

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mustafa Alparslan UMARUSMAN

**ADANA VE ÇEVRESİNDE DOĞAL OLARAK YETİŞEN
KEÇİBOYNUZU (*Ceratonia siliqua* L.) GENOTİPLERİNİN
KLASİK VE YENİ NESİL DOKU KÜLTÜRÜ
TEKNİKLERİYLE MİKROÇOĞALTIMI VE GENETİK
KARARLILIĞININ BELİRLENMESİ**

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ADANA VE ÇEVRESİNDE DOĞAL OLARAK YETİŞEN
KEÇİBOYNUZU (*Ceratonia siliqua* L.) GENOTİPLERİNİN KLASİK VE
YENİ NESİL DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİYLE
MİKROÇOĞALTIMI VE GENETİK KARARLILIĞININ
BELİRLENMESİ**

Mustafa Alparslan UMARUSMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 04/12/2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
DANIŞMAN

Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
ÜYE

Doç. Dr. Pembe EVCİ ÇÜRÜK
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ADANA VE ÇEVRESİNDE DOĞAL OLARAK YETİŞEN
KEÇİBOYNUZU (*Ceratonia siliqua* L.) GENOTİPLERİNİN KLASİK VE
YENİ NESİL DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİYLE
MİKROÇOĞALTIMI VE GENETİK KARARLILIĞININ
BELİRLENMESİ**

Mustafa Alparslan UMARUSMAN

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Yıl: 2018, Sayfa: 87

Jüri : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
: Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Doç. Dr. Pembe EVCİ ÇÜRÜK

Bu çalışmada, Akdeniz Bölgesinde doğal olarak yayılım gösteren üç farklı keçiboynuzu genotipinin Plantform biyoreaktör sistemi ve katı besin ortamlarında karşılaştırmalı olarak mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmaları yürütülmüştür. İlk olarak genotiplerin katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde, MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) ve GA₃ (0.1, 0.5 mg/L) bitki büyüme düzenleyicileri uygulanmıştır. Katı kültür köklenme denemeleri için MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile NAA (0, 1.0, 2.0 mg/L) ve IBA (0, 1.0, 2.0 mg/L) büyüme düzenleyicileri denenmiştir. En yüksek mikroçoğaltım değerleri, MS ve ½ MS besin ortamlarından ve 0.5 ve 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarından elde edilmiştir. Mikroçoğaltım için belirlenen en iyi besin ortamı içeriği ile Plantform sisteminde çalışılmıştır. Çalışma neticesinde, Plantform sistemi her üç keçiboynuzu genotipi için bitki boyu, çoğalma katsayısı ve bitki kalitesi bakımından katı kültür sistemine göre daha iyi sonuç vermiştir. SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda katı kültür ortamı ve Plantform sisteminde çoğaltılan bitkilerde herhangi bir genetik açılımın olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Plantform Geçici Daldırmalı Biyoreaktör Sistem, MS, WPM, Keçiboynuzu, *Ceratonia siliqua* L.

ABSTRACT

MSc THESIS

**MICROPROPAGATION OF ADANA AND AROUND NATURALLY
GROWN CAROB (*Ceratonia siliqua* L.) GENOTYPES WITH THE
CLASSIC AND NEW GENERATION TISSUE CULTURE TECHNIQUES
AND DETERMINATION OF GENETIC STABILITY**

Mustafa Alparslan UMARUSMAN

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE**

Supervisor : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

Year: 2018, Pages: 87

Jury : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR

: Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ

: Doç. Dr. Pembe EVCİ ÇÜRÜK

In this study, micropropagation and rooting studies were carried out in comparative Plantform bioreactor system and solid media with three different carob genotypes which are growing naturally in the Mediterranean Region. First of all, micropropagation of carob genotypes were evaluated in solid MS, ½ MS and WPM media supplemented with BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) and GA₃ (0.1, 0.5 mg/L) for micropropagation, in MS, ½ MS and WPM media supplemented with IBA (0, 1.0, 2.0 mg/L) and NAA (0, 1.0, 2.0 mg/L) for rooting. Based on the solid media, the best results in all three genotypes were obtained from MS and ½ MS medium containing 0.5 and 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ plant growth regulatory concentrations for micropropagation. Micropropagation studies were carried out in the Plantform system with the best-defined media content. As a result of studies, Plantform system showed better plant growth, multiplication coefficient and plant quality than solid culture system in all three genotypes propagation medium. Genetic stability of plants grown in solid culture and Plantform systems was tested by SSR markers.

Key words: Plantform Temporary Immersion Bioreactor Systems, MS, WPM, Carob, *Ceratonia siliqua* L.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) besleyici değeri yüksek bir ılıman iklim meyvesidir. Türkiye’de Akdeniz Bölgesi başta olmak üzere Ege ve Marmara Bölgelerinde de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Anavatanı olan ülkemizde yabani formda doğal olarak yetişmekle birlikte, ticari çeşitleri de bulunmaktadır. Seçici olmayan toprak isteğinden dolayı da her geçen gün tarım alanları artış göstermektedir. Bu artışa bağlı olarak üretim materyali talebi gün geçtikçe artmaktadır.

Bahçe meyveciliğinde üretim materyali olan fidanlar vejetatif yollarla üretilmektedir. Yabani tohumlardan üretilen “yoz” veya kültür formlarının tohumlarından üretilen “çöğür” anaçlar üzerine aşılama yoluyla klonal çoğaltım sağlanmaktadır. Klonal çoğaltım, bahçe tarımında homojen üretim yapmayı mümkün kılmaktadır. Tohumla çoğaltılan üretim materyalleri genetik açılım göstermesi sebebiyle meyve ağaçlarının farklı dönemde çiçeklenmesine ve buna bağlı olarak tozlanma-döllenme oranının azalmasına, meyvelerin farklı zamanlar içinde olgunlaşmasına ve buna bağlı olarak hasat zamanının aynı dönem içinde gerçekleşmemesine ve diğer kültürel işlemlerin homojen bir şekilde uygulanmasına engel teşkil etmesi sebebiyle tercih edilmeyen bir üretim yöntemidir.

Diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi keçiboynuzu fidanları anaç üzerine aşılama yoluyla üretilmektedir. Ticari olarak fidan üretimi yapılan işletmelerde gerçekleştirilen survey çalışmalarında, tohumdan aşılama olgunluğuna erişen bir keçiboynuzu anacının yaklaşık üç yıllık bir zaman dilimi içerisinde meydana geldiği belirtilmiştir. Aşılınmış ve dikime hazır hale gelen bir keçiboynuzu fidanı yaklaşık olarak dört yıllık bir sürecin sonunda üretilebilmektedir. İşgücü, zaman, bakım ve büyütme kriterleri göz önüne alındığında tüm bu girdiler keçiboynuzu fidanının üretim maliyetini artırmakta ve çiftçilerin alım gücünü zorlamaktadır. Dünya da ve ülkemizde başarıyla gerçekleştirilen bitki doku ve organ kültürü bu sorunların çözümü için keçiboynuzu klonal çoğaltılmasını mümkün kılmaktadır.

Klasik doku kültürü teknikleri olarak adlandırdığımız katılaştırıcı bileşenlerin kullanıldığı (agar, gelrite vb) katı besin ortamları, kitlesel üretimde en çok kullanılan yöntemlerdir. Klasik doku kültürü sistemleri yüksek işgücü, girdi maliyetlerinin yüksek olması, katı kültürde uygulanan alt kültüre alma ve buna bağlı olarak ortaya çıkan kontaminasyon problemleri sebebiyle yeni nesil doku kültürü tekniklerinin geliştirilmesine ve kullanma potansiyelinin artmasına olanak sağlamıştır. Katı kültür ortamlarında yaşanan sorunlara alternatif bir çözüm olan geçici daldırma sistemleri, geleneksel yarı-katı ve sıvı besi ortamlarının avantajlı yönlerini bir araya getiren sistemlerdir. Geçici daldırma yöntemi esasına dayanan farklı özelliklerde prototip sistemler geliştirilmiştir. Bunlar arasında "Plantform" sistemi son yıllarda geliştirilen geçici daldırma sistemidir. Bu sistemin avantajı kültür kaplarında bağımsız havalandırma sağlayarak bitki gelişimini iyileştirici özellik göstermesidir. Tez kapsamında, Adana ve çevresinde doğal olarak yetişen, meyve kalitesi ve yüksek verim niteliği taşıyan ticari çeşit adayı Kıbrıs ve Monoik genotipleri ile peyzaj amaçlı yetiştirilen Adana genotipi kullanılarak *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Katı kültür denemeleri sonrasında en iyi mikroçoğaltım gelişimini sağlayan besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonu ile son yıllarda geliştirilen geçici daldırma Plantform biyoreaktör sisteminin bitki çoğalma ve köklenmesine etkileri incelenmiştir.

Plantform biyoreaktör sisteminde kültüre alınan eksplantlar için, daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde eksplantlar, MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) ve GA₃ (0.1, 0.5 mg/L) bitki büyüme düzenleyicilerinde kültüre alınmıştır. Bitki boyu (cm) ve kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitkicik) parametreleri incelenmiştir.

Kıbrıs genotipinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin katı kültürde bitki boyu üzerine etkisi incelendiğinde, Kıbrıs genotipinin mikroçoğaltım denemelerinde en yüksek bitki boyu, 2.1 cm ile 1.5 mg/L BA+0.5

mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda belirlenen en iyi besin ortamı ve hormon konsantrasyonu ile Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri kurulmuştur. Bu sonuçlara göre, Kıbrıs genotipi gelişimini bitki boyu (cm) açısından incelediğimizde katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyu ortalaması 1.34 cm iken Plantform'da 2.08 cm olarak elde edilmiştir. Kardeşlenme katsayısı ise katı kültür mikroçoğaltım denemesinde 3.96 (kardeş/bitkicik) iken Plantform mikroçoğaltım denemesinde 5.77 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Monoik genotipinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin katı kültürde bitki boyu üzerine etkisi incelendiğinde, Monoik genotipinin mikroçoğaltım denemelerinde en yüksek bitki boyunun 1.1 cm ile 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Monoik genotipi katı kültür mikroçoğaltım ve Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde kardeşlenme katsayısı için istatistiki açıdan önemli bulunurken, bitki boyu açısından farklılık görülmemiştir. Kardeşlenme katsayısı katı kültür mikroçoğaltım denemesinde ortalama 2.33 (kardeş/bitkicik) iken Plantform mikroçoğaltım denemesinde 2.88 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Monoik genotipini bitki boyu (cm) açısından incelediğimizde katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyu ortalaması 0.70 cm iken Plantform'da 1.01 cm olarak elde edilmiştir. Adana genotipinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin katı kültürde bitki boyu üzerine etkisi incelendiğinde, Adana genotipinin mikroçoğaltım denemelerinde en yüksek bitki boyunun 2.7 cm ile 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş ½ MS besin ortamından elde edilmiştir. Adana genotipi katı kültür mikroçoğaltım ve Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde kardeşlenme katsayısı için istatistiki açıdan önemli bulunurken, bitki boyu açısından farklılık görülmemiştir. Kardeşlenme katsayısı katı kültür mikroçoğaltım denemesinde 5.88 (kardeş/bitkicik) iken Plantform mikroçoğaltım denemesinde 7.22 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Buna karşın Adana genotipini bitki boyu (cm) açısından incelediğimizde katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyu ortalama 2.16

cm iken Plantform'da 1.93 cm olarak elde edilmiştir. Adana genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinde maksimum bitki boyu, 2.7 cm iken Plantform'da 2.8 cm olarak tespit edilmiştir.

Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerinin katı ortam mikroçoğaltım denemelerinin ardından katı kültür köklenme denemeleri kurulmuştur. Köklendirme denemelerinde MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları (0, 1.0 ve 2.0 mg/L) kullanılmıştır. Sekiz haftalık kültür süresi sonucunda, 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında Monoik genotipine ait bitkiciklerde köklenme görülse de, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Kıbrıs ve Adana genotiplerine ait bitkiciklerde köklenmeye yönelik istenilen başarı sağlanamamıştır.

Çalışmalar neticesinde Plantform biyoreaktör sisteminin, mikroçoğaltım uygulamalarında iyi bir potansiyele sahip olabileceği belirlenmiştir. SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda da katı kültür ve Plantform sisteminde kültüre alınan bitkilerde herhangi bir genetik açılımın olmadığı moleküler çalışmalarla belirlenmiş olup başlangıç materyali ile herhangi bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak, Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminin, klasik *in vitro* mikroçoğaltım sistemine göre maliyet, iş gücü ve zaman kazanımı açısından daha avantajlı olduğu ortaya konmuştur.

TEŞEKKÜR

Üniversite öğrenimim süresince, gerek lisans dönemimde gerekse yüksek lisans dönemimde bilgisiyle, tecrübesiyle, öğretileriyle ve içten samimiyeti ile yanımda olan, yalnızca bilimsel alanda değil zor günlerimde de elimden tutan, dürüstlük ve adalet çizgisini şiar edinerek bana önderlik eden, sabrın ve emeğin her zorluğu aşmada en doğru anahtar olduğunu öğreten, maddi ve manevi desteğini esirgmeden sabır ve anlayışıyla hayatıma ışık tutan ve bana ömür boyunca öğrencisi olma onurunu yaşatan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimin değerlendirilmesinde emeği geçen değerli jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye ve Doç. Dr. Pembe EVCİ ÇÜRÜK'e katılımlarından dolayı teşekkür ediyorum.

Öğrencilik yıllarımdan bu yana beraber çalıştığım, bilgi ve tecrübelerini esirgmeden bizlerle paylaşan, kendisini tanımaktan mutluluk duyduğum değerli büyüğüm Dr. Özhan ŞİMŞEK'e teşekkür ediyorum. Çalışmalarımı sürdürdüğüm Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarım Dr. Dicle DÖNMEZ, Dr. Taner BOZKURT, Dr. Tolga İZGÜ ve Dr. Başar SEVİNDİK'e yardımları için teşekkür ediyorum.

Mesleki eğitimimi en güzel şekilde tamamladığım Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne, çalışmalarına destek veren Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne ve merkezin müstesna çalışanları, Ziraat Yüksek Mühendisi Belgin BİÇEN, Fatma KARA ve Eda ARSLANKILIÇ'a teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans serüvenime birlikte başladığım ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Ziraat Yüksek Mühendisi Melike CENGİZ'e yardımları için teşekkür ediyorum. Süregelen zaman içerisinde bana inanan güvenen, telkinleriyle destekçim olan dost ve arkadaşlarıma ve özellikle Arş. Gör. Sara YASEMİN ve Dr. Nihan ARABACI'ya yanımda oldukları için teşekkür ediyorum.

Ve tabii ki hayatımdaki her başarının gerçek sahipleri annem Selma UMARUSMAN ve babam Nazım UMARUSMAN'a bana olan inançları, sonu gelmeyen fedakarlıkları, maddi ve manevi her türlü desteği esirgmeden yanımda oldukları ve var oldukları için teşekkür ediyorum. Anne ve babamın en güzel hediyeleri olan birbirinden değerli kardeşlerime bana olan güvenleri ve destekleri için teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
2.1. Doku Kültüründe Keçiboynuzu ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	11
2.2. GDS ile Yürütülen Çalışmalar	14
3. MATERYAL METOD	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Bitkisel Materyal.....	21
3.2. Metod	24
3.2.1. Bitkisel Materyalin Temin Edilmesi	24
3.2.2. Bitkisel Materyalin Kültüre Alınması	25
3.2.2.1. Sterilizasyon Protokolünün Optimizasyonu.....	25
3.2.3. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemelerinin Kurulması.....	27
3.2.3.1. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri I	27
3.2.3.2. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri II	30
3.2.4. Katı Kültür Köklendirme Denemelerinin Kurulması.....	31
3.2.5. Platform Biyoreaktör Sistemi ile Mikroçoğaltım Denemesinin Kurulması	32
3.2.6. Platform Biyoreaktör Sistemi ile Köklendirme Denemesinin Kurulması	33

3.2.7. Deneme Planı, İstatistik Analizleri ve İncelenen Kriterler	33
3.2.8. Doku Kültürü Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Bitkilerde Genetik Kararlılığın Belirlenmesi	34
3.2.9. DNA İzolasyonu	34
3.2.10. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması	35
3.2.11. DNA İzolasyon Aşamaları	36
3.2.12. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi	38
3.2.13. SSR- PCR Koşulları	38
3.2.14. SSR Analizleri	40
3.2.15. Li-Cor için Poliakrilamid Jel Hazırlığı	41
3.2.16. Li-Cor Elektrophorez Koşulları	41
3.2.17. Moleküler Çalışmaların Sonuçlarının Değerlendirilmesi	42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	43
4.1. Sterilizasyon Protokolünün Optimize Edilmesine ait Bulgular	43
4.2. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemelerine ait Bulgular	47
4.2.1. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri I'e ait Bulgular	47
4.2.2. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri II'e ait Bulgular	48
4.2.2.1. Kıbrıs Genotipine ait Bulgular	49
4.2.2.2. Monoik Genotipine ait Bulgular	51
4.2.2.3. Adana Genotipine ait Bulgular	54
4.3. Katı Kültür Köklenme Denemelerine ait Bulgular	57
4.4. Platform Mikroçoğaltım Denemesine Ait Bulgular	61
4.5. Moleküler Çalışmalara Ait Bulgular	64
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Türkiye’de yıllar itibariyle keçiboynuzu üretim miktarı (ton).....	1
Çizelge 1.2.	Keçiboynuzu meyvesinin mineral madde içeriği.....	3
Çizelge 3.1.	MS Besin ortamı içeriği.....	28
Çizelge 3.2.	WPM Besin ortamının içeriği.....	29
Çizelge 3.3.	Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri I’de mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılan besi ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonları.....	30
Çizelge 3.4.	Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri II’de mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılan besi ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonları.....	31
Çizelge 3.5.	Köklendirme denemesinde kullanılan besin ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonları.....	32
Çizelge 3.6.	DNA izolasyon yönteminde kullanılan tampon çözeltisinin içeriği.....	35
Çizelge 3.7.	PCR koşullarının içeriği.....	39
Çizelge 3.8.	SSR Analizinde Kullanılan Primer Listesi.....	40
Çizelge 3.9.	Poliakrilamid jel için kullanılan kimyasallar.....	41
Çizelge 4.1.	Kıbrıs genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen bitki boyuna (cm) ait veriler.....	49
Çizelge 4.2.	Kıbrıs genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) ait veriler.....	50
Çizelge 4.3.	Monoik genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen bitki boyuna (cm) ait veriler.....	52
Çizelge 4.4.	Monoik genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) ait veriler.....	53
Çizelge 4.5.	Adana genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen bitki boyuna (cm) ait veriler.....	55

