarında 2-3 haftada çimlenmişlerdir. Çalışmada, laboratuvar ve sera koşullarında çimlenme %60-80 arasında bulunmuştur. Farklı çalışmalarda farklı çimlenme yüzdeleri belirtilmiştir. Atay (1985) tohum çimlenmesini %40-75, Efe (1987) %68.58, Baran-Ayaz vd. (2015) %91.66 olarak belirtmiştir. Bu çalışmada ½ MS besin ortamında tohumların çimlenmesi başarıyla gerçekleşmiş ve kültüre alınan tohumlarda çimlenme 4. günde başlamış, 20. günde tamamlanmıştır. Kültürde 4 hafta (28 gün) sonra %71.25 çimlenme görülmüştür. RITA® biyoreaktörlerine aktarılacak sürgün uçları içinsteril fidelerin elde edilmesinde ise tohumlar kültüre alınmış olup çimlenme 7. günde başlamış, 18. günde tamamlanmıştır. Kültürde çimlenme başarısı 8 hafta sonunda %90 bulunmuştur. Çalışmamızda, tohumların ilk kültüre alınmasındaki çimlenme yüzdesinin aynı şekilde ikinci defa kültüre alınmasındaki çimlenme yüzdesine göre düşük bulunmasının sebebi ilkinde kullanılan tohumların 3 yıl bekletilmiş olması düşünülebilir. Çünkü bu tohumlar 2012 yılında Fethiye *L. orientalis* fidanlığından toplanmış olup, *in vitro* kültür çalışmamız Ocak 2015'te yapılmıştır.

L. orientalis' in 14 ile 365 günde çimlenebileceği, iyi koşullar altında dahi çimlenmede düzensizlik görülebileceği belirtilmekle beraber (<http://b-and-t-world-seeds.com/>) çalışmamızda bir düzensizlik görülmemiştir.

4.2.Liquidambar orientalis (Anadolu Sığlası)'in In Vitro Çoğaltımı

Anadolu sığlasının *in vitro* çoğaltımıyla ilgili bilinen ilk çalışma 1999 yılında Genç tarafından yapılmıştır. Genç (1999) yaptığı çalışmada sürgün, kök ve kallus elde etmek amacıyla, 6 yaş grubuna ait ağaçlardan aldığı sürgün ucu, meristem ve tomurcukları eksplant olarak kullanmıştır. Test edilen besin ortamlarından 1 ppm BAP ve 1 ppm kinetin içeren Blaydes besin ortamının (BL) sığla için en uygun olduğu, genç fidanlardan (2-6 yaş arası) alınan sürgün ve tomurcukların yaşlı ağaçlardan alınanlara göre daha uzun ve fazla sayıda sürgün meydana getirdiğini, sıvı besin ortamı kullanıldığında sürgün oluşum yüzdesinin yarı-katı besin ortamına göre azaldığını belirtmiştir. Kullanılan genç materyallerde sürgün ve kallus oluşumu %90'ın üzerinde bulunmuş, bütün olarak elde edilen bitkicik oranı %11 olmuştur. Köklenme ise BL ortamında elde edilen çoklu sürgünlerin, BL'in hormon içermeyen ortamına 0.5 cm uzunluğunda parçaların aktarılmasıyla sağlanmıştır. Ancak seraya transfer edilen sürgünler 1 ay yaşatılabilmıştır (Genç, 1999). Bu tez kapsamında yaptığımız besin ortamı belirleme çalışmalarında, yarı-katı MS ve WPM besin ortamları ve 0.2 mg/L BAP+0.05 mg/L NAA ilave edilmiş yarı-katı MS ve WPM besin ortamları sürgün ucukültürü için denenmiştir. Steril ortamda tohumlardan elde edilen fidelerden aldığımız sürgün uçlarının (8-10 mm) hormon ilavesiz WPM besin ortamında daha iyi geliştiği görülmüştür.