Çizelge 4.6. Adana genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) ait veriler	56
Çizelge 4.7. Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerine ait katı kültür ve Platform sistemi mikroçoğaltım sonuçlarına ait veriler	62
Çizelge 4.8. DNA kalite ve miktarlarına ait sonuçlar	64



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1.	Kıbrıs genotipinin morfolojik yapısı.....	22
Şekil 3.2.	Monoik genotipinin morfolojik yapısı.....	23
Şekil 3.3.	Adana genotipinin morfolojik yapısı.....	24
Şekil 3.4.	Bitkisel materyallere ait sürgünler.....	25
Şekil 3.5.	Esplantların steril kabin içerisinde sterilizasyonu	26
Şekil 3.6.	Plantform biyoreaktör sistemi kültür kapları.....	33
Şekil 3.7.	Bitkisel materyale ait yaprak örneklerinin Tissue-Lyser cihazında öğütülmesi.....	35
Şekil 3.8.	DNA izolasyon aşamaları.....	37
Şekil 3.9.	DNA kalite ve kantitesinin ölçülmesi.....	38
Şekil 3.10.	PCR çalışmalarına ait görüntüler.....	39
Şekil 3.11.	Poliakrilamid jel hazırlanması ve Li-Cor elektroforez cihazının görüntüsü.....	42
Şekil 4.1.	Çalışmada kullanılan eksplantlar A: Keçiboynuzu genotiplerine ait sürgünler B: Sterilizasyon uygulaması için hazırlanmış eksplantlar	44
Şekil 4.2.	Kıbrıs genotipinin 4. haftada katı kültürde kardeşlenmesi (1.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA ₃ içeren MS ortamı).....	51
Şekil 4.3.	A: Katı kültür mikroçoağltım denemeleri sonucunda Monoik genotipine ait elde edilen bitkicikler (2 mg/L BA+0.5 mg/L GA ₃ içeren MS ortamı) B: Katı kültür mikroçoağltım çalışmaları sonucunda elde edilen bitkiciklerin boy ölçüleri.	54
Şekil 4.4.	A: 4 haftalık alt kültür sonucunda elde edilen bitkicikler B: Katı kültür mikroçoağltım denemeleri sonucunda Adana genotipine ait elde edilen bitkicikler (0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA ₃ içeren ½ MS ortamı)	57
Şekil 4.5.	Monoik genotipine ait bitkiciklerde köklenme durumu	58

- Şekil 4.6. A: Genotiplerin aktif karbonlu köklenme ortamında 4. haftadaki gelişim aşaması. B: Aktif karbonlu ve aktif karbonsuz ortamlardaki genotiplerin gelişme durumu 59
- Şekil 4.7. MS besin ortamına ek olarak $MgSO_4$ ve KNO_3 ilave edilmiş MS besin ortamındaki bitkiciklerin gelişme durumu 60
- Şekil 4.8. Dipping yöntemi ile IBA solüsyonuna daldırılan bitkicikler A: 1000 ppm oranında IBA solüsyonunun soğuk sterilizasyon yöntemi ile steril edilmesi B: Keçiboynuzu sürgünlerinin IBA çözeltisine daldırılması C: Daldırma sonrasında hormonsuz MS ortamına transfer edilen eksplant..... 61
- Şekil 4.9. A: Eksplantların Plantform kültür kaplarına aktarılması. B: Plantform sisteminde alt kültüre alınmış keçiboynuzu eksplantları C: Plantform biyoreaktör sisteminin genel görüntüsü D: Kıbrıs genotipinin Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen bitkicikleri. E: Monoik genotipinin Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen bitkicikleri. D: Adana genotipinin Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen bitkicikleri. 63
- Şekil 4.10. Cesi_21_cttt7 nolu primere ait poliakrilamid jel görüntüsü 66

KISALTMALAR

μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
2,4-D	: Dichlorophenoxyacetic acid
BA	: Benzil Adenin
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyici
BIG	: The Gravity Immersion Bioreactor (Yerçekimi Daldırma Biyoreaktör)
BIT-TIB	: Temporary Immersion Bioreactors (Geçici Daldırma Biyoreaktörler)
CTAB	: Cetyltrimethylammoniumbromide
dk	: Dakika
DNA	: Deoxyribonucleic acid
FAO	: Food and Agriculture Organisation (Gıda ve Tarım Örgütü)
g	: Gram
GA ₃	: Gibberallic acid
IBA	: Indolebutyric acid
IAA	: Indoleacetic acid
L	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MS	: (Murashige ve Skoog, 1962)
NAA	: Naphtaleneacetic acid
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PPM	: Plant Preservative Mixture
RITA	: The Recipient for Automated Temporary Immersion (Otomatik Geçici Daldırma için Alıcı)
rpm	: Revolution per minute

- SSR : Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)
Taq : *Thermus aquaticus*
TDZ : Thidiazuron
TIS : Temporary Immersion System =TIS=GDY (Geçici Daldırma
Yöntemi)
TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu
WPM : (Woody Plant Medium)



1. GİRİŞ

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) Fabaceae (Leguminosae) familyasının Caesalpinioideae alt familyasına ait herdem yeşil, geniş yapraklı çalı-ağaç formunda gelişim gösteren çok yıllık bir bitkidir. Keçiboynuzu, yeryüzünün en eski bitkilerinden birisidir. İlk olarak M.Ö. 4000 yıllarında Mısır'da ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (Tunalıoğlu ve Özkaya, 2003). Türkiye keçiboynuzunun anavatan bölgesi içerisinde yer almaktadır. Bu meyve türü ülkemizde, İzmir Urla'dan başlayarak, Hatay'ın Samandağ ilçesine kadar olan 1750 km'lik kıyı şeridinde kadar uzanan geniş bir alanda yayılım göstermektedir. Bu kıyı şeridinde keçiboynuzuna en yoğun olarak kıyıda 1-2 km'lik mesafede rastlanmakla birlikte, deniz seviyesinden 600-700 m yüksekliğe kadar iç bölgelerde de bu bitki türüne rastlanabilmektedir. Türkiye'de yetişen çeşitleri etli, susam ve yabancı tipleridir (Ahraz, 2003). Dünya genelinde önde gelen üretici ülkeler arasında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2017 yılı verilerine göre, İspanya 74.802.81 ton, İtalya yaklaşık 30.000 ton, Fas ve Portekiz yaklaşık 22.000 ton, Yunanistan ve Kıbrıs 7000 ton meyve üretimine sahiptir (FAO, 2017). Ülkemizde 2017 yılı itibarıyla 15.000 ton keçiboynuzu üretilmiştir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Türkiye'de yıllar itibarıyla keçiboynuzu üretim miktarı (ton) (TÜİK, 2018).

Yıllar	Meyve Veren Yaşta Ağaç Sayısı	Meyve Vermeyen Yaşta Ağaç Sayısı	Toplu Meyveliklerin Alanı (da)	Verim (kg/Ağaç)	Üretim Miktarı (Ton)
2010	256855	48457	3323	55	14172
2011	291354	97802	4940	48	13978
2012	311889	77783	5449	45	14166
2013	299925	77824	5119	48	14261
2014	305058	87367	6307	46	13985
2015	286347	84458	5244	45	12851
2016	293358	79138	5693	46	13405
2017	335687	48983	6735	45	15016

Keçiboynuzu, bir ılıman iklim bitkisidir. Yüksek sıcaklık ve kuraklığa çok dayanıklı olmasına karşın, düşük sıcaklıklara duyarlıdır. Toprak bakımından seçici olmayan keçiboynuzu, kıraç ve taşlı topraklarda da yetiştirilebilmektedir. Keçiboynuzunda çiçekler tek eşeyli olup, dişi ve erkek çiçeklerin bitki üzerinde bulunma durumuna göre çoğunlukla dioik özellik gösteren bitkiler grubundandır. Ancak, çok yaygın olmamakla birlikte, erkek ve dişi çiçeklerini aynı bitki üzerinde farklı yerlerde bulunduran monoik bitki ve hermafrodit çiçekli monoklin bitki formları da mevcuttur. Bu nedenle trioik bir bitki olarak da değerlendirilebilir. Cinsiyet özelliği bakımından görülebilen bu farklılıklar, kalıcı olarak kalıtsal yapıdan kaynaklanabildiği gibi, yetiştiricilik bölgeleri veya aynı bitkide yıllara göre değişen ekolojik koşullara bağlı olarak geçici olarak da görülebilir (Eti, 2015).

Keçiboynuzu tarımsal üretimin yanı sıra çok çeşitli toprak yapılarında gelişebilmesi dolayısıyla toprak erozyonunun önlenmesi, orman ağaçlandırılması ve her dem yeşil olması nedeniyle de peyzaj bitkisi olarak çevre düzenlemesi için yetiştirilmektedir. Özellikle keçiboynuzu meyve ve tohumu için yetiştirilip, üretimi yapılan bir kültür bitkisidir. Meyvesinin ve tohumlarının boyutu ve meyvedeki tohum sayısı, endüstriyel alanda kullanım şeklinin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Bu parametreler genotipe ve coğrafik koşullara göre değişkenlik göstermektedir (Naghmouchi ve ark, 2009).

Keçiboynuzu meyvelerinin ve tohumlarının farklı kullanım alanları bulunmaktadır. Keçiboynuzu mineral madde açısından zengin bir meyvedir. Potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, sodyum, selenyum, demir ve bakır keçiboynuzunda bulunmakta olan minerallerdir (Çizelge 1.2). Meyveler gıda endüstrisinde doğrudan tüketilmekle birlikte, katkı maddesi olarak insan beslenmesinde kullanılmakta ve diğer endüstri kollarında da değerlendirilmektedir. Özellikle kg fiyatının düşük olması ve yüksek miktarda şeker içermesi nedeniyle Akdeniz ülkelerinde pekmez ve alkollü içki üretiminde kullanılmakta ve önemli düzeyde selüloz, mineral madde ve ham protein içerdiği için kalan posa da hayvan yemi olarak rasyonlara katılmaktadır. Dahası keçiboynuzu pulp haline getirildikten

sonra tek hücre proteini üretiminde substrat olarak kullanılabilir. Ayrıca keçiyoynuzundan elde edilen şeker ekstraktı *Aspergillus niger* ve *Fusarium moniliforme* gibi kültür mikroorganizmaları için mükemmel bir besi yeri oluşturmaktadır (Sekerı-Pataryas ve ark, 1973).

Çizelge 1.2. Keçiyoynuzu meyvesinin mineral madde içeriği (Anonim, 2017).

Mineral Madde Miktarı	mg /100 g
Potasyum	843 - 1215
Kalsiyum	251 - 361
Fosfor	85 - 681
Magnezyum	63 - 326
Sodyum	4 - 7
Selenyum	0 - 5,9
Demir	1,25 - 5,44
Çinko	0,61 - 4,27

Keçiyoynuzunun yaklaşık %10'unu oluşturan çekirdeği "locust bean gum" adı verilen bir çeşit katkı maddesi üretiminde kullanılmaktadır. Bu gamın yapısında %80-85 oranında galaktomannan içeren ve tragasol olarak bilinen bir polisakkarit bulunmaktadır. Yaklaşık 100 kg tohumdan 20 kg gam elde edilmektedir. Bu doğal polisakkaritin en önemli özelliği yüksek vizikoziteli jel oluşturması ve bunun yanında geniş bir sıcaklık ve pH aralığında stabil kalmasıdır. Gıda endüstrisinde ekmek, makarna, kek ve pasta, dondurma, peynir, çikolata, marmelat ve meyve jölesi yapımında kıvam artırıcı olarak kullanılan bu gam, ayrıca tragasol türevi şeklinde ilaç endüstrisinde, kağıt endüstrisinde, matbaacılıkta, tekstil endüstrisinde, kozmetikte, mobilyacılıkta, kibrit üretiminde, dericilikte, petrol ve petro kimya endüstrisinde, deterjan ve plastik endüstrisinde de kullanılmaktadır. Gerek doğrudan gıda maddesi olarak gerekse dolaylı olarak endüstriyel ve farklı sanayi alanlarında geniş bir kullanım alanı bulunan keçiyoynuzunun her geçen gün tarım

alanları artmaktadır. Devlet desteği ile de yetiştiriciliği teşvik edilmekte ve çiftçiler tarafından önemsenmektedir.

Kapama meyve bahçesi kurulumunda homojen bir bahçe tesis edilmesi için klonal üretim ile fidanlar üretilmektedir. Keçiboynuzu fidan üretiminde de tohumların genetik açılım göstermesinden dolayı generatif çoğaltma sadece çöğür anaç elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. Klonal çoğaltma yöntemlerinden ise yaygın olarak göz ya da kalem aşı yöntemi ile vejetatif üretim yapılmaktadır. Aşılama için öncelikli olarak çöğür anaçlarının yetiştirilmesi gerekmektedir. Aşılama, tüpte yapılabildiği gibi özellikle sulanmayan ve kurak arazilerde direkt araziye tohum ekilerek yerinde aşılama da yapılabilmektedir. Keçiboynuzu çöğür anaçlarının aşılama olgunluğuna erişebilmeleri, ortalama üç yıllık bir bakım sonrasında mümkün olabilmektedir. Bu durum üretim maliyetlerinin artmasına ve seri üretim için büyük üretim alanlarına, iş gücüne ve zamana gereksinimi artırmaktadır. Modern kapama bahçeler ve yeni yetiştirme teknikleri sayesinde hızla artış gösteren keçiboynuzu yetiştiriciliği beraberinde sağlıklı, ismine doğru, hastalısız fidan talebini de artırmıştır. Bu talebin karşılanması klasik üretim yöntemlerinin yanında modern doku kültürü teknikleriyle de *in vitro* koşullar altında kitle üretiminin yolunu açmıştır. Ülkemizde sert çekirdekli, yumuşak çekirdekli ve diğer meyve türleri için anaç üretimi *in vitro* koşullar altında başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Keçiboynuzunun *in vitro* koşullar altında klonal olarak çoğaltılması doku kültürü teknikleri sayesinde mümkün görünmektedir.

Bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları;eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyasyon oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin

üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanmaktadır (Yaman, 2011; Babaoğlu ve ark, 2004). Bitki doku kültürü işlemlerinde ve genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonu yani bitkinin hücre, doku ve organlarından klonlanmasıdır.

Bitki doku kültürleri tekniğinin esas başlıca üç ana kısımdan oluşmaktadır:

- Kültürün gelişmesi için gerekli organik ve inorganik maddeleri içeren steril bir gıda ortamının hazırlanması,
- Kültüre alınacak bitki parçasının (eksplant) orijini oluşturana materyalin dezenfekte edilmesi,
- Orijin bitkiden istenen eksplantın (meristem, anter, embriyo, yaprak ucu vb.) alınarak steril besin ortamına, steril şartlarda konulması ve gelişmesi için uygun çevre şartlarına yerleştirilmesidir (Yaman, 2011).

Doku kültürü teknikleri kullanılarak yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında çoğunlukla katılaştırıcı agar kullanılan katı besin ortamları kullanılmaktadır. Klasik doku kültürü tekniklerinin yoğun işgücü gerektirmesinin yanı sıra üretim maliyetleri de oldukça yüksektir. Klasik katı kültür yöntemlerinde çok sayıda kültür kabına gereksinim duyulmakta ve bu durum iklimlendirme ortamlarının büyütülmesini zorunlu hale getirmektedir. Tüm bu zorlayıcı durumlar doku kültürü aracılığıyla üretimin endüstriyel boyutta geliştirilmesine engel olmaktadır (Takayama ve Misawa, 1981). Son yıllarda üretim maliyetlerinin azaltılarak kısa zamanda büyük ölçekte üretimin yapılabileceği üretim tekniklerinin gelişmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Uygun protokollerin kurulması halinde, katı kültürden daha etkili üretim olanakları taşıyan sıvı kültürlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır. Sıvı kültür ortamlarında çok sayıda eksplant büyük ölçekte çoğaltılabilmektedir. Eksplantların sıvı kültürde ortamla devamlı temas halinde olmasından dolayı besin maddesi alımı kolaylaşırken, bitkilerin gelişme oranı da

artmaktadır. Katı kültür sistemlerinde besin ortamlarında bitki gelişimi için besleyici nitelik taşınamasına rağmen kullanılan ve üretimdeki en yüksek girdiyi oluşturan katılaştırıcı agarın kullanılmaması ile üretim maliyetleri düşmektedir (Takayama ve Akita, 2005).

Günümüzde uygulanan doku kültürü tekniklerinde çoğunlukla katı besin ortamları kullanılmaktadır. Katı kültür sistemlerinde katı besin ortamına yerleştirilen eksplantların gelişmelerinde sürekliliğin sağlanması için periyodik olarak altkültüre alınmaları zorunludur. Her bir altkültür sırasında besin ortamlarında kontaminasyon görülme olasılığı artmaktadır. Katılaştırıcı bileşenlerin kullanıldığı katı besin ortamlarında gerçekleştirilen doku kültürü çalışmaları, sıvı besin ortamında yapılan doku kültür çalışmaları ile kıyaslandığında katı kültür ortamlarında kontaminasyon oluşma riski daha yüksektir (Etienne ve Berthouly, 2002). Bu nedenle özellikle ticari amaçlı mikroçoğaltım için katılaştırıcı bileşenlerin kullanılmadığı sıvı kültür ortamları tercih edilmektedir. Sıvı kültür ortamlarında eksplantların tüm yüzeyi ortama temas edebiliyor olması sebebiyle besin ortamındaki bileşenleri daha iyi absorbe etmektedirler. Sıvı kültür ortamlarının kullanıldığı biyoreaktörlerin mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılması da bu nedenlerden dolayı artmaktadır. Sıvı kültür ortamlarının kullanıldığı biyoreaktör sistemlerinde en çok karşılaşılan problem bitki materyalinin sıvı besin ortamına sürekli temas etmesi sebebiyle eksplantlarda meydana gelen vitrifikasyon olayıdır. Vitrifikasyon (camlaşma) bitki dokularının gevrek ve kırılabilir yapıya dönüşmesidir. Bu sorun sebebiyle son zamanlarda geliştirilen ve bitkinin belirli aralıklarla sıvı yüzeyden uzaklaşmasını mümkün kılan geçici daldırma sistem biyoreaktörler kullanılmaktadır. Geçici daldırma sistem biyoreaktörler, ilk olarak Haris ve Mason (1983) tarafından geliştirilmiş olup ilk başarılı bitki rejenerasyon sonuçları *Solanum tuberosum* ve *Coffea arabicani*'nin somatik embriyolarından elde edilmiştir (Etienne ve Berthouly, 2006).