Erdağ ve Emek (2005), Anadolu sığlasının *in vitro* çoğaltımı ile ilgili yaptıkları çalışmada yaprak eksplantlarını kullanmışlardır. Sürgün çoğaltıcı kültürlerden alınan yaprak eksplantları, farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA ile desteklenmiş yarı-katı WPM besin ortamına yerleştirilmiştir. Sürgün organogenezi belirgin bir kallus aşaması olmadan, doğrudan meydana gelmiş ve 6-9 hafta arasında iyi tanımlanmış sürgünler görülmüştür. Eksplant başına en fazla sürgün (ortalama 20 sürgün) 9 hafta içerisinde, 0.54 µM NAA ve 11.1 µM BAP ile desteklenmiş WPM besin ortamında elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda 4 haftalık steril fidelerin sürgün ucu kültürlerinde de benzer şekilde yarı-katı WPM besin ortamında yarı-katı MS besin ortamına göre daha iyi sonuç alınmıştır. Gelişme gösteren sürgün ucu yüzdesi (8 hafta sonunda) en yüksek (%91.83) bitki büyüme düzenleyicisi (0.2 mg/L BAP ve

0.05 mg/L NAA) ilaveli WPM besin ortamında bulunmuştur. Sürgün ucu kültürlerinde en iyi yaprak gelişimi, köklenme ve sürgün boylanmasının BBD ilavesiz WPM besin ortamında olduğu görülmüştür. Ayrıca bitkiler, BBD ilavesiz WPM besin ortamında diğer besin ortamlarına göre daha hızlı gelişim göstermiştir.

Özmen (2011) çalışmasında, farklı büyüme düzenleyicileri (2.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA veya 0.1 mg/L TDZ + 0.01 mg/L 2.4-D) ilave edilmiş dört farklı besin ortamında [MS, SH (Schenk ve Hildebrandt), LO (Lindemann Orchid besin ortamı) ve WPM] iki haftalık sığıla bitkilerden elde ettiği hipokotil eksplantlarını kullanarak adventif sürgün oluşumunu araştırmıştır. Ayrıca eksplantın alındığı bitkinin yaşı (2, 3 ve 4 haftalık) karanlık uygulaması (kontrol, 1 ve 2 hafta karanlık) ve hipokotil eksplantının alındığı bitkideki konumunun sürgün oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmıştır. En iyi sürgün oluşumunu 2.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA destekli SH besin ortamından elde etmiştir. Eksplant yaşı ve karanlık uygulaması değişkenleri için en iyi sonuçların, 3 haftalık bitkilerden alınan eksplantlar (19.33 sürgün/eksplant) ile 2 hafta karanlık uygulaması yapılan eksplantlar (20.52 sürgün/eksplant) olduğunu belirtmiştir. Özmen (2011) çalışmasında sürgün oluşumu için eksplantın alındığı konumun istatistiki olarak önemli bir fark göstermediğini belirtmiştir.

Bayraktar ve arkadaşları (2015), *L. orientalis*'in aksillar tomurcuklarından izole ettikleri primordial sürgün eksplantlarını, farklı bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) içeren MS ve WPM besin ortamlarında kültüre almışlardır. Eksplant başına en fazla sürgün sayısı, 1.0 mg/L BAP ve 1.0 mg/L IBA (sürgün çoğaltma ortamı) ile desteklenmiş WPM besin ortamında elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında steril fidelerin sürgün ucu kültürlerinde de yarı-katı WPM ortamında yarı-katı MS ortamına göre daha iyi sonuç alınmıştır. Gelişme gösteren sürgün ucu yüzdesi en yüksek (%91.83) bitki büyüme düzenleyicisi (0.2 mg/L BAP ve 0.05 mg/L NAA) ilaveli WPM besin ortamında bulunmuştur.