Geçici daldırma sistem biyoreaktörlerin doku kültür tekniklerinin uygulama alanındaki avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Üretim girdilerinde azalmayı sağlar, ekonomiktir.
- Ticari kitlesel üretime olanak sağladığı için zaman ve mekan yönünden avantaj sağlar.
- Bu yöntemle çoğunlukla katılaştırıcı madde olarak kullanılan ve en pahalı girdiyi oluşturan agar maliyeti azalmış olur.
- Katı kültür ortamlarında eksplantlardan salgılanan biyokimyasalların neden olduğu kararmaların ve altkültürler sırasında ortaya çıkabilecek kontaminasyonların azaltılması yönünde avantaj sağlar.

Geçici daldırma sistem biyoreaktörlerde diğer biyoreaktör sistemlerinden farklı olarak eksplantlar ile sıvı besin ortamı arasında zaman zaman geçici temas sağlayabilen bir yüzey geliştirilmiştir. Hava akımı ile ortam belirli aralıklarla yukarı doğru çıkarak bitkinin ihtiyaç duyduğu besin maddelerine ulaşması sağlanmaktadır. Daldırma işlemi süresince hava akımı ve besin ortamı bitkiye nüfuz ederek materyale zarar vermeden dokulara iletilmektedir. Biyoreaktörlerde kitlesel bitki üretim protokollerinin kurulabilmesi için, katı kültür ve sıvı ortamlarda optimum kültür koşullarının belirlenmesi büyük önem arz etmektedir.

Bitki doku kültürü çalışmalarında geçmişten günümüze geliştirilmiş farklı geçici daldırma biyoreaktör sistemleri kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda modernize edilmiş ve yüksek başarı sağlayan sistemler geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasında da son dönemde geliştirilmiş ve kullanımı hızla yaygınlaşan Plantform biyoreaktör sistemi kullanılmıştır. Plantform biyoreaktör sistemi ile ilgili ilk çalışma Walender ve ark, (2014) tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada geçici daldırma sistemi ile klasik doku kültür ortamlarının *Digitalis lutea x purpurea*, *Echinacea purpurea* ve *Rubus idaeus* türlerinin mikroçoğaltımına etkilerini araştırmışlardır. Katı kültür ortamında elde ettikleri sonuçlar göz önüne

alındığında çoğalma oranı ve bitkicik kalitesi, geçici daldırma sisteminde gelişen bitkilerle ya aynı ya da agarlı ortamdaki bitkilerden daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. *Digitalis lutea x purpurea* ve *Rubus idaeus*'un mikroçoğaltımında her iki tekniğinde kardeş sayısı benzer sonuç verirken, *Echinacea purpurea*'da kardeş sayısı ve kalitesinin geçici daldırma sisteminde daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir. *Digitalis lutea x purpurea* ve *Echinacea purpurea* türlerinde yaş ağırlık geçici daldırma sisteminden elde edilirken, *Rubus idaeus* türü için katı kültür ortamından elde edildiğini belirtmişlerdir. Kuru ağırlık her iki kültür ortamında üç genotip içinde benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Yaptıkları bu çalışma ile Plantform biyoreaktör sistemlerinin bitki mikroçoğaltımında kullanımının uygun olduğunu ortaya koymuşlardır.

Bitki doku ve organ kültüründe, türe bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte uzun süre bitki büyüme düzenleyici içeren ortamlarda kültüre alınan bitkilerin gen yapısında yapısal değişimler meydana gelebilmektedir. Bu olay somaklonal varyasyon olarak adlandırılmaktadır. Klonal çoğaltımın esas olduğu bitki doku ve organ kültüründe bu olay vejetatif çoğaltıma engel teşkil eden bir durumdur. Moleküler markırlar, bitki genomunda herhangi bir bölge ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçası olarak adlandırılmaktadır. Bu markırlar moleküler bitki ıslahında kültür çeşitlerinin tanımlanmasında, genetik haritalamada, akrabalıkların belirlenmesinde, gen kaynaklarının karakterizasyonunda kullanılan bir yöntemdir. Genom üzerinde farklı bölgeler farklı markırlar olarak ifade edilir. SSR markırları, 1-4 arasında tekrarlanan nükleotid dizilimlerine sahiptir ve bu bölgeler "mikrosatellit" olarak adlandırılır. PCR'da bireysel olarak amplifiye olmaktadır. SSR markırları güvenilir, kodominant, polimorfizm oranı yüksek ve uygulanabilirliği kolay ve diğer markırlara göre daha ucuzdur (Kaçar ve ark, 2009). SSR markırları yüksek oranda bilgi içermeleri, kodominant olmaları ve PCR'da kolaylıkla tespit edilebilmesi sebebiyle tercih edilen bir sistemdir. Bu sistemin dezavantajı ise zaman alıcı ve yoğun iş gücü gerektirmesi dolayısıyla türe ait yeni mikrosatellitlerin elde edilmesidir (Büyükcinal Bal, 2003).

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında Adana ve çevresinde doğal olarak yetişen 3 keçiboynuzu genotipinin, klasik katı kültür besin ortamı ve geçici daldırma biyoreaktör sistemleri arasında yer alan Platform kültür kapları kullanılarak mikroçoğaltım çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla ilk olarak katı kültür besin ortamlarında farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonları kullanılarak her üç genotipinde en başarılı besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları tespit edilmiştir. Ardından belirlenen bu ortam ve bitki büyüme düzenleyici içerikleri ile Platform sistemleri kullanılarak mikroçoğaltım çalışmaları yürütülmüştür. Mikroçoğaltımı gerçekleştirilen genotiplerde Platform sistemi ya da diğer faktörlerden kaynaklanabilecek herhangi bir somaklonal varyasyonun tespit edilmesi amacıyla, kültüre alınan ilk bitkilerden ve ara aşamalarda ve köklendirme aşamalarında alınan bitki materyallerinden DNA izolasyonu yapılarak SSR markılarıyla genetik kararlılıkları karşılaştırılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Doku Kültüründe Keçiboynuzu ile İlgili Yapılan Çalışmalar.

Carimi ve ark (1997) keçiboynuzunda ovül kültürü ile embriyojenik kallus elde etmek amacıyla, keçiboynuzunun 20-25 mm'lik meyvelerinden alınan döllenmiş ovülleri *in vitro* da geliştirmeye yönelik bir araştırma yapmışlardır. Çalışmada, 150 mM sükröz, 500 mg/L malt ekstraktı ve 13.3 µM BA içeren MS ortamı kullanmışlardır. Farklı bileşenlerin embriyo gelişimine etkilerini incelemek amacıyla, 85 g sükröz ve 0,45 µM 2,4-D içeren MS ortamı kullanmış ve anormal gelişim gösteren embriyolar elde etmişlerdir. 60 g sükröz ilave edilmiş, 10 µM IBA içeren MS ortamında gelişen embriyoların sürgün oluşturacak şekilde çimlendiğini belirtmişlerdir. Döllenmemiş ovüllerle yapılan çalışmaların tamamında ise başarı sağlanamadığını rapor etmişlerdir.

Romano ve ark (2002) Akdeniz Bölgesi'nde doğal olarak yetişen keçiboynuzları ile mikroçoğaltım çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada eksplant kaynağı olarak olgun dişi keçiboynuzu ağaçlarının koltuk sürgünlerini kullanmışlardır. Sürgün gelişimi için ideal besin ortamının 4.44 µM BA veya 4.56 µM zeatin içeren MS ortamı olduğunu tespit etmişlerdir. En iyi kök gelişiminin 4.9 µM IBA'e 2-3 dk daldırmadan sonra hormonsuz besin ortamında kültüre alınan sürgünlerden elde edildiğini belirtmişlerdir. % 80-85 bağıl nem oranında seraya alınan bitkilerde yüksek başarı sağlamışlardır. Yaptıkları çalışmada başlangıç materyali olarak bahar döneminde alınan eksplantların *in vitro* da daha yüksek oranda gelişim gösterdiğini belirtmişlerdir.

Keçiboynuzu mikroçoğaltımında sürgünlerin *in vitro* da köklenmesini teşvik eden makro besin elementlerinin optimize edilmesi konusunda araştırma yapan Goncalves ve ark (2005), çalışmalarında tam MS, yarı kuvvette MS, ½ MS+N gibi farklı MS konsantrasyonlarının ve makro besin elementlerinin köklenme üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Köklenme denemelerinde ½ MS ortamında sürgünlerde %50 oranında başarı sağlamışlardır. Ana bitkiden alınan

yaprak örnekleriyle besin elementi analizi yapmışlar ve bu analiz sonuçlarına göre MS besin ortamına makro besin elementi ekleyerek yeni bir köklendirme ortamı hazırlamışlardır. Modifikasyon sonucunda elde edilmiş MS besin ortamında kültüre alınan sürgünlerin %80'nin köklendiğini belirtmişlerdir.

Custodio ve Romano (2006) *in vitro* da keçiboynuzu köklendirilmesinde şeker konsantrasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, mikroçoğaltımla üretilmiş keçiboynuzu sürgünlerini farklı şekerler eklenmiş yarı kuvvetli MS besin ortamlarında kültüre almışlardır. En iyi köklenme derecesini 145 mM oranında sakkaroz içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Bunun yanında fruktozun kök sayısını ve kök uzunluğunu arttırdığını tespit etmişlerdir. Ayrıca bitkilerin köklendirilmesinde test edilen glikoz yoğunluğundaki azalmanın bitkilerin dış koşullara adaptasyonunda yararlı olduğunu belirtmişlerdir.

Canhoto ve ark (2006) yaptıkları çalışmada, olgunlaşmamış keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua L.*) tohumlarının kotiledon segmentlerini kullanarak somatik embriyolar elde etmişlerdir. *In vitro* koşullar altında BA ve IBA içeren MS besi ortamında eksplantlar geliştirilmiş ve en iyi sonuçları (%33.8) 4.4 μ M BA ve 0,5 μ M IBA içeren MS besi ortamından elde etmişlerdir. Eksplantların gelişimini farklı oksin konsantrasyonlarında gözlemlemek amacıyla IBA ile diğer oksin grupları yer değiştirilerek oksin guruplarının bitki gelişimine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada NAA ve IAA'in embriyo oluşumunu teşvik ettiği, 2,4-D ve 4 amino 3,5,6 trichloropicolinic'in tamamen etkisiz olduğunu belirtmişlerdir. En iyi sürgün gelişiminin 3 μ M Gibberellik asit ortamından elde edildiğini tespit etmişlerdir.

Ksıa ve ark (2008) keçiboynuzunda (*Ceratonia siliqua L.*) kallus oluşumunu teşvik etmek amacıyla çalışmalar yürütmüş ve embriyogenesis çalışmalarında, keçiboynuzunun olgunlaşmamış tohumlarını kullanmışlardır. Kallus oluşumu için 2,4-D içeren besi ortamı kullanılmış ve kallus oluşumunun 9 μ M 2,4-D'de en yüksek oranda başarı gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışmanın ilerleyen safhalarında eksplantların gelişme evresinin ve 2,4-D konsantrasyonunun embriyogenesis gelişimini doğrudan etkilediğini saptamışlardır. İlk olarak 45

günlük yapılarda farklılaşmış hücreler gözlenmiş ve 70 günlük yapılarda küresel beyaz şekilli embriyoların geliştiğini tespit etmişlerdir. 90 günlük yapılarda tam olarak olgunlaşmış somatik embriyolar oluşmuş ve protoderm gelişim durumuna göre karakterize edilen kotiledon safhasını elde etmişlerdir.

Naghmouchi ve ark (2008) yaptıkları çalışmada keçiboynuzunda mikroçoğaltım için temel ve basit bir ortam protokolünün hazırlanmasını amaçlamışlardır. Yaptıkları denemeler kapsamında çimlenme ve sürgün gelişimi için en ideal ortamın 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/L IBA ve 0.5 mg/L GA₃ ihtiva eden MS ortamı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca mikro sürgün köklenmesi için en ideal ortam 2 mg/L IBA ile 2 mg/L aktif karbon içeren MS ortamı olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca genç ağaçlardan temin edilen otsu yapıdaki eksplantların en iyi gelişim gösteren dokular olduğunu saptamışlardır.

Brugaletta ve ark (2009) çalışmalarında Fas, İtalya, İspanya ve Portekiz'den topladıkları bir yaşındaki bitkilerin apikal ve koltuk tomurcuklarını kullanmışlardır. 0.5 mg/L BA içeren ve farklı dozlarda makro besin maddeleri ihtiva eden MS ve ½ MS ortamlarını kullanarak apikal ve tomurcuk kültürü yapmışlardır. Çalışmalar neticesinde 0.5 mg/L BA içeren yarı kuvvette MS ortamının en iyi sonuçları gösterdiğini belirtmişlerdir. Yapılan gözlemler sonucunda çeşit, materyallerin toplandığı mevsim ve ekolojik stres faktörlerinin gelişmeye doğrudan etki ettiğini saptamışlardır.

Hakim ve ark (2010) keçiboynuzunda klonal çoğaltım amacıyla, keçiboynuzunun olgunlaşmış tohumlarını hormonsuz MS ortamında çimlendirmişlerdir. *In vitro* da gelişen fidelerin koltuk sürgünlerini kullanarak, farklı oranlarda IAA ve GA₃ ile BA kombinasyonlarında eksplantları kültüre almışlardır. Yapılan gözlemler sonucunda ideal besi ortamının; 1.5 mg/L BA, 0.5 mg/L GA₃ ve IBA farklı kombinasyonları olduğunu rapor etmişlerdir. 0.5 mg/L IBA içeren yarı kuvvette MS ortamında köklenen bitkilerin dış koşullarda %70'nin hayatta kaldığını belirtmişlerdir.

Naghmouchi ve ark (2012) keçiboynuzunda apeks kültürü ile mikroçoğaltım çalışması gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar keçiboynuzu mikroçoğaltımı için bir protokol hazırlanmak amacıyla farklı büyüme düzenleyicileri ve farklı oranda besin ortamı içeren besi yerlerinde eksplantları kültüre almışlardır. En iyi sonuçlar tomurcuklar şişmeye başladığı dönemdeki meristem kültüründen elde edildiğini belirtmişlerdir. En iyi sürgün gelişiminin 2 mg/L BAP ve 2 mg/L 2,4-D kombinasyonu içeren yarı kuvvette MS ortamında, en iyi köklenmenin ise 4 mg/L NAA içeren besi ortamından elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Radi ve ark (2013) yaptıkları çalışmada, büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının Fas'ta bulunan yerel keçiboynuzu çeşidinin çoğalma ve köklenmeye olan etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada eksplant olarak keçiboynuzu sürgünlerinin boğum aralarını kullanmışlardır. En iyi sürgün gelişiminin 2 mg/L zeatin ve 2 mg/L BAP kombinasyonu içeren MS ortamından elde edildiğini belirtmişlerdir. Optimum oksin konsantrasyonlarının 0.5 mg/L IBA, NAA, IAA olduğunu saptamışlardır. *In vitro* koşullarda en iyi köklenme 2 mg/L IBA içeren yarı kuvvette MS ortamında görüldüğünü belirtmişlerdir.

Çürük ve ark (2017), yaptıkları çalışmada farklı besin ortamlarının (WPM ve MS) ve bitki büyüme düzenleyicilerinin keçiboynuzunda kallus oluşumuna etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada keçiboynuzunun kotiledon ve hipokotil kısımlarını kültüre alarak kallus gelişimini incelemişlerdir. Yüksek oranda kallus gelişiminin görüldüğü çalışmada kallus indüksiyonu için en iyi sonuçların WPM besin ortamından elde edildiğini belirtmişlerdir. Kallus indüksiyonunda, hipokotil eksplantlarının kotiledon eksplantlarından daha iyi gelişim gösterdiğini tespit etmişlerdir.

2.2. GDS ile Yürütülen Çalışmalar

Escalant ve ark (1994) muzda geçici daldırma biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım çalışmalarını gerçekleştirmiş ve buradan elde edilen sonuçlarla,

muzda agar kullanılarak hazırlanan katı besin ortamında yapılan mikroçoğaltım deneme sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde kültüre alınan eksplantlarda 2 ay sonra oluşan somatik embriyoların sayısı 1375 adet olduğu kaydedilirken, agar içeren katı ortamdaki embriyo sayısının 450 olduğunu saptamışlardır. Sonuç olarak biyoreaktör uygulaması ile yapılan mikroçoğaltımda bitki oluşum yüzdesi, agarlı ortamda gerçekleştirilen mikroçoğaltımdaki bitki oluşum yüzdesinden 3,05 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada 6 ay sonunda yarı katı besin ortamında yapılan mikroçoğaltımla elde edilen sonuçlara kıyasla geçici daldırma biyoreaktör sisteminde yapılan mikroçoğaltımda % 60-70 oranında daha fazla somatik embriyonun üretildiğini rapor etmişlerdir.

RITA geçici daldırma sistemi kullanılarak *Citrus deliciosa* Ten. bitkisinde somatik embriyoların elde edilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, katı, sıvı ve reaktör kültür ortamları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, Cabasson ve ark (1997) zayıf gelişen embriyoların daha iyi gelişme göstermeleri için katı kültür, süspansiyon ve geçici daldırma sistemlerinin bitki rejenerasyonuna etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada katı kültürde somatik embriyoların %60'ı kotiledon aşamasına kadar gelişmesine rağmen bitkilerde camlaşma görüldüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca süspansiyon kültüründe somatik embriyoların gelişiminin globuler safhada durduğunu tespit etmişlerdir. Buna karşın geçici daldırma sisteminin somatik embriyo gelişimini teşvik ettiğini ve somatik embriyoların %66'sının kotiledon safhasına ulaşarak morfolojik yapıda nuseller embriyolarla aynı oranda gelişim gösterdiğini belirtmişlerdir.

Welander ve ark (2014), yaptıkları çalışmada geçici daldırma sistemi ile klasik katı kültür ortamlarının *Digitalis lutea x purpurea*, *Echinacea purpurea* ve *Rubus idaeus* türlerinin mikroçoğaltımına etkilerini araştırmışlardır. Katı kültür ortamında elde ettikleri sonuçlar göz önüne alındığında çoğalma oranı ve bitkicik kalitesi, geçici daldırma sisteminde gelişen bitkilerle ya aynı ya da agarlı ortamdaki bitkilerden daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. *Digitalis lutea x purpurea* ve *Rubus*

idaeus'un mikroçoğaltımında her iki tekniğinde kardeş sayısı benzer sonuç verirken, *Echinacea purpurea*'da kardeş sayısı ve kalitesinin geçici daldırma sisteminde daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir. *Digitalis lutea x purpurea* ve *Echinacea purpurea* türlerinde yaş ağırlık geçici daldırma sisteminde daha yüksek oranda elde edilirken, *Rubus idaeus* türü için katı kültür ortamında daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Kuru ağırlığın her iki kültür ortamında üç genotip içinde benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Yaptıkları bu çalışma ile Plantform biyoreaktör sistemlerinin bitki mikroçoğaltımında kullanımının uygun olduğunu ortaya koymuşlardır.

Gatti ve ark (2015), yaptıkları çalışmada *Quercus robur* bitkisinin mikroçoğaltımında klasik doku kültürü ve Plantform biyoreaktör sistemini karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Çalışmada eksplant olarak nodal segmentleri kullanmışlardır. Katı kültür mikroçoğaltım ortamlarında 20.0 g/L sukroz, 6 g/L agar ve 0.2 mg/L BA ihtiva eden WPM ortamlarını kullanmışlardır. Plantform için 8 saatte bir 12 dakika ve 16 saatte bir 8 dakika olarak eskplantları sıvı besin ortamına daldırılarak kültüre almışlardır. Havalandırma süresi ise 4 saatte bir 15 dakika olarak ayarlamışlardır. Çalışma neticesinde Plantform biyoreaktör sisteminde kültüre alınan eksplantlardan gelişim gösteren bitkiciklerin yaş ağırlık ortalamalarının, katı kültürden elde edilenlere göre daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma ile Plantform biyoreaktör sisteminin *Quercus robur* bitkisi için hızlı ve etkili bir metod olduğunu rapor etmişlerdir.

Kokotkiewicz ve ark (2015) yaptıkları çalışmada ticari öneme sahip Güney Afrika Baklagili *Cyclopia genistoides*'den fenolik sekonder metabolit elde edilmesi amacıyla farklı biyoreaktör tiplerinde [membranerafts (MR) ve GDS] bitkiyi sıvı ortamda kültüre almışlardır. Tıbbi öneme sahip sekonder metabolitlerin en yüksek konsantrasyonun geçici daldırma sisteminden elde edildiğini belirtmişlerdir.

Lambardi ve ark (2015), yaptıkları çalışmada her dem yeşil birer süs bitkisi olan *Chrysanthemum morifolium*, *Carex oshimensis* ve meyve türlerinden *Ficus carica* ve *Ribes rubrum* bitkilerinde geçici daldırma sistemi Plantform ile sürgün

ucu kültürü konusunda araştırmalar yapmışlardır. Çalışmalarında Plantform sistemi ile daha yüksek kalitede bitkiler elde ettikleri belirtilirken, bazı bitkilerin direkt olarak köklenme gösterdikleri ve bu sayede doğrudan dış koşullara adaptasyonunun mümkün olduğunu saptamışlardır.

Tıbbi ve aromatik bitkiler grubunda yer alan *Stevia rebaudiana*, içerdiği doğal tatlandırıcı bileşenler sayesinde pancar şekerine alternatif bir çözüm olacağı düşüncesiyle her geçen gün önem kazanan bir bitki türüdür. Sacco ve ark (2015), yaptıkları çalışmada bu tür için etkili bir mikroçoğaltım protokolü geliştirmek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Çalışmada yeni nesil biyoreaktör sistemleri olan RITA ve Plantform biyoreaktör sistemleri ile katı kültür ortamlarının *Stevia rebaudiana*'nın mikroçoğaltımına etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada 2 farklı biyoreaktör sisteminde hormonsuz MS besin ortamı, BA (0.3 mg/L) içeren MS besin ortamı ve IAA (0.5 mg/L) içeren MS ortamlarında eksplantları kültüre almışlardır. Sıvı ortamlarda çoğalma katsayısı katı ortama göre daha yüksek bulunurken, BAP'nin eksplant başına sürgün sayısını artırıcı etkide bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalar boyunca yapılan gözlemlerde Plantform biyoreaktör sisteminde uygulanan 3 saatte bir daldırma döngüsünün, kallus ve vitrifikasyon problemlerine sebep olduğunu, bununla birlikte 8 saatte bir daldırma döngüsünün daha kaliteli sürgün oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Daungban ve ark (2017), muzda *in vitro* koşullar altında geleneksel yarı-katı besin ortamı ile geçici daldırma biyoreaktör sistemini karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde eksplantlar her 4 saatte bir 2 dk daldırılacak şekilde sistemi ayarlamışlardır. Çalışmada farklı konsantrasyonlarda TDZ (0, 0.125 ve 0.25 mg/L) ihtiva eden sıvı ve katı besin ortamlarında eksplantları kültüre almışlardır. Çalışma neticesinde en fazla sürgün oluşum oranı 11.03 ile 0.125 mg/L TDZ içeren geçici daldırma biyoreaktör sisteminden elde edildiğini belirtmişlerdir.

Gutiérrez ve ark (2016) yapmış oldukları çalışmada geçici daldırma biyoreaktör sisteminde *Guadua angustifolia* bitkisinin mikroçoğaltımında farklı

daldırma sürelerinin bitki gelişimine etkisini araştırmışlardır. Kültür kaplarına 6 ve 8 saatte bir 2 dk olmak üzere iki farklı daldırma sıklığını uygulamışlar ve denemeler sonunda 6 saatte bir 2 dk daldırma süresinin gelişmeye büyük ölçüde olumlu etkide bulunduğunu saptamışlardır.

Masnoddin ve ark (2016), klasik katı kültür ortamından elde ettikleri *Paphiopedilum rothschildianum* kalluslarından RITA geçici daldırma biyoreaktör sisteminde sürgün rejenerasyonunu incelemişlerdir. Çalışmada 125 dk'da bir 5 dk daldırma yapılarak kallusları kültüre almışlardır. Çalışmaya ek olarak farklı oranda sakkaroz konsantrasyonunun (15 ve 58 mM) sürgün oluşumuna etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, 58 mM sakkaroz miktarında 1 g kallus başına düşen sürgün gelişiminin 190 adet/g olduğunu tespit etmişlerdir.

Meiping ve ark (2016), yapmış oldukları çalışmada, *Sagittaria sagittifolia* bitkisinin mikroçoğaltımında yeni bir protokol geliştirmek amacıyla geçici daldırma biyoreaktör sisteminde eksplantları kültüre almışlardır. Çalışmada farklı bitki büyüme düzenleyici, altkültür sayısı, daldırma sıklığı ve inokülasyon yoğunluğunun mikroçoğaltıma etkisini incelemişlerdir. Geçici daldırma sisteminde gelişen bitkilerin oldukça iyi bir morfolojik yapıya sahip olduklarını belirtmişlerdir. 3.0 mg/L BAP + 0.01 mg/L NAA içeren besin ortamlarında en yüksek çoğalma katsayısının 5. altkültürde elde edildiğini rapor etmişlerdir. Geçici daldırma sisteminde kullanılan kültür kaplarında her litre için 10 bitki konulmasının ve 3 saatte bir 10 dk daldırma döngüsü uygulamasının *Sagittaria sagittifolia* mikroçoğaltımında oldukça başarılı olduğunu belirtmişlerdir.

Mersin bitkisi (*Myrtus communis* L.) ile yapılan bir çalışmada Biçen ve ark (2017), geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile katı kültür ortamlarının türün mikroçoğaltımına etkisini araştırmışlardır. Çalışmada iki adet mersin genotipi kullanmışlardır. Mikroçoğaltım çalışmalarında, Plantform ve katı kültür sistemleri için 1.0 mg/L BAP içeren besin ortamları, köklendirmede ise 1.0 mg/L IBA içeren besin ortamlarında eksplantları kültüre almışlardır. Çalışmada daldırma sıklığının etkisini araştırmak amacıyla geçici daldırma biyoreaktör sisteminde 4 ve 8 saat

olmak üzere iki farklı daldırma süresi sıklığının mikroçoğaltıma etkisini incelemişler ve katı besin ortamlarından elde edilen mikroçoğaltım sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Çalışma neticesinde Plantform sisteminde gelişen bitkilerin katı kültürlerle göre açık bir şekilde daha başarılı olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminin, klasik *in vitro* mikroçoğaltım ve köklenme sistemine göre daha az maliyetli, daha az işçilik gerektirdiği ve daha kısa zamanda daha fazla miktarda çoğaltımın yapılabileceğini belirlemişlerdir.

Frómota ve ark (2017), gerbera (*Gerbera spp.*) bitkisini geçici daldırma sisteminde çoğaltmaya yönelik yaptıkları çalışmada, daldırma sıklığı (6, 8 ve 12 saat) ve kültür süresi (14, 21, 28 ve 35 gün) faktörlerinin çoğaltma katsayısına etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, 8 saatte bir daldırma uygulanan bitkilerde sürgünlerin kontrol grubuna göre daha iyi bir morfolojiye sahip olduklarını belirtmişlerdir. Buna karşın, 6 saatte bir daldırma uygulanan grupta yaş ve kuru ağırlık miktarlarının daha yüksek oranda elde edildiğini saptamışlardır.

Szopa ve ark (2017), *Schisandra chinensis*'te yapmış oldukları çalışmada, bitkinin sürgün uçlarını, RITA ve Plantform olmak üzere iki farklı biyoreaktörde kültüre almışlardır. Besin ortamı olarak; 3 mg/L BA ve 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamı kullanmışlardır. Sürgünlerde büyüme ve lignin içeriğini (bitkisel-östrojen) LC-DAD ve LC-DAD-ESI-MS ile değerlendirmişler, test edilen biyoreaktörlerden Plantform lignin içeriği (546.98 mg/100g kuru ağırlık) ve büyüme bakımından daha iyi sonuçlar verdiğini tespit etmişlerdir.

Zhang ve ark (2017), *in vitro* koşullarda geçici daldırma sistemi ile *Bletilla striata* bitkisinin gelişme ve yalancı yumru oluşumunu incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, daldırma sıklığının ve sakkaroz miktarındaki değişimlerin bitki rejenerasyonuna etkilerini araştırmışlardır. Yalancı yumru oluşumunda en iyi sonuçların 2 saatte bir 3 dk daldırma döngüsünden elde edilirken, en iyi bitki gelişimin 6 saatte bir 3 dk daldırma döngüsünden elde edildiğini belirtmişlerdir. Yalancı yumru oluşumunda ve bitki gelişiminde, sakkaroz miktarı bakımından en

iyi sonuçların sıvı besin ortamına eklenen 40 g/L sakkaroz konsantrasyonundan elde edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca kültür kaplarına 300 eksplant konulduğunda sap çapı, yaprak genişliği ve bitki boyu açısından bitkiciklerde belirgin bir gelişme görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Benelli ve ark (2018), zeytinde (*Olea europaea* L.) Plantform geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile katı kültür ortamlarının mikroçoğaltıma etkilerini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, 16 saatte 8 dakikalık daldırma periyodunda elde edilen bitkiciklerin katı kültürde elde edilenlere göre oldukça iyi bir morfolojik yapıya sahip olduklarını ve adaptasyon yeteneklerinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Sürgün uzunluğu, yaprak yapısı ve canlılık gibi kriterlerin göz önüne alındığı çalışmada, 5 ve 10 µM zeatin içeren ortamlarda sürgün uzunluğunda önemli bir farklılığın olmadığını, zeatin miktarının azaltılmasının mikroçoğaltımda önemli bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak zeytin üretim maliyetlerinin azaltılması konusunda *in vitro* koşullar altında Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminin uygun olduğunu tavsiye etmişlerdir.

Cengiz, (2018), iki farklı turunçgil anacı ile Plantform biyoreaktör sistemi ve katı kültür ortamlarında karşılaştırmalı olarak mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmalarını yürütmüşlerdir. Çalışmada katı kültür mikroçoğaltım denemeleri için MS ve WPM besin ortamlarında BA, Kinetin ve 2İP bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları ve katı kültür köklendirme denemeleri için MS, ½ MS ve WPM besin ortamlarında IBA ve NAA büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarını rejenerasyon için kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada katı kültürde elde edilen optimum besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri referans alınarak Plantform biyoreaktör sisteminde bitkileri kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda Plantform sisteminde kültüre alınan bitkilerin katı ortama göre daha yüksek oranda kardeş ve kök gelişimi gösterdiğini belirtmişlerdir.

3. MATERYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Tez çalışması kapsamında Adana ve çevresinde doğal olarak yetişen ve ticari öneme sahip olan, yüksek verimli ve yüksek oranda çiçek tozu oluşturan Kıbrıs ve Monoik adlı genotipler, Adana'nın Kozan ilçesinde bulunan ticari bir işletmeden temin edilmiştir. Kıbrıs genotipi, sofralık olarak taze tüketimde, pekmez ve un yapımında ve hayvan yemi rasyonlarında kullanılan, üzerinde sadece dişi çiçek bulunduran, uygun olmayan toprak koşullarında iyi gelişme gösteren bir genotiptir (Şekil 3.1). Bu genotipe ait dört yaşındaki bir ağaçtan ortalama 32 kg ürün elde edildiği belirtilmiştir.

Ticari olarak öneme sahip diğer genotip ise endüstriyel amaç için tercih edilen Monoik genotipidir. Elverişsiz topraklarda güçlü bir kök gelişimi gösterebilen, üzerinde hem dişi hem erkek çiçekleri bulunduran, bahçe plantasyonları için tozlayıcı olarak da kullanılma potansiyeline sahip olan bir genotiptir (Şekil 3.2). Genotip, meyvelerinde fazla tohum oluşturma yeteneğine sahiptir. Her bir meyve içersinde 12-17 adet tohum oluşturur. Bu nedenle endüstriyel amaçlı hammadde olarak kullanılan tohumları için tercih edilmektedir.



Şekil 3.1. Kıbrıs genotipinin morfolojik yapısı.

- A: Kıbrıs genotipine ait 5 yaşındaki meyve ağacı.
- B: Genotipe ait meyveler
- C: Genotipe ait sürgünlerin görünümü
- D: Genotipe ait birleşik yaprak yapısı



Şekil 3.2. Monoik genotipinin morfolojik yapısı.

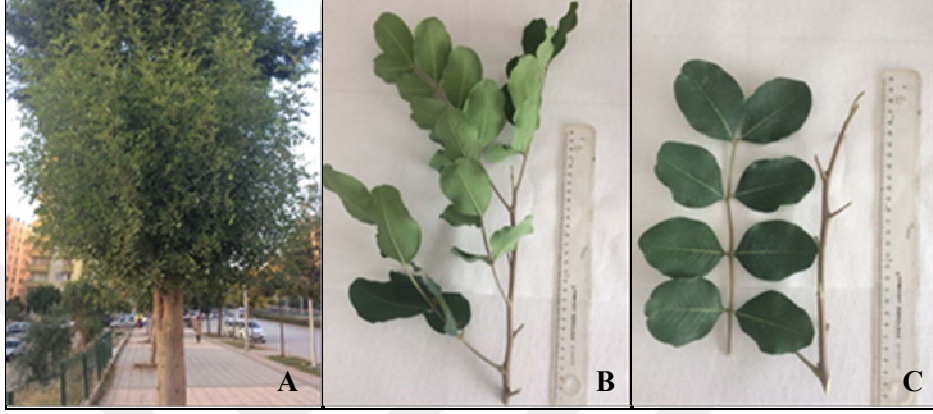
A: Monoik genotipine ait 5 yaşındaki meyve ağacı.

B: Genotipe ait meyveler

C: Genotipe ait sürgünlerin görünümü

D: Genotipe ait birleşik yaprak yapısı

Ayrıca Adana ili içerisinde peyzaj amaçlı kullanılan Adana genotipinin sürgün uçları ve internodları bitkisel materyal olarak kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Adana genotipinin morfolojik yapısı

A: Adana genotipine ait 10 yaşındaki meyve ağacı.

B: Genotipe ait sürgünlerin görünümü

C: Genotipe ait birleşik yaprak yapısı

3.2. Metod

3.2.1. Bitkisel Materyalin Temin Edilmesi

Çalışmada kullanılan keçiboynuzu genotipleri arazi koşullarında sürgün uçları ve internodları bahçe makasıyla kesilerek nemlendirilmiş filtre kağıtlarına sarılarak laboratuvara getirilmek üzere soğutucuda saklanmıştır. Bitkinin sürgün uçları ve yaprak koltuklarındaki tomurcuklar eksplant olarak kullanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Bitkisel materyallere ait sürgünler
A: Kıbrıs genotipine ait sürgünler
B: Monoik genotipine ait sürgünler

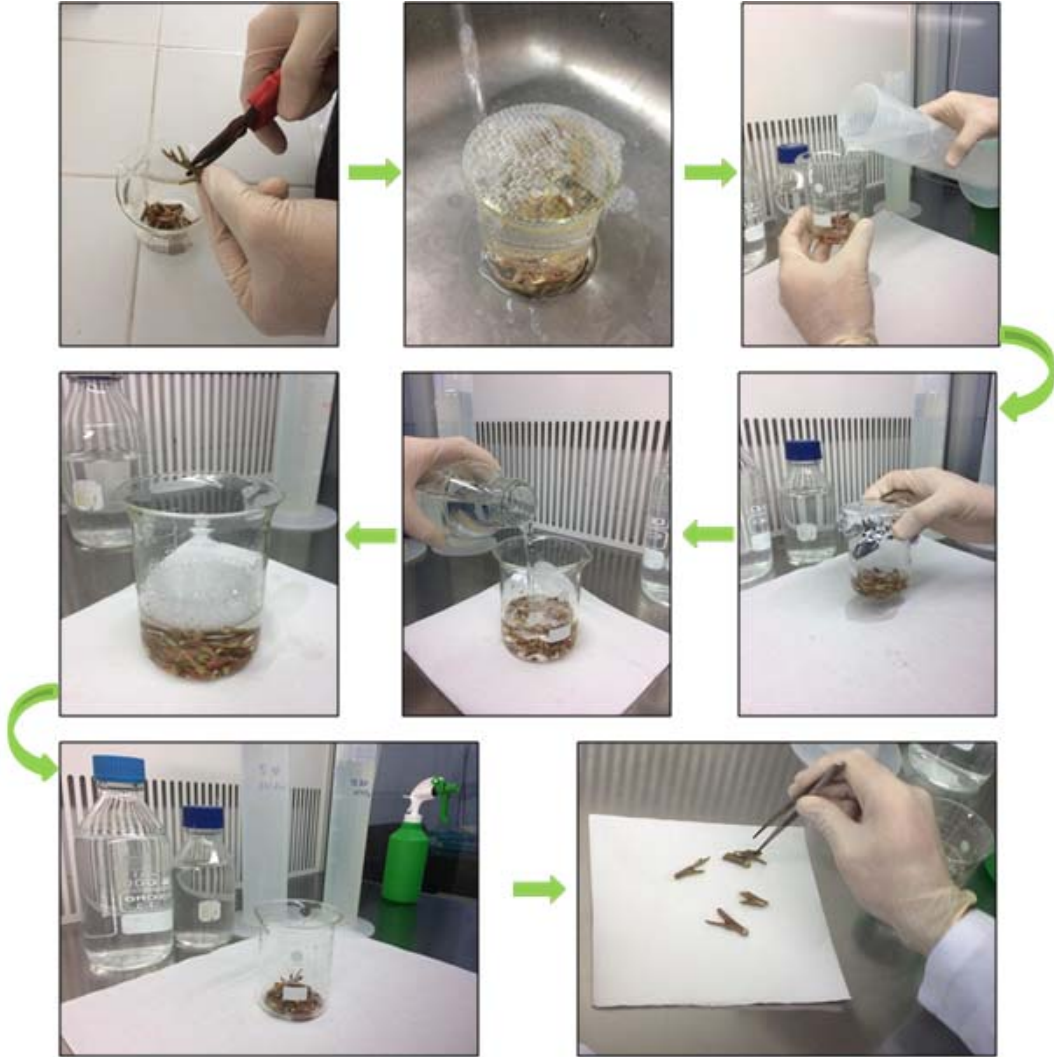
3.2.2. Bitkisel Materyalin Kültüre Alınması

3.2.2.1. Sterilizasyon Protokolünün Optimizasyonu

Çalışmada kullanılan bitkisel materyalin başarılı bir sterilizasyonu için farklı sterilantlar kullanılarak optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda en uygun sterilizasyon protokolü belirlenerek çalışmalar sürdürülmüştür.