4.3. Geçici Daldırma Sistemi ile RITA® Biyoreaktörlerinde Çoğaltma

Son yıllarda literatürlerdeki raporlar, RITA® gibi geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin yarı-katı kültürlerle kıyasla çok sayıda avantaja sahip olduğunu göstermiştir. Geçici daldırmada katı ve sıvı kültürlerin avantajları bir araya getirilmiştir. Geçici daldırma, birçok bitki türünde, sürgün çoğalmasının ve somatik embriyogenezin tüm aşamalarında olumlu etkilere sahiptir. Bitki büyümesi ve çoğalma oranları, genellikle yarı-katı ortam kültürlerine veya diğer biyoreaktörler ile yapılan kültürlerle göre geçici daldırmada daha iyi sonuç vermektedir. Çoğaltılan bitkicikler ve somatik embriyolar daha kalitelidir. Ayrıca bitki materyalinin geçici daldırmadan sonra dış ortama alıştırılmasında da daha iyi sonuçlar alınmıştır. (Escalona vd., 1999; Baran-Ayaz vd., 2017).

Geçici daldırma, katı kültür ortamının (azami gaz alışverişi) ve sıvı kültürlerin (besleyici madde alımının artması) avantajlarını bir araya getirmiştir. Eksplantların daldırma süreleri ve frekansları, muhtemelen bir mikroçoğaltım prosedürü geliştirmek için en kritik parametrelerdir (Etienne ve Berthouly, 2002). Bu parametrelerin optimizasyonu, morfogenezin kontrol edilmesi yoluyla aynı zamanda hiperhidrisitenin kontrolüyle daha yüksek biyolojik verim elde edilmesine olanak sağlayabilir. Kültür yoğunluğu da belirleyici bir faktör olmasına karşın bu faktörün henüz kapsamlı olarak incelendiği çalışmalar pek yoktur. Daldırma süreleri, her kültür aşamasında alt kültürlerin süresi ve bitki büyüme ortamının kimyasal bileşimi kadar kritik olabilmektedir (Etienne ve Berthouly, 2002; Baran-Ayaz vd., 2017).

Bu tez çalışmasında, *L. orientalis*'in sıvı WPM besin ortamı içeren RITA® biyoreaktörlerinde sürgün ucu kültürü yapılmıştır. Çalışmada, geçici daldırma sistemi için 15 dakika daldırma süresinin 6 saatte bir ve 8 saatte bir uygulanması araştırılmış, iki daldırma periyodu sürgün uzunluğu, bitki yaş ağırlığı ve canlı kalan sürgün ucu sayısı değişkenlerine göre karşılaştırılmıştır. 8 saatte 15 dk daldırma periyodunda gelişme gösteren sürgün ucu yüzdesi ve bitki yaş ağırlığı sonuçları 6 saatte bir daldırmaya göre daha düşük, bitki yaş ağırlığı ise yüksek bulunmuştur. Minimum sürgün boyu 1 cm, maksimum sürgün boyu 4.5 cm olarak elde edilmiştir.

6 saatte 15 dk daldırma periyodunda ise gelişme gösteren sürgün ucu yüzdesi ve sürgün boyu bakımından daha iyi sonuçlar elde edilmiş (istatistiki olarak önemli değil) ve bu daldırma periyodunda minimum bitki boyu 1.5 cm, maksimum bitki boyu 6 cm olmuştur.