Eksplant canlılığının ve sterilizasyon etkinliğinin en iyi olduğu protokole göre; çalışmada kullanılan sürgün uçları ve internodlar 2 cm uzunluğunda kesilerek çeşme suyu altında 30 dk boyunca yüzeyde bulunan partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla yıkanmıştır. Daha sonra steril kabin içerisinde %70 oranında etil alkol çözeltisinde 3 dk bekletildikten sonra %0.3'lük cıva klorür ($HgCl_2$) çözeltisi içerisinde 10 dk bekletilmiş ve sonrasında %20 oranında sodyum hipoklorit ($NaClO$) içeren solüsyonda 20 dk süre boyunca bekletilerek yüzey sterilizasyonu

gerçekleştirilmiştir. Eksplantlar köpük gidene kadar steril saf su ile durulanıp steril filtre kağıdında kurulandıktan sonra kültür kaplarına transfer edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Esplantların steril kabin içerisinde sterilizasyonu

3.2.3. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemelerinin Kurulması

Tez çalışması kapsamında ilk olarak Kıbrıs ve Monoik olarak adlandırılan genotipler ile çalışmalara başlanmıştır. Adana genotipi tez çalışmasına daha sonra eklenmiştir. Katı kültür mikroçoğaltım denemeleri için iki farklı yöntem izlenmiştir.

3.2.3.1. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri I

Genotiplere ait sürgün uçları ve internodlar, *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım denemelerini kurmak amacıyla MS, ½ MS ve WPM besin ortamlarında kültüre alınmıştır. MS ve WPM besin ortamı içeriği Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2’de verilmiştir. Mikroçoğaltım denemelerinde bitki büyüme düzenleyicilerinden BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L), 2,4-D (0, 0.5, 1.0 mg/L)’nin kombinasyonları uygulanmış ve başlangıç bitkileri için içerisinde 15 ml besi yeri içeren tüplerde eksplantlar kültüre alınmıştır. BA ve 2,4-D’nin farklı konsantrasyonlarının kullanılma sebebi yapılan literatür taraması sonucuna göre karar verilmiştir (Naghmouchi ve ark, 2012). Mikroçoğaltım denemesi için uygulanan ortam içeriği Çizelge3.3’de gösterilmiştir. Birinci altkültürden itibaren mikroçoğaltım denemeleri, içerisinde 50 ml besi yeri bulunan kavanozlarda kültüre alınmıştır. Besin ortamlarının içerisine 30 g/L sükroz ve 7.5 g/L agar ilave edilmiştir. Ayrıca ortam içerisine kontaminasyon riskine karşı 1mg/L oranda PPM eklenmiştir. Ortamların pH’sı 5.8 olarak ayarlanmıştır. Deneme süresince bitkicikler, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 25°C sıcaklık altında iklim odalarında kültüre alınmıştır. Bitkicikler dört haftada bir ve toplamda 3 kez altkültüre alınmıştır.

Çizelge 3.1. MS Besin ortamı içeriği

Bileşik	Konsantrasyon(mg/L)
Makro Elementler	(MS, 1962)
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
Mikro Elementler	(MS, 1962)
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	15.6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
KI	0.83
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Organik Bileşikler	(MS, 1962)
Sakkaroz	30-50 g
Myo-inositol	100
Nikotinic asit	0.5
Piridoksin HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Glisin	2

Çizelge 3.2. WPM Besin ortamının içeriği

Bileşik	Konsantrasyon (mg/L)
NH ₄ NO ₃	400
CaCl ₂ .2H ₂ O	96
Ca(NO ₃) ₂	386.34
MgSO ₄	180.69
KH ₂ PO ₄	17
K ₂ SO ₄	990
MnSO ₄ .H ₂ O	22.3
H ₃ BO ₃	6.2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
Vitamin	Konsantrasyon
Myo-inositol	100
Nikotinkasit	1
Piridoksin HCl	0.5
Thiamine HCl	0.5
Glisin	2

Çizelge 3.3. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri I'de mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılan besi ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonları.

Besin Ortamı	BA(mg/L)	2,4-D (mg/L)
MS, 1/2 MS, WPM	0	0.0
		0.5
		1.0
	0.5	0.5
		1.0
	1	0.5
		1.0
	1.5	0.5
		1.0
	2	0.5
		1.0

3.2.3.2. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri II

Tez çalışması kapsamında katı kültür mikroçoğaltımının optimizasyonu için gerçekleştirilen I. deneme sonucunda literatürde belirtilenin aksine yoğun bir kallus oluşumu gözlemlendiği için II. bir katı kültür mikroçoğaltım denemesi yürütülmüştür. I. denemede kullanılan Kıbrıs ve Monoik genotiplerine ek olarak Adana genotipi de çalışmaya dahil edilmiştir. I. denemede olduğu gibi besin ortamı olarak, MS, 1/2 MS ve WPM besin ortamları kullanılmıştır. II. mikroçoğaltım denemelerinde bitki büyüme düzenleyicilerinden BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L), GA₃ (0.1, 0.5 mg/L)'nin kombinasyonları uygulanmış ve kültüre alma işlemleri ilk deneme de olduğu gibi yürütülmüştür. Mikroçoğaltım denemesi için uygulanan ortam içeriği Çizelge3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri II'de mikroçoğaltım çalışmalarında kullanılan besi ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonları.

Besin Ortamı	BA(mg/L)	GA ₃ (mg/L)
MS, 1/2 MS, WPM	0	0.1
		0.5
	0.5	0.1
		0.5
	1	0.1
		0.5
	1.5	0.1
		0.5
	2	0.1
		0.5

3.2.4. Katı Kültür Köklendirme Denemelerinin Kurulması

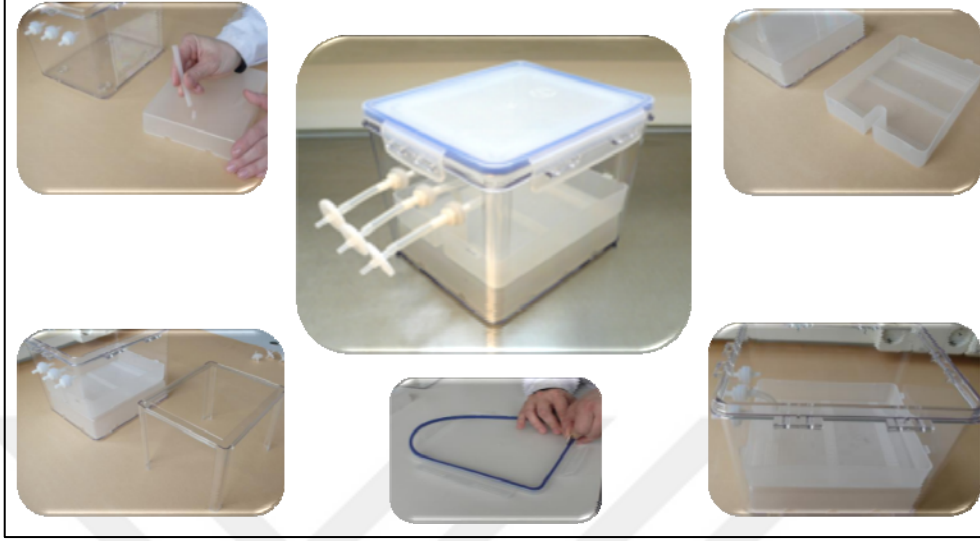
Mikroçoğaltım denemesinde elde edilen genotiplere ait homojen yapıda bitkicikler ile köklendirme denemesi kurulmuştur. Bu denemede oksin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden IBA (İndol bütirik asit) ve NAA (Naftalen asetik asit)'nin farklı konsantrasyonlarını (0, 1.0, 2.0 mg/L) içeren MS, ½MS ve WPM besin ortamları kullanılmıştır. İçerisinde 15 ml besin ortamı içeren tüplerde 20 bitki kültüre alınmıştır (Çizelge 3.5). Besin ortamlarının içerisine 30 g/L sükroz ve 7.5 g/L agar ilave edilmiştir. Ortamların pH'sı 5.8'e ayarlanmıştır. Ayrıca ortam içerisine kontaminasyon riskine karşı 1mg/L oranda PPM eklenmiştir. Köklendirme ortamlarına 15 bitki aktarılmış ve bitkicikler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık, 25°C sıcaklık koşullarında 8 hafta süre ile kültüre alınmıştır. 8 hafta sonunda kök gelişimleri incelenmiştir.

Çizelge 3.5. Köklendirme denemesinde kullanılan besin ortamları ve büyüme düzenleyici konsantrasyonları.

Besin Ortamı	Büyüme Düzenleyiciler (mg/L)	
MS, ½ MS, WPM	IBA	0
		1
		2
	NAA	0
		1
		2

3.2.5. Plantform Biyoreaktör Sistemi ile Mikroçoğaltım Denemesinin Kurulması

Katı kültür mikroçoğaltım denemesi sonucunda elde edilen optimum besin ortamı referans alınarak Plantform geçici daldırma sisteminde mikroçoğaltım denemesi kurulmuştur. Plantform geçici daldırma sistemi için hazırlanan besin ortamlarına katılaştırıcı agar ilave edilmemiştir. Plantform biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemesi için 500 ml besin ortamı hazırlanmış ve 60 bitki kültüre alınmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Bitkiciklerin kültür kaplarına transfer edilmesinden 6-8 hafta sonra altkültür işlemi 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Plantform biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemesinde kültür kaplarına ait görüntü Şekil 3.6'da sunulmuştur.



Şekil 3.6. Plantform biyoreaktör sistemi kültür kapları.

3.2.6. Plantform Biyoreaktör Sistemi ile Köklendirme Denemesinin Kurulması

Katı kültür köklendirme denemesi sonucunda çalışmada kültüre alınan her üç genotip için istenilen köklenme başarısı sağlanamamıştır. Bu nedenle Plantform biyoreaktör sisteminde köklendirme çalışmalarına yer verilmemiştir.

3.2.7. Deneme Planı, İstatistik Analizleri ve İncelenen Kriterler

Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerinin mikroçoğaltımı ve köklendirilmesi amacıyla kurulan denemelerin tamamı 3 tekerrürlü olacak şekilde, faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Keçiboynuzu genotiplerinin *in vitro* koşullarda hızlı ve klonal çoğaltımının amaçlandığı bu tezde klasik doku kültürü sistemi ile Plantform biyoreaktör sisteminin bitki kalitesi, çoğalma katsayısı ve köklenme üzerine etkileri incelenmiştir. Plantform biyoreaktör sisteminde ise bitkiler 8 haftada bir altkültüre alınmıştır. Her iki sistemde, her altkültür sonunda, kardeşlenme katsayısı (adet/bitkicik), bitki boyu (cm) ve bitkilerin genel görünümüne ait kriterler incelenmiştir. Köklenme denemelerinde; köklendirme ortamında kültüre alma işleminden 8 hafta sonra

köklenme oranı (%), bitki uzunluğu (cm), kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm) değerleri hesaplanmıştır.

Çalışmanın katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen veriler ile varyans analizleri gerçekleştirilmiştir. Önemli çıkan ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile belirlenmiştir. Ayrıca her genotip için optimum olarak belirlenen besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyici içeriğinde klasik katı kültür ve Platform sistemleri arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının tespiti bağımsız t-testi analizi ile gerçekleştirilmiştir. İstatistik analizlerde JMP 8.01 programı kullanılmıştır. Tüm istatistik analizler her genotip için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Doku Kültürü Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Bitkilerde Genetik Kararlılığın Belirlenmesi

Çalışma boyunca gerçekleştirilen katı kültür mikroçoğaltım-köklendirme ve Platform geçici daldırma biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkilerde besin ortamları ve büyüme düzenleyicilerin etkisiyle herhangi bir somaklonal varyasyon olup olmadığı başlangıç materyali ile karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, kullanılan her genotip için ayrı ayrı olmak üzere başlangıç materyalinden, katı kültür mikroçoğaltım denemesinde elde edilen bitkiciklerden, katı kültür köklendirme denemesinden elde edilen bitkilerden ve Platform biyoreaktör sistemi ile mikroçoğaltım denemeleri sonucunda çoğaltılan bitkiciklerden dört farklı dönemde yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan yaprak örnekleri -196 °C'de sıvı azota daldırılıp -80°C'de muhafaza edilmiştir. Genetik kararlılığın belirlenmesi amacıyla SSR markırları kullanılmıştır.

3.2.9. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için her genotip için 4 farklı dönemlerde alınan bitkisel materyallere ait yapraklar 2 ml'lik eppendorf tüplere yerleştirilmiş ve sıvı azota

daldırılarak Tissue-Lyser cihazı (Invitrogen-GT) ile öğütülmüştür. Çalışmada yaprak örneklerinin öğütülmesine ait görüntü Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7. Bitkisel materyale ait yaprak örneklerinin Tissue-Lyser cihazında öğütülmesi.

3.2.10. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

Bu çalışmada bitkisel materyallerin DNA izolasyonunda MiniPrep DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır (Dellaporta ve ark, 1983). DNA izolasyonu aşamasında kullanılan tampon çözeltinin içeriği Çizelge 3.6’de gösterilmiştir. İzolasyon sırasında ekstraksiyon tampon çözeltiler dışında kloroform: izoamilalkol (24:1 oranında), Tris-EDTA (Tris 1 M pH:8, EDTA: 0.5 M pH:8), izopropanol ve etil alkol (%99) kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. DNA izolasyon yönteminde kullanılan tampon çözeltisinin içeriği

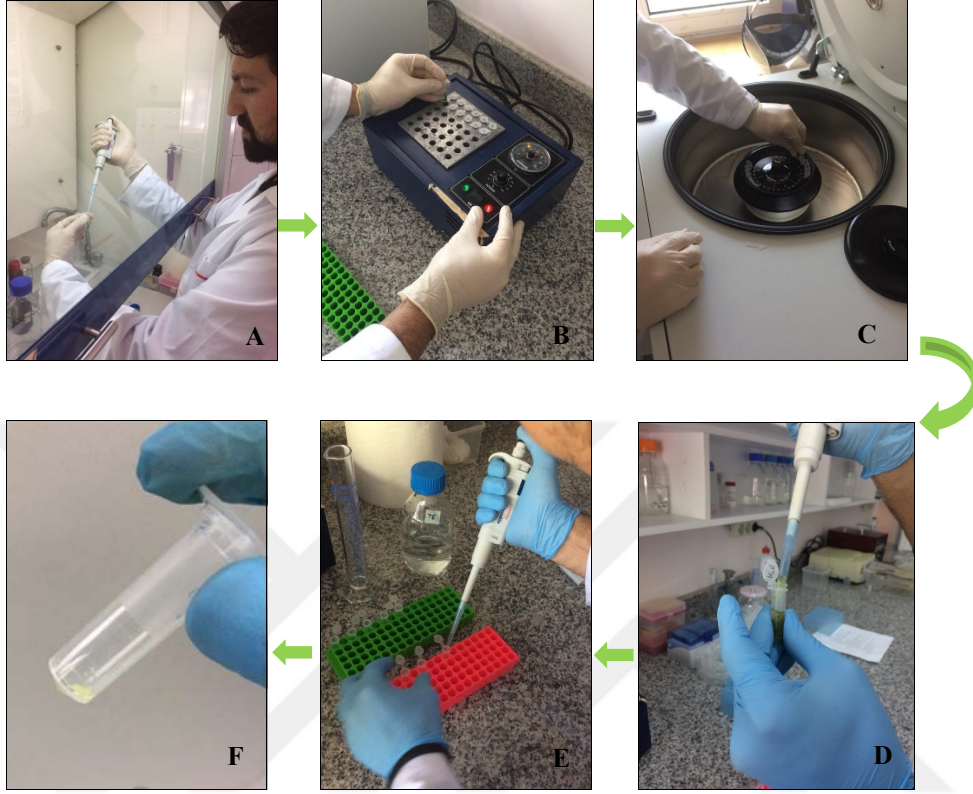
Solüsyon	Konsantrasyon
CTAB	%2,0
NaCl (5 M)	1,4 M
EDTA (0,5 M) pH 8,0	0,2 M
TRIS-HCl (1 M) pH 8,0	0,1 M

3.2.11. DNA İzolasyon Aşamaları

Hazırlanan ekstraksiyon solüsyonundan her tüpe 396µl ve 4µl β-merkaptotanol eklenmiştir.

- ✓ Bir pipet aracılığıyla tüpler homojenlik sağlanana kadar karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 65°C’de 20 dk bekletilip ve iki defa karıştırılmıştır.
- ✓ Her tüpe 400 µl kloroform: izoamilalkol eklenmiş ve 15 dk karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.
- ✓ Tüpler 5 dk 13 000 devirde santrifüj edilmiştir. Bekleme sırasında her örnek için yeni temiz bir santrifüj tüpü hazırlanıp etiketlenmiş ve her birinin içine 400 µl soğuk (-20°C) izopropanol eklenmiştir.
- ✓ Santrifüj tamamlandığında tüplerin üst kısmındaki sıvı kısım steril pipet aracılığıyla 400 µl soğuk (-20°C) izopropanol içeren santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle –20°C’de bekletilmiştir.
- ✓ Bir saatin ardından tüpler 5 dk 13 000 devirde santrifüj edilmiştir.
- ✓ Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüş, pelletin kuruması için tüpler ters bırakılıp bekletilmiştir.
- ✓ Kuruyan Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözdürülecektir.
- ✓ Her tüpe 500 µl soğuk EtOH (%100) (buzluktan çıkmış) eklenmiş ve tüpler dikkatli bir şekilde karıştırılarak 1 saat süreyle –20°C’de bekletilmiştir.
- ✓ 5 dakika 13 000 devirde santrifüj edilmiştir.
- ✓ Süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüş ve pelletin kuruması için tüpler ters çevirilmiştir (yaklaşık 10 dk).
- ✓ Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür.
- ✓ Örnekler –20°C’de saklanmıştır.