Geçici daldırma sistemi ile odunsu bitkilerde yapılan çalışmalara bakıldığında, daldırma süre ve frekanslarının bitkilerin çoğaltım verimliliğini önemli derecede etkilediği görülmüştür. Perez ve arkadaşları *Q. suber*'in embriyogenik kültürlerinin TIS ile çoğaltımında daldırma süre ve frekanslarını değerlendirerek yarı-katı ortamda elde edilen sonuçlar ile karşılaştırmışlardır. *Q. suber*'in RITA® biyoreaktörlerinde her 4 veya 6saatte 1 dk daldırma frekansı ile taze ağırlık artışı, her 12 saatte 1 dk daldırma frekansına göre 3.7 kat, yarı-katı ortamdaki kültürlere kıyasla da 7.5 kat fazla olduğunu belirtmişlerdir. Özden-Tokatlı ve arkadaşları (2007), zeytin bitkisinin aksillar tomurcuklarından mikroçoğaltım optimizasyonu için, 2-3 aksillar tomurcuk içeren eksplant parçalarını otomatik geçici daldırma sisteminde (RITA®) kültüre alarak, çeşitli dinlenme (her 2, 8 ve 16 saatte) ve daldırma (sırasıyla 4 ve 16 dk) sürelerini test etmişlerdir. 5 hafta sonunda en iyi daldırma sıklığı ve süresinin, her 16 saatte bir 16 dk daldırma süresi olarak belirtmişlerdir. Özden ve arkadaşlarının (2010)'da yaptıkları çalışmada ise, zeytin bitkisinden aldıkları nodal tomurcukların yarı-katı ortamda ve geçici daldırma sistemleri (TIS) ile çoğaltılması için, farklı bitki büyüme düzenleyicileri (zeatin ve dikegulak) ile karbon kaynaklarının (glukoz, sukroz ve mannitol) etkilerini araştırmışlardır. Yarı-katı ortamda çoğaltılan zeytin gövdelerinde güçlü apikal dominansın olduğu ve TIS'in kullanımı ile besin ortamına sadece mannitol eklenmesi sonucunda zeytin gövdelerindeki dominansın kırıldığını belirtmişlerdir. Ayrıca TIS sisteminde besin ortamına zeatin ve dikegulak eklenmesinin çoklu gövde oluşumu üzerine olumlu etkisinin olduğu da belirtilmiştir. Tez çalışmamız kapsamında Anadolu sığılasının mikroçoğaltımı için yarı-katı ortamda sürgün ucu kültüründe kullandığımız 0.2 mg/L BAP ve 0.05 mg/L NAA ilaveli WPM besin ortamında canlı sürgün yüzdesi diğer ortamlara göre daha fazla (%91.83) bulunmuş ancak sürgünlerde köklenme çok az olmuştur. Geçici daldırma sistemi ile sürgün ucu kültürü çalışmamızda, sürgün uzunluğu, köklenme ve yaprak gelişimi bakımından iyi bulunan BBD ilavesiz WPM besin ortamı kullanılmıştır. Sonuç olarak Anadolu sığılasının geçici daldırma sistemi (RITA®)'nde çoğaltım

çalışmaları için çeşitli kombinasyonlarda BBD ilaveli WPM besin ortamı ile çalışmalar yapılması ve daha sonra bu ortamda gelişen fidelerin köklendirme ve dış ortama aktarılması çalışmalarının yapılması faydalı olacaktır.

2000'li yıllardan sonra TIS çalışmalarında daha çok daldırma sıklığı ile ilgili çalışmalara rastlanmakla birlikte, farklı bitki türlerinde bu sistem ile çeşitli çalışmalar ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Noordin ve arkadaşları (2012) da yarı-katı ortam ile geçici daldırma sisteminde *Stevia* sürgünlerinin çoğaltımını karşılaştırmışlardır. RITA[®] sisteminde her 6 saatte 15 dk daldırma döngüsü ile *Stevia* sürgünlerinde kütle artışını yarı-katı ortama göre 2 kat fazla bulmuşlardır.

Alvarenga-Venutolo ve Salazar-Aguilar (2015) doğal bir tatlandırıcı olan *Stevia* bitkisinde kütle mikroçoğaltımını, otomatik geçici daldırma sistemini (RITA[®]), ikiz şişeler sistemi (BIT[®]) ve yarı-katı ortam ile karşılaştırarak araştırmışlardır. En yüksek sürgün oluşumu RITA[®] sisteminde 8 saatte 10 dk daldırma ile elde edilmiştir. Ayrıca BIT sistemi ile her 12 saatte 10 dk daldırma prosedürü ile yaş ve kuru ağırlık kütlesi ile boy artışı olan güçlü yeşil bitkiler elde etmişlerdir.

Mordocco ve arkadaşları (2009), geçici daldırma sistemi (TIS) ile 6, 12, 24 ve 48 saatte 1 dk daldırma sıklığı ile şekerkamışı bitkisinin kitlesel mikroçoğaltımını araştırmışlardır. Sürgün oluşumunda en iyi sonuçlar 24 saatte 1 dk daldırma ile elde edilmiştir.

Yapılan araştırmalara bakıldığında genel olarak daldırma sıklığının artırılması ile daldırma süresinin azaltılması veya daldırma sıklığının azaltılarak daldırma süresinin artırılması şeklindeki çalışmalarda TIS ile daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Bizim çalışmamızda *L. orientalis*'in geçici daldırma sistemi ile çoğaltılması, sürgün uzunluğu, canlı eksplant yüzdesi ve yaş ağırlık açısından değerlendirildiğinde uygulanan 2 daldırma periyodundan (6 ve 8 saatte 15 dk daldırma) 6 saatte 15 dk daldırmada bitkicik gelişimlerinin daha iyi olduğu (istatistiki olarak önemsiz) bulunmuştur. Ancak bazı bitkilerde 15 dk daldırma süresi, 7. haftanın sonunda hiperhidrisitiye neden olmuştur. *L. orientalis*'in TIS optimizasyonu için yapılacak

çalışmalarda 6 saat dinlenme ile 10 dk ve daha kısa daldırma sürelerinin uygulanması optimizasyon için yararlı olacaktır.

L. orientalis'de geçici daldırma sistemi ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Önemli potansiyel ve avantajlara sahip olan bu sistemlerin tehlike altında olan nadir ve endemik türlerin çoğaltılmasında kullanılmak üzere kültürün optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca geçici daldırma mikroçoğaltım için kullanılabilir biribirinden farklı metabolik süreçleri incelemek yararlı olacaktır.

Bu çalışmanın sonuçları *L. orientalis*'in RITA® biyoreaktörleri ile çoğaltılmasında, *in vitro* olarak üretilmiş steril fidelerin çeşitli kısımları eksplant olarak kullanılarak mikroçoğaltım çalışmalarının yapılmasının başarılı olabileceğini göstermiştir.

L. orientalis'in geçici daldırma sistemi (TIS) ile çoğaltımı için farklı BBD kombinasyonları, farklı daldırma süre ve frekansları, besin ortamı hacmi ve kültür kabı hacminin optimizasyon çalışmaları yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Akita, M. & Takayama, S. (1994) Induction and development of potato tubers in a jar fermentor, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36: 177-182.
- Akula, A.; Becker, D. & Bateson, M. (2000) High-yielding repetitive somatic embriyogenesis and plant recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. *Plant Cell Reports*, 19: 1140-1145.
- Alan, M.; Velioğlu, E.; Ezen, T.; Őıklar, S. ve Öztürk, H. (2014) Anadolu sığlasında (*Liquidambar orientalis* Mill.) bazı kantitatif karakterlerin çeşitliliği, Orman Genel Müdürlüğü Orman Ağaçları ve Tohumları Islah Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara-2013, *Teknik Bülten*, s.28.
- Albarrán, J.; Bertrand, B.; Lartaud, M. & Etienne, H. (2005) Cycle characteristics in a temporary immersion Bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos, *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 81: 27-36.
- Alister, B.; Finnie, J., Watt, M.P. & Blakeway, F. (2005) Use of temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA), *Liquid Culture Systems For In Vitro Plant Propagation*, pp 425-442.
- Alvaranga-Venutolo, S. & Salazar-Aguilar, T. (2015) Mass micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in temporary immersion systems, *Cultivos Tropicales*, 36(3): 50-57.
- Alvard, D.; Côte, F. & Teisson, C. (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation, Effects of temporary immersion of explants, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 32: 55-60.
- Anonim, 1996 Sigma Bio Sciences Pflanzenzellkultur Katalog, Erişim Tarihi: 25.02.2012.