DNA izolasyonu aşamalarına ait görüntüler Şekil 3.8’de verilmiştir.

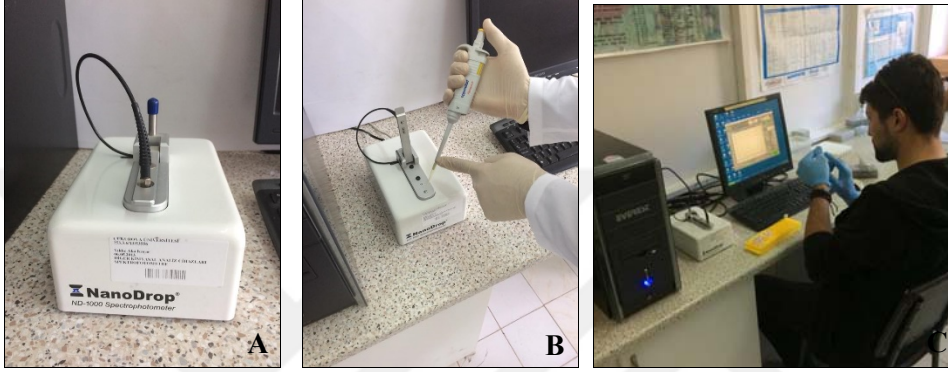


Şekil 3.8. DNA izolasyon aşamaları

- A: Çekercok'ta tüplere Kloroform:izoamilalkol eklenmesi
- B: Tüplerin 65°C'de 20 dk inkübasyonu
- C: Tüplerin santrifüj edilmesi
- D: Süpernatant'ın alınması
- E: Süpernatant'ın yeni tüplere aktarılması
- F: İzole edilmiş DNA pelleti

3.2.12. DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'ların kalitesi ve miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop ND 100) ölçümler yapılarak belirlenmiş olup Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.9. DNA kalite ve kantitesinin ölçülmesi.

A: Nanodrop cihazı.

B: DNA miktarının ölçülmesi.

C: DNA miktar ve kalitesinin görüntülenmesi.

3.2.13. SSR- PCR Koşulları

Bitkisel materyallere ait DNA'lar ve sentetik olarak tasarlanan SSR primerleri ile PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan PCR protokol ve PCR döngü koşulları aşağıda belirtilmiştir. PCR Reaksiyon Koşulları: Toplam hacim 20 μ l olacak şekilde Çizelge 3.7'de verilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

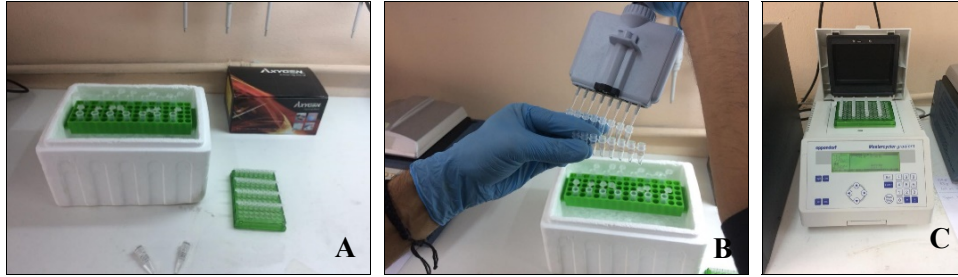
Çizelge 3.7. PCR koşullarının içeriği

Kullanılan Kimyasallar	Her örnek için kullanılan miktar (µl)
ddH ₂ O	5,00
PCR Master Mix 2X	8,00
MgCl ₂	0,50
M13 primer (Forward&Reverse)	0,50
F + R primer	1,00
DNA (5ng)	5,00
Tag DNA polimeraz	0,05
Toplam Hacim	20

PCR Döngü Programı;

95°C 5dk	ön “ <i>denaturation</i> ”	} 35 döngü
95°C 1dk	DNA’nın çift iplikçığının ayrılması “ <i>denaturation</i> ”	
55°C 30sn	primer bağlanması “ <i>annealing</i> ”	
72°C 1dk	yeni iplikçığın yazılımı “ <i>extension</i> ”	
72°C 6 dk	son yazılım	
4°C ∞		

PCR çalışmalarına ait görüntüler Şekil 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.10. PCR çalışmalarına ait görüntüler

- A: Reaksiyon için gerekli malzemelerin hazırlanması
- B: Reaksiyon için gerekli kimyasalların tüpe aktarımı
- C: Tüplerin PCR cihazına yerleştirilmesi

3.2.14. SSR Analizleri

Tez çalışmasında PCR reaksiyonu için keçiboynuzu genotiplerinde kullanılan toplam 9 farklı SSR primeri kullanılmıştır (La Malfa ve ark, 2014). SSR primerlerine ait bilgiler Çizelge 3.8’de sunulmuştur.

Çizelge 3.8. SSR Analizinde Kullanılan Primer Listesi

No	Primer	Primer Dizimi (5'-3')	Tekrar Motifi
1	Cesi_21_ctt7	F: GGGGAAAACAACCAATATAGTTA	(CTTT)7
		R: AGGAGATCGAGCGTATGCAG	
2	Cesi_187_at15	F: ATACTGGGCGTTCTTTGCTT	(AT)15
		R: ATTATCTCTTGCTTTGTGGTCCT	
3	Cesi_1187_at9	F: TTCTCGTCGCCAAACTG	(AT)9
		R: CTCCTCATCTCCTTCGTTG	
4	Cesi_509_ga12	F: GCCACCTCTCCCTCTTCTC	(GA)12
		R: TTTTGTTCTAATTTTGCTTGCA	
5	Cesi_98_gct6	F: GCCACCACTTTGAAGGAAGA	(GCT)6
		R: GCTAGAAGCAGGAGCAGGAG	
6	Cesi_15_aaatag4	F: GACGGTGGAAGGCAACCT	(AAATAG)4
		R: GCTCGCTTGGGGAGTGTA	
7	Cesi_976_ta5tg6	F: TCCTGAAGGCTGAAGATGATG	(TA)5(TG)6
		R: CAAACCAATGAAGGGCTCTA	
8	Cesi_74_ta7	F: AACGCAAACCTCAGCATCAT	(TA)7
		R: AAGGCAAGTGGGAGACACAC	
9	Cesi_17_tta7	F: AAATGCAACAAAGATGACACG	(TTA)7
		R: GAAGAAAGCTCGGCCTCTG	

3.2.15. Li-Cor için Poliakrilamid Jel Hazırlığı

PCR ürünlerini görüntülenmek amacıyla %6.5 poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Poliakrilamid jelin hazırlanmasında kullanılan kimyasalların listesi ve miktarları Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Poliakrilamid jel için kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Miktar
Üre	8.4 g
%50 LongRangerAkrilamide	2.4 ml
10X TBE Buffer	2.0 ml
TEMED	15 µl
Amonyum Persulfat (APS-%10)	150 µl

3.2.16. Li-Cor Elektroforez Koşulları

Jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra aparat Li-Cor Elektroforez cihazına yerleştirilmiştir. Poliakrilamid jelin hazırlanması ve aparatın Li-Cor Elektroforez cihazına yerleştirilmesine ait görüntüler Şekil 3.11'de verilmiştir. Cihazda çalışma değerleri; 1000 V, 35 mA, 25 W 45°C'de yaklaşık 30 dk. ön ısıtma yapılarak ardından eşit miktarda formamide yükleme solüsyonu eklenmiş ve PCR'da 95°C'de 4 dk denatüre edilerek örneklerden 1 µl jele pipet yardımıyla yüklenmiştir. Daha sonra cihaz çalışma şartları olan 1500 V, 35 mA, 50 W 48°C'de 1.5 saat koşturulmuştur.



Şekil 3.11. Poliakrilamid jel hazırlanması ve Li-Cor elektroforez cihazının görüntüsü.

A: Aparatın hazırlanması.

B: PCR ürünlerinin jele yüklenmesi.

C: Aparatın Li-Cor elektroforez cihazındaki görüntüsü.

3.2.17. Moleküler Çalışmaların Sonuçlarının Değerlendirilmesi

SSR markırları ile yapılan moleküler analizler sonucunda başlangıç materyalinin DNA profili ile çalışma boyunca temin edilen katı kültür mikroçoğaltım, katı kültür kök ve Plantform mikroçoğaltım bitkilerinden elde edilen DNA profilleri ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, verim ve kalite açısından iyi özelliklere sahip ticari çeşit adayı Kıbrıs ve Monoik keçiboynuzu genotipleri ile morfolojik olarak sahip olduğu özellikler bakımında nitelikli ve peyzaj amaçlı kullanılan Adana genotipinin mikroçoğaltım olanakları klasik katı kültür ve yeni nesil doku kültürü teknikleri ile araştırılmıştır. Her genotip için mikroçoğaltım ve köklendirme denemeleri sonucunda belirlenen en başarılı besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları göz önüne alınarak katı kültüre kıyasla Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminin mikroçoğaltım üzerine etkisi araştırılmıştır. Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminde kültür kaplarına 4 saatte bir 10 dk daldırma ve 4 saatte bir 15 dk havalandırma işlemi uygulanmıştır. Çalışma boyunca besin ortamlarının ve bitki büyüme düzenleyicilerin, katı kültür ve Plantform sistemlerinde çoğaltılan bitkilerde somaklonal varyasyona sebep olup olmadığı başlangıç materyali ile karşılaştırılarak test edilmiştir.

4.1. Sterilizasyon Protokolünün Optimize Edilmesine ait Bulgular

Tez çalışması kapsamında kullanılan bitkisel materyalin yüzey sterilizasyon optimizasyonu için farklı çalışmalar yürütülmüştür. Bitkisel materyaller Kasım ve Mart ayında temin edilerek dönemsel bir karşılaştırma gerçekleştirilmiştir. Bununla beraber farklı konsantrasyonlarda çeşitli sterilantlar kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılmak üzere, ilk olarak 2016 yılı Kasım ayında Adana'nın Kozan ilçesinde bulunan kapama keçiboynuzu bahçesinden eksplant kaynağı olarak temin edilen sürgünler 2-3 cm uzunlukta parçalara ayrılarak yüzeyde bulunan partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 20 dk boyunca çeşme suyu altında yıkanmış, daha sonra steril kabin içerisinde %70 oranında etil alkol çözeltisinde 3 dk bekletilmiş ve sonrasında %5 oranında sodyum hipoklorit (NaClO) içeren solüsyonda 20 dk boyunca bekletilerek sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu

uygulama sonucunda Kıbrıs genotipine ait eksplantların %93.4'ünde, Monoik genotipine ait eksplantların %98.6'ında kontaminasyon görülmüştür. Bu sterilizasyon protokolüne göre tekrarlanan uygulamalarda kontaminasyon oranında benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan eksplantlar A: Keçiboynuzu genotiplerine ait sürgünler B: Sterilizasyon uygulaması için hazırlanmış eksplantlar

Yüksek kontaminasyon görülen sterilizasyon protokolünde yapılan değişiklikler doğrultusunda, 2-3 cm uzunlukta parçalara ayrılan eksplantlar yüzeyde bulunan partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 30 dk boyunca çeşme suyu altında yıkanmış, 6g/L oranında Benlate solüsyonunda 30 dk bekletilmiş, daha sonra steril kabin içerisinde 5 mg/L ve 10 mg/L cıva klorür ($HgCl_2$) solüsyonunda 15 dk bekletilmiş, sonrasında %70 oranında etil alkol çözeltisinde 3 dakika bekletilmiş ve son olarak %10 oranında sodyum hipoklorit ($NaClO$) içeren solüsyonda (2-3 damla Tween-20) 20 dk süre boyunca bekletilerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hazırlanan besin ortamlarına 1 mg/L, 2mg/L, 3mg/L oranlarında PPM eklenerek kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Bu uygulama sonucunda 5 mg/L cıva klorür uygulanmış PPM'siz kontrol grubundaki eksplantların %37.5'inde kontaminasyon görülürken, bu gruptaki bitkilerin %44.5'nin canlılığını kaybettiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan 10 mg/L cıva

klorür uygulanmış PPM'siz kontrol grubundaki eksplantlarda %33.3 oranda kontaminasyon görülürken, bu gruptaki bitkilerin %52.7'sinin canlılığını kaybettiği tespit edilmiştir. Uygulama neticesinde 10mg/L cıva klorür uygulanan ve 3mg/L PPM içeren besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda kontaminasyon gözlenmezken eksplantlarda canlılık oranı %12.4 olarak tespit edilmiştir. Bu protokolda cıva klorürün kontaminasyon oranını azalttığı gözlemlenirken, artan cıva klorür oranının eksplantların canlılığını da önemli derecede azalttığı görülmüştür.

Sterilizasyon uygulamalarında dezenfektan miktarı ve uygulama süresinin kontaminasyon oranına etkisinin belirlemek ve eksplantların canlılığını artırmak amacıyla yapılan sterilizasyon çalışmasında, 2-3 cm uzunlukta parçalara ayrılan eksplantlar yüzeyde bulunan partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 30 dk boyunca çeşme suyu altında yıkanmış, daha sonra steril kabin içerisinde 5 mg/L ve 10 mg/L cıva klorür ($HgCl_2$) solüsyonunda 15 dk bekletilmiş, sonrasında %70 oranında etil alkol çözeltisinde 3 dk bekletilmiş ve son olarak %10 oranında sodyum hipoklorit ($NaClO$) içeren solüsyonda (2-3 damla Tween-20) 7.5 ve 15 dk süre boyunca bekletilerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hazırlanan besin ortamlarına 1 mg/L PPM eklenerek kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Bu uygulama sonucunda 10 mg/L cıva klorür ve 15 dk sodyum hipoklorit uygulanmış eksplantların hiçbirinde kontaminasyona rastlanmazken, bu gruptaki bitkilerin %60'nın canlılığını kaybettiği tespit edilmiştir. 10 mg/L cıva klorür ve 7.5 dk sodyum hipoklorit uygulanmış eksplantlarda kontaminasyon oranı %9 olarak belirlenirken, eksplantların %58'i canlılığını kaybetmiştir. Bu sonuca göre sodyum hipoklorit çözeltisinin eksplant canlılığına büyük oranda etkisinin olmadığı belirlenirken, kontaminasyon oranının azaltılmasında bekletme süresinin %9 oranda etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca 5 mg/L cıva klorür ve 15 dk sodyum hipoklorit uygulanmış eksplantlarda %2 oranda kontaminasyon görülürken, eksplantların %45'i canlılığını kaybetmiştir. 15dk ve 7.5 dk sodyum hipoklorit solüsyonunda bekletilme sürelerinin kontaminasyon oranını azaltmada önemli bir

etkisi görülmemiştir. Bu uygulama sonucuna göre cıva klorür oranının eksplant canlılığını önemli derecede azalttığı belirlenmiştir.

Yüksek oranda cıva klorür uygulamasının eksplant canlılığına olumsuz etkisinden dolayı yapılan farklı bir sterilizasyon denemesinde 2-3 cm uzunlukta parçalara ayrılan eksplantlar, yüzeylerinde bulunan partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 30 dk çeşme suyu altında yıkanmıştır. Daha sonra steril kabin içerisinde 0.1 mg/L cıva klorür (HgCl_2) solüsyonunda 15 dk bekletilmiş, sonrasında %70 oranında etil alkol çözeltisinde 3 dk bekletilmiş ve son olarak %5 oranında sodyum hipoklorit (NaClO) içeren solüsyonda (2-3 damla Tween-20) 5, 10 ve 15 dk süre bekletilerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hazırlanan besin ortamlarına 1 mg/L PPM eklenerek kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Bu deneme sonucunda cıva klorür uygulanmayan ve 5, 10 ve 15 dk, %5 oranında sodyum hipoklorit uygulanan gruptaki eksplantlarda sırasıyla %75, %66 ve %55 oranlarda kontaminasyon görülürken, eksplant canlılığında herhangi bir kayıp gözlenmemiştir. 0.1 mg/L cıva klorür uygulanan ve 5,10 ve 15 dk %5 oranında sodyum hipoklorit uygulanan gruptaki eksplantlarda sırasıyla %35, %25 ve %20 oranda kontaminasyon görülürken, eksplant canlılığında herhangi bir kayıp görülmemiştir. Bu uygulama ile düşük oranda cıva klorür uygulamasının kontaminasyon oranını azaltmada önemli derecede etkili olduğu belirlenirken, eksplant canlılığına herhangi bir olumsuz etki göstermemiştir.

Yapılan sterilizasyon denemelerinde kontaminasyon oranında istenilen azalma sağlanamadığı için gerçekleştirilen yeni bir sterilizasyon denemesinde 2-3 cm uzunlukta parçalara ayrılan eksplantlar yüzeyde bulunan partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 30 dk boyunca çeşme suyu altında yıkanmış, daha sonra steril kabin içerisinde 0.2 mg/L cıva klorür (HgCl_2) solüsyonunda 15 dk bekletilmiş, kontrol grubuna ek olarak 6g/L oranında Benlate solüsyonunda 10 dk bekletilmiş sonrasında %70 oranında etil alkol çözeltisinde 3 dk bekletilmiş ve son olarak %5 oranında sodyum hipoklorit (NaClO) içeren solüsyonda (2-3 damla Tween-20) 15 dk süre boyunca bekletilerek yüzey sterilizasyonu

gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hazırlanan besin ortamlarına 1 mg/L PPM eklenerek kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Bu uygulama sonucunda 0.2 mg/L cıva klorür uygulanan gruptaki eksplantlarda %20 oranında kontaminasyon gözlemlenirken, cıva klorüre ek olarak 6 g/L oranında Benlate (Fungusit) solüsyonu ile uygulama görmüş gruptaki eksplantlarda da aynı sonuç elde edilmiştir. Bu uygulama sonucunda bitki canlılığında kayıplar görülmezken, Benlate solüsyonunun kontaminasyon oranının azaltılmasında önemli bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

Yapılan sterilizasyon denemelerinde cıva klorürün düşük konsantrasyonu kontaminasyon oranını önemli derecede azaltırken eksplant canlılığını koruduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre yapılan sterilizasyon denemesinde, 2-3 cm uzunlukta parçalara ayrılan eksplantlar yüzeyde bulunan partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla 30 dk boyunca çeşme suyu altında yıkanmış, daha sonra steril kabin içerisinde 0.3 mg/L cıva klorür (HgCl₂) solüsyonunda 15 dk bekletilmiş, sonrasında %70 oranında etil alkol çözeltisinde 3 dk bekletilmiş ve son olarak %5 oranında sodyum hipoklorit (NaClO) içeren solüsyonda (2-3 damla Tween-20) 10 dk süre boyunca bekletilerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu uygulama neticesinde eksplantlarda %3 oranında kontaminasyon görülürken eksplant canlılığında sterilizasyona bağlı bir kayıp görülmemiştir.