- Ashraf, M.F.; Aziz, M.A.; Stanslas, J. & Kadir, M.A. (2013) Optimization of immersion frequency and medium substitution on microtuberization of *Chlorophytum borivillianum* in RITA® system on production of saponins, *Process Biochemistry*, 48: 73-77.
- Atay, İ. (1985) Sığla ağacının (*Liquidambar orientalis* Mill.) önemi ve silvikültür özellikleri, *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 35(1): 15-21.
- Aitken-Christie, J. & Davies, H. E. (1988) Development of a semi-automated propagation system, *Acta Hortic.* 230: 81-87.
- Aydınöz M. ve Bulut S. (2014) Egenin gizli kalmış şifa iksiri: Sığla, AKÜ FEMÜBİD, 012201 (1-6).
- Baran-Ayaz, Ö.; Surgun, Y. ve Bürün, B. (2015) Endemik Anadolu sığlası (*Liquidambar orientalis* Mill.)'nda tohum sterilizasyonu ve çimlenme, *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, (Özel Sayı 2): 82-86.
- Baran-Ayaz, Ö.; Acar-Surgun, Y. & Bürün, B. (2017) Micropropagation of endemic *Liquidambar orientalis* Mill. Through temporary immersion system (TIS), *VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems (ISEEP 2017)*, Çanakkale Onsekiz Mart University, 4-7 October 2017, Abstract Book p-46.
- Bayraktar, M.; Hayta, S., Parlak, S. & Gürel, A. (2015) Micropropagation of centennial tertiary relict trees *Liquidambar orientalis* Miller through meristematic nodules produced by cultures of primordial shoots, *Trees*, 29 (4): 999-1009.
- Daquinta, M.; Mosqueda, O.; Gonzáles, M.T.; Benega, R. & Silva, J.A.T. (2007) Shoot proliferation of *Caladium x hortulanum* in a temporary immersion system, *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 1(1): 70-72.
- Dirik, H. (1986) *Anadolu Sığlası (Liquidambar orientalis)'nın gençleştirilmesi üzerine çalışmalar*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul. s:64.
- Efe (Güngördü), A. (1987) *Liquidambar orientalis* Mill. (Sığla ağacı)'in morfolojik ve palinolojik özellikleri üzerine araştırmalar, *İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 37(2): 84-114.

- Erdağ, B. & Emek, Y. (2005) *In vitro* adventitious shoot regeneration of *Liquidambar orientalis* Miller, *Journal of Biological Sciences*, 5(6): 805-808.
- Escalona, M.; Lorenzo, J.C.; Gonzáles, B.; Daquinta, M.; Gonzáles, J.L.; Desjardins, Y. & Borroto, C.G. (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems, *Plant Cell Rep.*, 18: 743-748.
- Esyanti, R.R.; Adhitama, N. & Manurung, R. (2016) Efficiency evaluation of *Vanda tricolor* growth in Temporary immerse system Bioreactor and thin layer culture system, *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 3(1): 63-66.
- Etienne, H. & Berthouly, M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 69:215-231.
- Etienne, H.; Lartaud, M.; Michaux-Ferrière, N.; Carron, M.P.; Berthouly, M. & Teisson, C. (1997) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 33: 81-87.
- Fedakar, S.O.; Bayraktar, S. & Gurel, A. (2012) Bioreactor system for large scale micropropagation for fruit tree root stocks, Ege university, Engineering faculty, Bioengineering department, Bornova-Izmir/Turkey.
- García_Ramírez, Y.; Gonzáles, M.G.; Mendoza, E.Q.; Seijo, M.F.; Cárdenas, M.L.O.; Moreno-Bermúdez, L.J. & Ribalta, O.H. (2014) Effect of BA on morphology and physiology of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex Wendl in temporary immersion, *American Journal of Plant Sciences*, s:205-211.
- Genç A. (1999) Sığla ağacı (*Liquidambar orientalis* Mill)'nın doku kültürü ile üretilmesi, *Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü, Teknik Bülten*, no:14.
- Georgiev, V.; Schumann, A.; Pavlov, A. & Bley, T. (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology, *Eng. Life Sci.*, 14: 607-621.
- Grozeva, S.; Rodeva, V. & Kintzios, S. (2009) Successful regeneration of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) in an airlift bioreactor: Effect of medium phase and genotype, *The Open Horticulture Journal*, 2: 70-75.

- Gutiérrez, L.G.; López-Franco, R. & Morales-Pinzón, T. (2016) Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA[®], *African Journal of Biotechnology*, 15(28): 1503-1510.
- Harris RE & Mason EB (1983) Two machines for in vitro propagation of plants in liquid media. *Can. J. Plant Sci.* 63: 311–31
- Ickerd-Bond, S.M.; Pigg, K.B. & Wen, J. (2005) comparative in fructescence morphology in *Liquidambar* (Altingiaceae) and its evolutionary significance, *American Journal of Botany* 92(8): 1234-1255.
- Jimenez, E.;Perez, N.; Feria, M.; Barbon, R.; Capote, A.; Chavez, M.; Quiala, E. & Perez, J.C. (1999) Improved productions of potato microtubers using a temporary immersion system, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 59: 19-23.
- Kitto, S.L. (1997) Commercial micropropagation, *Hort Science*,32: 1012-1014.
- Lorenzo, J.C.; Gonzalez, B.L.; Escalona, M.; Teisson, C.; Espinosa, P. & Borrota, C.G. (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 54: 197-200.
- Mansuroğlu S. ve Gürel E. (2001) Mikroçoğaltım, Bölüm 8. S.262-281, (eds. Babaoğlu M., Gürel E. Ve Özcan S.), *Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniv. Vakfı Yayınları, Konya s:374.
- Mordocco, A.M.; Brumbley, J.A. & Lakshmanan, P. (2009) Development of a temporary immersion system (RITA[®]) for mass production of sugarcane (*Saccharum spp.* Inter specific hybrids), *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.*, 45: 450-457.
- Murch, S.J.; Liu, C.; Romero, R.M. ve Saxena, P.K. (2004) *In vitro* culture and temporary immersion Bioreactor production of *Crescentia cujete*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 78: 63-68.
- Noordin, N.; Ibrahim, R.; Sajahan, N.H.; Nahar, S.M.M.; Nahar, S.H.M. & Abdul-Rashid, N.R.(2012) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni through temporary immersion bioreactor system, Disponible en:http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/44/096/44096871.pdf, Consultado 28/03/17

- Özden-Tokatlı, Y.; Özüdoğru, E.; Kaya, E.; Akdemir, H.; Benelli, C.; Gümüşel, F. ve Lambardi, M. (2007) Geçici daldırma biyoreaktör sisteminin bitki doku kültürü çalışmalarında kullanımı, *XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, pp. 148-150.
- Özden, Y.; Özüdoğru, E.; Kaya, E. ve Akdemir, H. (2010) Zeytin (*Olea europea*) bitkisinin geçici daldırma biyoreaktör sistemleri (TIS) ile *in vitro* sürgün çoğaltımının iyileştirilmesi, *Zeytin Bilimi 1*, 1-6.
- Özmen, K. (2011) *Sığla ağacının (Liquidambar orientalis Miller) in vitro koşullarda çoğaltım özelliklerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz üniversitesi, Antalya. s: 48.
- Öztürk, M.; Çelik, A.; Güvensen, A. & Hamzaoğlu, E. (2008) Ecology of tertiary relict endemic *Liquidambar orientalis* Mill. forests, *Forest Ecology and Management*, 256: 510-518.
- Paek, K.Y.; Chakrabarty, D. ve Hahn, E.J. (2005) Application of bioreactor system of large scale production of horticultural and medicinal plants, *Plant Cell Tissues Organs Cult.*, 81: 287-300.
- Parlak, S. (2012) Sığla (*Liquidambar orientalis* Miller)'da alternatif vejetatif üretim yöntemi, *Orman Mühendisliği*, 49(10-11-12): 20-23.
- Pérez, M.; Bueno, M.A.; Escalona, M.; Toorop, P.; Rodríguez, R. & Cañal, M.J. (2013) Temporary immersion systems (RITA[®]) for the improvement of coark oak somatic embriyogenic culture proliferation and somatic embriyo production, *Trees*, 27: 1277-1284.
- Prada, M.A. & Arizpe, D. (2008) *Riparian tree and shrub propagation handbook*, An aid to Riverine restoration in the Mediterranean region, Generalitat-Valenciana.
- Ramírez-Mosqueda, M.A. & Iglesias-Andreu, L.G. (2016) Evaluation of different temporary immersion systems (BIT[®], BIG, RITA[®]) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks, *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.*, 52: 154-160.
- Robert, M.L.; Herrera-Herrera, J.L.; Herrera-Herrera, G.; Herrera-Alamillo, M.Á. & Fuentes-Carrillo, P. (2006) A new temporary immersion bioreactor system for micropropagation, *Plant Cell Culture Protocols Methods in Molecular BiologyTM*, Volume 318, pp 121-129.