4.2. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemelerine ait Bulgular

4.2.1. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri I'e ait Bulgular

Tez çalışmasında ilk olarak katı kültür mikroçoğaltım denemeleri yürütülmüştür. Katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile bitki büyüme düzenleyicilerinden BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) ve 2,4-D (0, 0.5, 1.0 mg/L)'nin kombinasyonları kullanılmıştır. Bu denemelerde Kıbrıs ve Monoik olarak adlandırılan genotipler yer alırken, Adana genotipi çalışmaya daha sonra dahil edilmiştir. Yapılan bu denemede Kıbrıs genotipine ait

eksplantların %95'inde ve Monoik genotipine ait eksplantların %97'inde kallus oluşumu meydana gelmiştir.

Tez çalışması kapsamında literatür incelemelerine dayalı olarak BA ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Yürütülen ilk deneme sonucunda kullanılan her iki genotipte de yoğun bir kallus oluşumunun gerçekleştiği ve herhangi bir sürgün gelişiminin görülmediği net olarak tespit edilmiştir. Naghmouchi ve ark, (2012) keçiboynuzunda gerçekleştirdikleri mikroçoğaltım çalışmasında en iyi sonuçların tomurcuklar şişmeye başladığı dönemdeki meristem kültüründen elde ettiklerini belirtmişler ve en iyi sürgün gelişiminin 2 mg/L BAP ve 2 mg/L 2,4-D kombinasyonu içeren yarı kuvvette MS ortamından meydana geldiğini bildirmişlerdir. Tez çalışmasında da benzer şekilde 2 mg/L BAP ve 2 mg/L 2,4-D içeren ½ MS ortamı sürgün gelişimi amacıyla kullanılmıştır. Ancak herhangi bir sürgün gelişimi olmadığı, yoğun bir şekilde kallus yapılarının ortaya çıktığı tespit edilmiştir. İki çalışma arasında sürgün gelişimi açısından ortaya çıkan bu farklılığın en büyük sebebinin genotip etkisi olduğu düşünülmektedir. Farklı keçiboynuzu genotiplerinde başarılı ve sürdürülebilir bir mikroçoğaltım protokolünün hazırlanması amacıyla yürüttüğümüz bu tez çalışmasında I. deneme olarak adlandırılan yöntem tercih edilmemiştir.

4.2.2. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri II'e ait Bulgular

Tez kapsamında gerçekleştirilen I. deneme sonucunda bitkilerde meydana gelen yoğun kallus oluşumu göz önüne alınarak katı kültür mikroçoğaltım denemesinde uygulanmış protokolda değişiklikler yapılmıştır. Bu bağlamda, katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) ve GA₃ (0.1, 0.5 mg/L)'ün farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Mikroçoğaltım denemelerinde genotiplere ait kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitkicik) ve bitki boyu (cm) parametreleri incelenmiştir.

4.2.2.1. Kıbrıs Genotipine ait Bulgular

Kıbrıs genotipinde katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının bitki boyu üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.1). Kıbrıs genotipinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin katı kültürde bitki boyu üzerine etkisi incelendiğinde, en başarılı besin ortamı MS, en başarılı bitki büyüme düzenleyicisi 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ kombinasyonu olarak belirlenmiştir. Kıbrıs genotipinin mikroçoğaltım denemelerinde en yüksek bitki boyu ortalaması, 1.34 cm ile 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Çalışmada 2 mg/L BA+0.1 mg/L GA₃ (1.26 cm) içeren MS besin ortamında istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunamamıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, besin ortamları ile bitki büyüme düzenleyicileri interaksiyonunun mikroçoğaltım üzerinde farklı etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.1. Kıbrıs genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen bitki boyuna (cm) ait veriler

BBD Konsantrasyonu	MS Besin Ortamı	½ MS Besin Ortamı	WPM Besin Ortamı	BBD Ortalaması
Kontrol	0.52d	0.50d	0.50d	0.50C
0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.55d	0.61cd	0.51d	0.55BC
0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.72bc	0.52d	0.52d	0.58BC
0.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.60cd	0.50d	0.50d	0.53BC
0.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.55d	0.57cd	0.50d	0.54BC
1.0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.55d	0.51d	0.51d	0.52BC
1.0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.85b	0.50d	0.46d	0.60B
1.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.81b	0.50d	0.50d	0.60B
1.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.34a	0.54d	0.50d	0.79A
2 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.26a	0.58cd	0.50d	0.78A
2 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.71bc	0.58cd	0.50d	0.60B
Ortam Ortalaması	0.77A	0.54B	0.50B	-

LSD_{Ortam}: 0.043***

LSD_{BBD}: 0.083***

LSD_{Ortam*BBD}: 0.145***

Kıbrıs genotipinde katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2). Çalışmada en yüksek kardeşlenme sayısı, 3.39 kardeş/bitkicik ile 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Bu oranı, 2.01 kardeş/bitkicik ile 1.5 mg/L BA+0.1 mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamı takip etmiştir. Bu durum, GA₃ miktarındaki artışın kardeşlenme oranını önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Ayrıca varyans analizi sonuçları göz önüne alındığında Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiş olup, bu sonuçlar besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Kıbrıs genotipi keçiboynuzunun katı kültürde kardeşlenmesine ait görüntü Şekil 4.2'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Kıbrıs genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) ait veriler

BBD Konsantrasyonu	MS Besin Ortamı	½ MS Besin Ortamı	WPM Besin Ortamı	BBD Ortalaması
Kontrol	0.99de	1.00de	1.02cde	1.00CD
0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.88e	0.77e	0.93e	0.86D
0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.00de	1.03cde	1.00de	1.01CD
0.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.00de	1.00de	1.03cde	1.01CD
0.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.00de	1.00de	1.00de	1.00CD
1.0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.00de	1.00de	1.00de	1.00CD
1.0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.00de	1.00de	1.03cde	1.01CD
1.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	2.01b	1.50bcd	1.03cde	1.51B
1.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	3.39a	1.06cde	1.00de	2.01A
2 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.00de	1.56bc	1.04cde	1.20BC
2 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.00de	1.00de	1.00de	1.00CD
Ortam Ortalaması	1.35A	1.08B	1.00B	-

LSD_{Ortam}: 0.167***

LSD_{BBD}: 0.323***

LSD_{Ortam*BBD}: 0.560***



Şekil 4.2. Kibrıs genotipinin 4. haftada katı kültürde kardeşlenmesi (1.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ içeren MS ortamı)

4.2.2.2. Monoik Genotipine ait Bulgular

Monoik genotipinde ait katı kültür mikroçoğaltım denemesinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının bitki boyu üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3). Monoik genotipinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin katı kültürde bitki boyu üzerine etkisi incelendiğinde, en başarılı besin ortamı MS, en başarılı bitki büyüme düzenleyicisi 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ olarak belirlenmiştir. Monoik genotipinin mikroçoğaltım denemelerinde en yüksek bitki boyu ortalaması 0.7 cm ile 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, Monoik genotipi içinde besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.3. Monoik genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen bitki boyuna (cm) ait veriler.

BBD Konsantrasyonu	MS Besin Ortamı	½ MS Besin Ortamı	WPM Besin Ortamı	BBD Ortalaması
Kontrol	0.50cde	0.50cde	0.47def	0.49B
0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.50cde	0.50cde	0.50cde	0.50B
0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.50cde	0.50cde	0.50cde	0.50B
0.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.50cde	0.50cde	0.50cde	0.50B
0.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.50cde	0.50cde	0.50cde	0.50B
1.0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.45f	0.45f	0.50cde	0.46C
1.0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.50cde	0.50cde	0.51cd	0.50B
1.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.50cde	0.51cd	0.50cde	0.50B
1.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.53bc	0.51cd	0.47def	0.50B
2 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.55b	0.51cd	0.45f	0.50B
2 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.70a	0.46ef	0.52bc	0.56A
Ortam Ortalaması	0.52A	0.49B	0.49B	-

LSD_{Ortam}:0.011***LSD_{BBD}=: 0.043***LSD_{Ortam*BBD}: 0.037***

Çalışma kapsamında Monoik genotipinin katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.4). Çalışmada en yüksek kardeşlenme sayısı 2.33 ortalama kardeş/bitkicik ile 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Ayrıca varyans analizi sonuçlarına göre Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Yapılan incelemelerde, besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Monoik genotipinin katı kültürde kardeşlenmesine ait görüntü Şekil 4.3'de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Monoik genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) ait veriler

BBD Konsantrasyonu	MS Besin Ortamı	½ MS Besin Ortamı	WPM Besin Ortamı	BBD Ortalaması
Kontrol	1.01ef	1.00ef	1.00ef	1.00B
0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.00ef	1.10ef	1.00ef	1.03B
0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.00ef	1.03ef	1.00ef	1.01B
0.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.00ef	1.00ef	1.00ef	1.00B
0.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.03ef	0.77f	1.16cdef	0.99B
1.0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.70b	1.66bc	1.00ef	1.45A
1.0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.63bcd	1.00ef	1.00ef	1.21AB
1.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.00ef	1.00ef	1.06ef	1.02B
1.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.10ef	1.06ef	1.03ef	1.06B
2 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.46bcde	1.20bcdef	1.04ef	1.23AB
2 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	2.33a	1.13def	1.00ef	1.48A
Ortam Ortalaması	1.29A	1.08B	1.02B	

LSD_{Ortam}: 0.157***LSD_{BBD}: 0.030***LSD_{Ortam*BBD}: 0.052*



Şekil 4.3. A: Katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda Monoik genotipine ait elde edilen bitkicikler (2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ içeren MS ortamı) B: Katı kültür mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda elde edilen bitkiciklerin boy ölçüleri.

4.2.2.3. Adana Genotipine ait Bulgular

Adana genotipinde katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının bitki boyu üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.5). Adana genotipinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin katı kültürde bitki boyu üzerine etkisi incelendiğinde, en başarılı besin ortamı ½ MS, en başarılı bitki büyüme düzenleyicisi 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ olarak belirlenmiştir. Adana genotipinin mikroçoğaltım denemelerinde en yüksek bitki boyu ortalaması, 2.16 cm ile 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş ½ MS besin ortamından elde edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Bu durum, besin ortamlarının mikroçoğaltım

üzerindeki etkisinin bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.5. Adana genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen bitki boyuna (cm) ait veriler

BBD Konsantrasyonu	MS Besin Ortamı	½ MS Besin Ortamı	WPM Besin Ortamı	BBD Ortalaması
Kontrol	0.51defg	0.57de	0.50defg	0.52DE
0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.54def	0.50defg	0.50defg	0.51E
0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.54def	0.53def	0.50defg	0.52DE
0.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.58de	1.55b	0.46efg	0.87B
0.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.78c	2.16a	0.62d	1.19A
1.0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.46efg	0.46efg	0.51defg	0.48E
1.0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.50defg	0.45efg	0.50defg	0.48E
1.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.37g	0.45efg	0.54def	0.45E
1.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.77c	0.55def	0.50defg	0.61C
2 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	0.81c	0.50defg	0.50defg	0.60CD
2 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	0.52def	0.42fg	0.48defg	0.47E
Ortam Ortalaması	0.58B	0.74A	0.51C	

LSD_{Ortam}: 0.039***

LSD_{BBD}: 0.077***

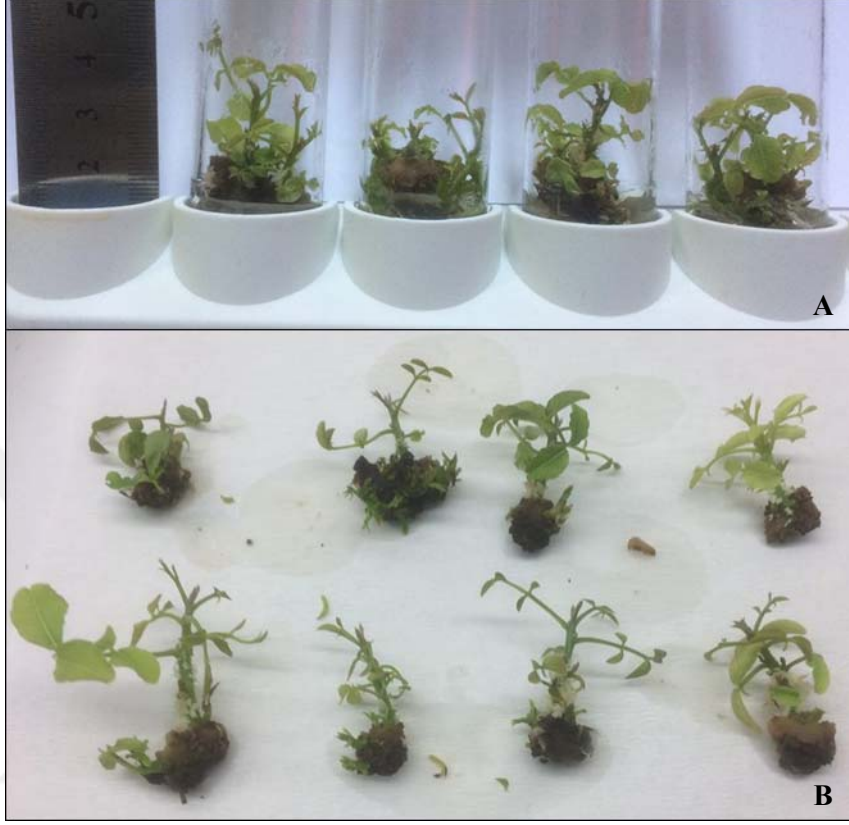
LSD_{Ortam*BBD}: 0.013***

Tez çalışması kapsamında katı kültürde Adana genotipinde katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). Çalışmada en yüksek kardeşlenme sayısı, 5.88 ortalama kardeş/bitkicik ile 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş ½ MS besin ortamından elde edilmiştir. Ayrıca varyans analizi sonuçlarına göre Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneme sonuçları, *in vitro* doku kültüründe besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Adana genotipinin katı kültürde kardeşlenmesine ait görüntü Şekil 4.4'de sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Adana genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemesinden elde edilen kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) ait veriler

BBD Konsantrasyonu Besin Ortamları	MS Besin Ortamı	½ MS Besin Ortamı	WPM Besin Ortamı	BBD Ortalaması
Kontrol	1.00 ₁	1.00 ₁	1.00 ₁	1.00E
0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.00 ₁	1.11 _{h1}	1.16 _{gh1}	1.09DE
0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.00 ₁	1.06 _{h1}	1.26 _{fgh1}	1.11DE
0.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.00 ₁	4.10 _b	1.22 _{gh1}	2.10B
0.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.65 _{def}	5.88 _a	1.36 _{efgh1}	2.97A
1.0 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	1.90 _d	1.10 _{h1}	1.10 _{h1}	1.36C
1.0 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.40 _{efgh1}	1.76 _{de}	1.14 _{gh1}	1.43C
1.5 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	3.01 _c	1.66 _{def}	1.06 _{h1}	1.91B
1.5 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.55 _{defg}	1.06 _{h1}	1.06 _{h1}	1.22CDE
2 mg/L BA-0.1 mg/L GA ₃	4.03 _b	1.13 _{gh1}	1.03 ₁	2.06B
2 mg/L BA-0.5 mg/L GA ₃	1.20 _{gh1}	1.46 _{efgh}	1.10 _{h1}	1.25CD
Ortam Ortalaması	1.70 _B	1.94 _A	1.13 _C	

LSD_{Ortam}: 0.125***LSD_{BBD}: 0.024***LSD_{Ortam*BBD}: 0.042***



Şekil 4.4. A: 4 haftalık alt kültür sonucunda elde edilen bitkicikler B: Katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda Adana genotipine ait elde edilen bitkicikler (0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ içeren ½ MS ortamı)

4.3. Katı Kültür Köklenme Denemelerine ait Bulgular

Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerinin katı ortam mikroçoğaltım denemelerinin ardından katı kültür köklenme denemeleri kurulmuştur. Köklendirme denemelerinde MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları (0, 1.0 ve 2.0 mg/L) kullanılmıştır. Sekiz haftalık kültür süresi sonucunda 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında Monoik genotipine ait bitkiciklerde köklenme görülse de, istatistiksel açıdan anlamlı bulunamamıştır. Kıbrıs ve Adana genotiplerine ait bitkiciklerde

kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ile herhangi bir köklenmenin olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. Monoik genotipine ait bitkiciklerde köklenme durumu

Köklendirme çalışmalarında başarı oranının artırılması amacıyla bazı ilave çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İlk olarak MS besin ortamında NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerinin miktarları artırılmış (0, 1.0, 5.0 ve 10.0 mg/L) ve ortamlar aktif karbonlu (3 mg/L) ve aktif karbonsuz olmak üzere hazırlanarak köklendirme denemesi tekrarlanmıştır. Aktif karbon içermeyen besin ortamlarında bitkiciklerde yaprak oluşumu ve bitki boyunda (ortalama bitki boyu 2.6 cm, ortalama yaprak sayısı 6 adet) daha iyi gelişme gözlemlenirken, herhangi bir köklenme sağlanamamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. A: Genotiplerin aktif karbonlu köklenme ortamında 4. haftadaki gelişim aşaması. B: Aktif karbonlu ve aktif karbonsuz ortamlardaki genotiplerin gelişme durumu

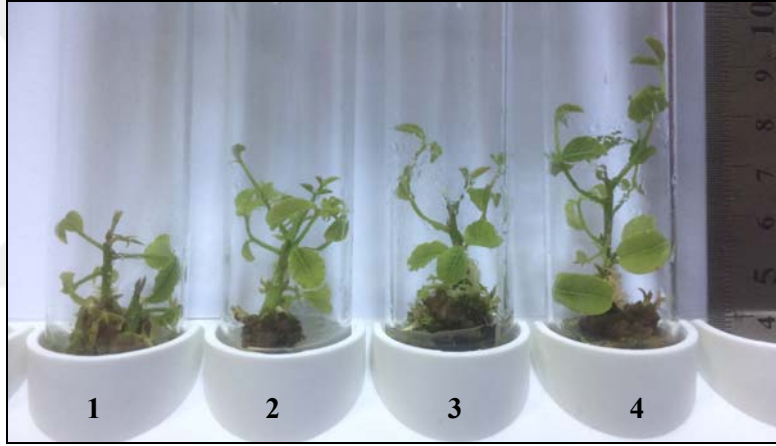
Genotiplerin köklenme başarısını artırmak için NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicileri (0, 1.0 ve 2.0 mg/L) içeren 2 kuvvette MS ve Rugini Olive Medium besin ortamları kullanılmıştır. Ayrıca besin ortamı içerisine toz haline getirilmiş keçiyoynuzu tozu (20 g/L) eklenmiştir. Yapılan bu uygulamalar sonucunda genotiplerde başarılı bir köklenme sağlanamamıştır.