- Ruffoni, B. & Savona, M. (2005) The temporary immersion system (T.I.S.) for the improvement of micropropagation of ornamental plants, *ISHS Acta Horti Culturae* 683: V International Symposium on New Floricultural Crops.
- Sankar-Thomas, Y.D.; Saare-Surminski, K. & Lieberei, R. (2008) Plant regeneration via somatic embryogenesis of *Camptotheca acuminata* in temporary immersion system (TIS), *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.*, 95: 163-173.
- Scheidt, G.N.; Silva, A.L.L.; Costa, J. & Soccol, C. (2011) *In vitro* growth of *Melaleuca alternifolia* Cheel in bioreactor of immersion by bubbles, *Pak. J. Bot.*, 43(6): 2937-2939.
- Simonton, W.; Robacker, C. & Krueger, S. (1991) A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 27: 211-218.
- Surgun, Y. & Bürün, B. (2017) Use of tissue culture techniques in conservation of sweetgum, ISEP 2017, VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems, 04-06 October 2017-Çanakkale.
- Teisson, C. & Alvard, D. (1995) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary immersion, In: M Terzi Et al.(eds) *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology* (pp 105-110), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Teisson, C.; Alvard, D.; Berthouly, B.; Côte, F.; Escalant, J.V.; Etienne, H. & Lartaud, M. (1996) Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion, *ISHS Acta Horticulturae* 440: International Symposium on Plant Production in Closed Ecosystems.
- Tisserat, B. & Vandercook, C. E. (1985) Development of an automated plant culture system, *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 5: 107-117
- Ürker, O. (2014) *Çevre etiği bağlamında Anadolu Sığla Ormanları*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, s:341.
- Velioğlu, E.; Kandemir, G.; Tayanç, Y.; Çengel, B.; Alan, M. ve Kaya, Z. (2008) Türkiye'deki sığla (*Liquidambar orientalis* Miller) populasyonlarının genetik yapısının moleküler belirteçlerle belirlenmesi ve koruma stratejileri geliştirilmesi, *T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Orman Ağaçları ve Tohumları*

Islah Araştırma M¼d¼rl¼ę¼, Teknik B¼lten No:20, Bakanlık Yayın No:339, Ankara, s:43.

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

Muğla Orman B¼lge M¼d¼rl¼ę¼-Plan Proje Şube M¼d¼rl¼ę¼, Ocak 2015.

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z373206?lang=en®ion=TR>
(G¼ncel tarihi: 01.12.2017)

<https://gardenculturemagazine.com/techno-gardens/hydroponics/what-is-hydroponics-top-5-techniques/> (G¼ncel tarihi: 10.01.2018)

<http://plant-biotechnology.tripod.com/ssi/growtek.html#> (G¼ncel tarihi: 20.08.2017)

<http://www.setis-systems.be/about/about-setis/> (G¼ncel tarihi: 19.08.2017)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Ad Soyad :Özlem BARAN AYAZ
Uyruk :T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi :DİYARBAKIR-14.03.1987
Medeni Hali :Evli
Telefon :0 554 235 97 17
E-posta :brn_ozlem@hotmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Bahçeşehir Atatürk Lisesi	2005
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2018

Bilimsel Faaliyetler

1. Baran-Ayaz, Ö.; Surgun, Y. ve Bürün, B. (2015) Endemik Anadolu sığılası (*Liquidambar orientalis* Mill.)'nda tohum sterilizasyonu ve çimlenme, *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, (Özel Sayı 2):82-86.
2. Baran-Ayaz, Ö.; Acar-Surgun, Y. ve Bürün, B. (2017) Micropropagation of endemic *Liquidambar orientalis* Mill. Through temporary immersion system (TIS), *VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems (ISEEP 2017)*, Çanakkale Onsekiz Mart University, 4-7 October 2017, Abstract Book p-46