Köklendirmeyi teşvik etmek amacıyla yapılan farklı bir denemede, mikroçoğaltımdan elde edilen bitkiciklerin uzun süre boyunca bitki büyüme düzenleyicilerine maruz kaldığı göz önüne alınarak bitkicikler hormon free MS besin ortamında dinlenmeye alınmıştır. Bir aylık inkübasyon sonrasında besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyici miktarı artırılarak bitkicikler ½ MS besin ortamında NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerinde (0, 1.0, 5.0 ve 10.0 mg/L) kültüre alınmıştır. Bitkiciklerde karanlık stresine bağlı olarak köklenmenin teşvik edilmesi amacıyla tüplerde bulunan bitkicikler bir hafta süreyle karanlık iklimlendirme ortamında tutulmuştur. Yapılan bu uygulama sonucunda köklendirme sağlanamamıştır.

Köklendirmeyi teşvik etmek amacıyla yapılan bir başka denemede ½ MS besin ortamında NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmış (0, 1.0 ve

2.0 mg/L) ve ortama ek olarak makro besin elementi azot (N) ve potasyum (K) ilavesi yapılmıştır. Makro besin kaynağı olarak KNO_3 (202.31 mg/L) kullanılmıştır. Yapılan bu denemede bitkiciklerin morfolojik yapısında olumlu gelişmeler gözlemlenirken köklendirmede istenilen başarı sağlanamamıştır.

Köklendirmeyi sağlamak amacıyla yapılan bir başka denemede MS besin ortamında IBA bitki büyüme düzenleyicisi kullanılmış (10 mg/L) ve ortama ek olarak $MgSO_4$ (36.674 g/L) ve KNO_3 (202.31 mg/L) ilave edilmiştir. Bu uygulama sonucunda her üç genotipe ait bitkiciklerin morfolojik açıdan olumlu gelişmeler gözlemlenirken, köklendirmede istenilen başarıya ulaşılamamıştır (Şekil 4.7).

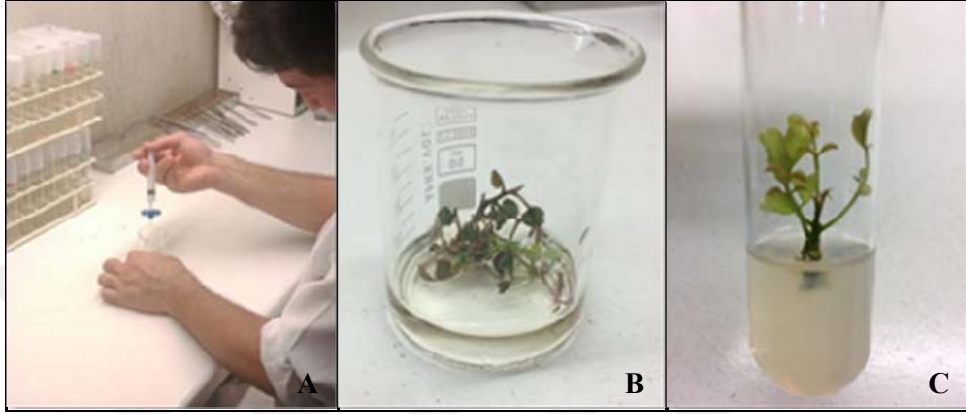


Şekil 4.7. MS besin ortamına ek olarak $MgSO_4$ ve KNO_3 ilave edilmiş MS besin ortamındaki bitkiciklerin gelişme durumu

- 1: Kontrol.
- 2: MS+ $MgSO_4$
- 3: MS+ KNO_3
- 4: MS+ $MgSO_4$ + KNO_3

Son olarak köklenmeye teşvik etmek amacıyla gerçekleştirilen bir başka denemede, hormonsuz MS besin ortamı kullanılmış ve 0,5 cm uzunlukta eksplantlar 1000 ppm oranındaki IBA çözeltisine 3 dk boyunca daldırılmıştır. Daldırma öncesinde steril kabin içerisinde soğuk sterilizasyon yöntemi ile IBA çözeltisi steril edilmiştir. Daldırma sonrasında bitkicikler hormonsuz MS besin

ortamlarına transfer edilmiştir. Yapılan bu uygulama sonucunda her üç genotip için istenilen köklendirme başarısı sağlanamamıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Dipping yöntemi ile IBA solüsyonuna daldırılan bitkicikler A: 1000 ppm oranında IBA solüsyonunun soğuk sterilizasyon yöntemi ile steril edilmesi B: Keçiboynuzu sürgünlerinin IBA çözeltisine daldırılması C: Daldırma sonrasında hormonsuz MS ortamına transfer edilen eksplant

4.4. Plantform Mikroçoğaltım Denemesine Ait Bulgular

Katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda Kıbrıs, Monoik ve Adana genotipleri için en iyi kardeşlenme ve bitki gelişimi sağlayan besin ortamları ile Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri kurulmuş olup, elde edilen sonuçlar ile katı kültür mikroçoğaltım denemesi karşılaştırılmıştır. Kıbrıs genotipi için 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ ihtiva eden MS besin ortamı, Monoik genotipi için 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ ihtiva eden MS besin ortamı ve Adana genotipi için 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ ihtiva eden ½ MS besin ortamları kullanılarak genotipler, Plantform sisteminde sıvı kültüre alınmıştır. Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerinin katı kültür mikroçoğaltım performansı ve Plantform sistemindeki mikroçoğaltım performansı t-testi ile karşılaştırılmış ve elde edilen veriler Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerine ait katı kültür ve Plantform sistemi mikroçoğaltım sonuçlarına ait veriler.

Genotip	Ortam	Kardeş Sayısı (kardeş/bitkicik)	P Değeri	Bitki Boyu (cm)	P Değeri
Kıbrıs	Katı Ortam	3.96	0.02	1.34	0.03
	Plantform	5.77		2.08	
Monoik	Katı Ortam	2.33	0.0093	0.70	0.07
	Plantform	2.88		1.01	
Adana	Katı Ortam	5.88	0.004	2.16	0.76
	Plantform	7.22		1.93	

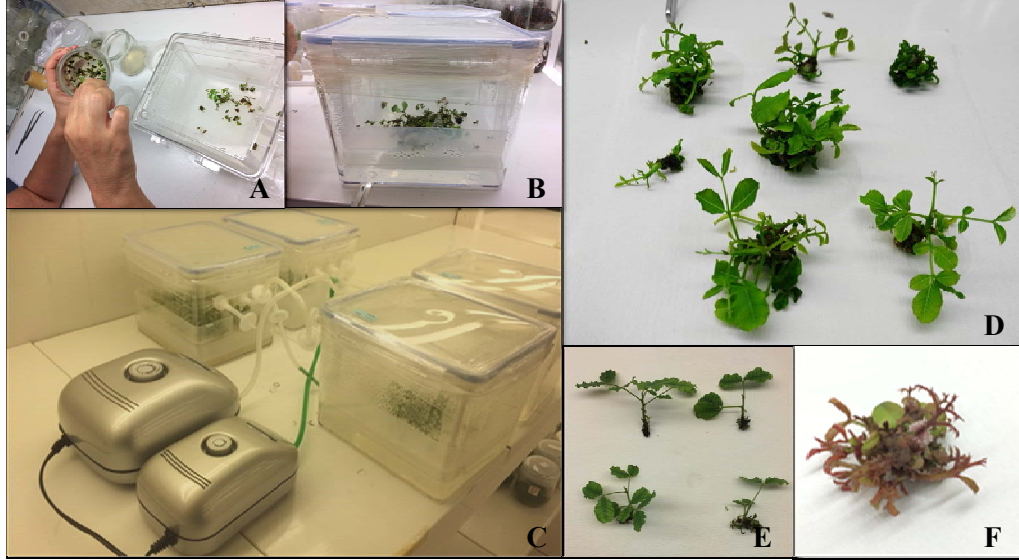
T-testi sonucunda Kıbrıs genotipinin katı kültür ve Plantform sisteminde mikroçoğaltım deneme sonuçları incelendiğinde, sistemler arasında istatistiki açıdan farklılık bulunmuştur. Kıbrıs genotipi gelişimini bitki boyu (cm) açısından incelediğimizde, katı kültür denemesinde bitki boyu 1.34 cm iken Plantform'da 2.08 cm olarak elde edilmiştir. Kardeşlenme katsayısı ise katı kültür denemesinde 3.96 (kardeş/bitkicik) iken Plantform sisteminde 5.77 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Kıbrıs genotipi bitki boyu açısından incelediğinde katı kültürde maksimum bitki boyu 1.34 cm iken Plantform'da 2.08 cm olarak tespit edilmiştir.

Monoik genotipinde yürütülen deneme sonucunda ise, kardeşlenme katsayısı istatistiki açıdan önemli bulunurken, bitki boyu açısından farklılık görülmemiştir. Kardeşlenme katsayısı katı kültürde 2.33 (kardeş/bitkicik) iken Plantform sisteminde 2.88 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Monoik genotipini bitki boyu (cm) açısından incelediğimizde, katı kültürde bitki boyu 0.70 cm iken, Plantform'da 1.01 cm olarak elde edilmiştir. Monoik genotipinin katı kültürde maksimum bitki boyu 1.1 cm iken, Plantform'da 2.4 cm olarak tespit edilmiştir.

Adana genotipinde yürütülen deneme sonucunda, kardeşlenme katsayısı istatistiki açıdan önemli bulunurken, bitki boyu açısından farklılık görülmemiştir. Kardeşlenme katsayısı katı kültürde 5.88 (kardeş/bitkicik) iken, Plantform'da 7.22 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Buna karşın Adana genotipini bitki boyu

(cm) açısından incelediğimizde, katı kültürde bitki boyu 2.16 cm iken Plantform'da 1.93 cm olarak elde edilmiştir. Adana genotipinde katı kültürde maksimum bitki boyu 2.7 cm iken Plantform'da 2.8 cm olarak tespit edilmiştir.

Plantform sisteminde her üç genotip için kardeşlenme katsayısı ve bitki boyu ortalamasının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her iki sistemden elde edilen bitkicikler yaprak rengi ve yaprak genişliği açısından incelendiğinde, Plantfom sisteminde gelişen bitkicikler katı ortamda gelişen bitkilere göre daha iyi gelişme göstermiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. A: Eksplantların Plantform kültür kaplarına aktarılması. B: Plantform sisteminde alt kültüre alınmış keçiboynuzu eksplantları C: Plantform biyoreaktör sisteminin genel görüntüsü D: Kıbrıs genotipinin Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen bitkicikleri. E: Monoik genotipinin Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen bitkicikleri. D: Adana genotipinin Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen bitkicikleri.

4.5. Moleküler Çalışmalara Ait Bulgular

Tez çalışması kapsamında kullanılan üç genotipte de katı kültür ve Plantform biyoreaktör sistemlerinde çoğaltılan bitkilerde herhangi bir genetik farklılık olup olmadığı başlangıç materyali kullanılarak SSR markırları ile karşılaştırmalı olarak test edilmiştir.

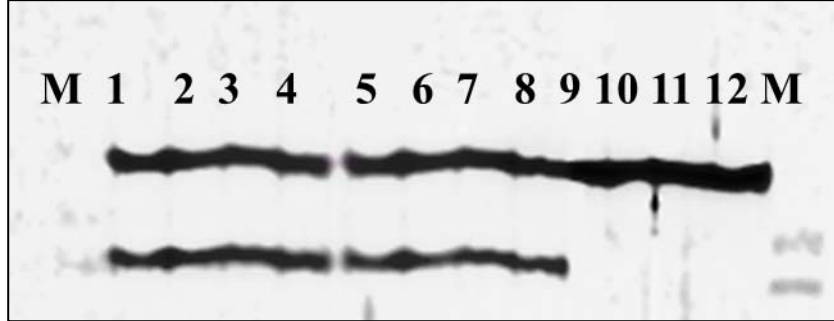
Plantform sisteminin kullanımı ile ilgili başarılı bir protokolün geliştirilebilmesi için Plantform sisteminde çalışılan bitkilerin başlangıç materyali ile genetik olarak aynı genetik yapıya sahip olması büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, keçiboynuzu için geliştirilmiş ve polimorfik olduğu doğrulanmış toplam 9 SSR primeri kullanılmıştır. SSR analizlerinde kullanılmak üzere Kıbrıs genotipinden 4, Monoik genotipinden 4 ve Adana genotipinden 4 olmak üzere toplam 12 örnek alınmıştır. SSR analizlerinde kullanılan örneklerin DNA kalite ve miktarına ait bilgiler Çizelge 4.7’de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. DNA kalite ve miktarlarına ait sonuçlar

Örnek No	Örnek Adı	ng/ul	260/280
1	Kıbrıs Kontrol	276.56	1.92
2	Kıbrıs Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası	112.28	2.11
3	Kıbrıs Plantform Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası	128.78	2.23
4	Kıbrıs Katı Kültür Köklenme Denemesi Sonrası	246.89	1.99
5	Monoik Kontrol	246.23	1.84
6	Monoik Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası	271.81	2.13
7	Monoik Plantform Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası	146.27	2.08
8	Monoik Katı Kültür Köklenme Denemesi Sonrası	216.74	1.95
9	Adana Kontrol	187.46	2.05
10	Adana Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası	231.19	2.16
11	Adana Plantform Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası	254.63	1.98
12	Adana Katı Kültür Köklenme Denemesi Sonrası	287.13	1.90

Tez kapsamında DNA analizleri için kullanılan bitkisel materyallerden DNA izolasyonları yapılmış ve izolasyonları gerçekleştirilen DNA'ların miktar ve kalitelerine spektrofotometre aracılığıyla bakılmıştır. Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında DNA izolasyon aşaması son derece önemlidir. PCR uygulamalarında ise DNA'nın miktar ve özellikle saflığı amplifikasyon açısından daha da önem kazanmaktadır (Ergül, 2000). Bitki moleküler biyoloji çalışmalarında iyi bir DNA izolasyonu başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir. Çalışmada kullanılan keçiboynuzu örneklerine ait DNA'lar incelendiğinde, DNA miktarları yeterli bulunmuştur. DNA'lar kalite bakımından değerlendirildiğinde, kaliteli DNA'larda saflığın A260/A280 oranının yaklaşık 2.0 civarında bulunması beklenmektedir. Elde edilen değer 2.0'den yüksek olması; örneğin RNA, kloroform ya da fenol ile kirli olduğunu ve 1.6 değerinden düşük olması ise örnek içerisinde proteinler ya da fenolik (polifenol) bileşikler bulunduğunun göstergesidir (Hoisington, 1992). Tez kapsamında izolasyonları gerçekleştirilen DNA'ların saflık oranları 1.84-2.23 arasında değişmiştir.

SSR analizleri sonucunda kullanılan SSR primerlerinin keçiboynuzu için daha önce polimorfik sonuçlar vermesi nedeniyle bu çalışma sonucunda elde edilen monomorfik DNA bant profilleri bu bitkilerin genetik olarak sabit olduğunu ispatlamaktadır. Sonuç olarak, 9 SSR primeri kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda bu bitkilerin genetik olarak başlangıç materyali ile farklı olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlara ait jel görüntüsü örneği Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Cesi_21_ctt7 nolu primere ait poliakrilamid jel görüntüsü

- 1: Kıbrıs kontrol,
- 2: Kıbrıs Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası,
- 3: Kıbrıs Platform Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası,
- 4: Kıbrıs Katı Kültür Köklenme Denemesi Sonrası,
- 5: Monoik Kontrol,
- 6: Monoik Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası,
- 7: Monoik Platform Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası,
- 8: Monoik Katı Kültür Köklenme Denemesi Sonrası,
- 9: Adana Kontrol,
- 10: Adana Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası,
- 11: Adana Platform Mikroçoğaltım Denemesi Sonrası,
- 12: Adana Katı Kültür Köklenme Denemesi Sonrası, M: Markır,

Bitki biyoteknolojisinde uzun yıllardan beri dış koşullarda vegetatif olarak çoğaltılması zor olan bitkilerin klonal çoğaltılmasında ve köklendirilmesinde, doğada tohumla çoğalmada ve tohum taslağı içerisinde embriyo canlılığında sorun yaşayan bitkilerde embriyo kurtarma çalışmalarında, haploidizasyon yöntemlerinde saf hatların elde edilmesinde, kitlesel çoğaltımda anaç elde edilmesinde, sekonder metabolitlerin üretilmesinde ve daha pek çok alanlarda doku kültürü tekniklerinden yararlanılmaktadır. *In vitro* bitki doku ve organ kültürlerinde bitki dokularının farklı besin ortamları ve farklı bitki büyüme düzenleyicilerde kültüre alınması bir takım sorunlara neden olmaktadır. Katı kültürlerde her bir alt kültür aşamasında kontaminasyon riski bulunmaktadır. Ayrıca uzun süreli alt kültüre alınan bitki dokularında vitrifikasyon sorunları ortaya çıkmaktadır. Bu olay bitki dokularında camlaşmaya ve dokularda büyüme morfolojisi ve fizyolojisinde problemlere neden olarak bitki gelişiminde engel teşkil etmektedir. Dahası uzun süreli alt kültürlerde

bitki büyüme düzenleyici ve besin ortamlarının etkisiyle bitkilerde somaklonal varyasyonlar oluşabilmektedir. Tüm bu sorunların yanında katı kültür ortamlarında katılaştırıcı bileşen olarak kullanılan agar yüksek maliyetli bir girdidir. Söz konusu olan bu sıkıntıları gidermek için yeni nesil doku kültürü teknikleri gelişim göstermeye devam etmektedir. Bu teknikler arasında son yıllarda öne çıkan Geçici Daldırma Sistemleri (Temporary Immersion Systems) geliştirilmiştir. Bu sistemler, bitkilerin *in vitro* kültürü için ideal gelişme ortamlarına olanak sağlamaktadır. Geçici Daldırma Sistemleri, kültür bitkilerinin mikroçoğaltımı, sekonder metabolitlerin üretimi ve organogenesis çalışmalarında ortaya çıkan sorunların çözümü için klasik doku kültürü tekniklerine alternatif bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Günümüzde, benzer veya farklı teknolojik prensiplere dayalı çeşitli geçici daldırma sistemleri, bitkilerde doku ve organ kültürü çalışmalarında materyallerin *in vitro*'da başarılı bir şekilde geliştirilmesi için uygulanmaktadır (Cengiz, 2018).

Geliştirilen geçici daldırma sistemleri arasında TIB, RITA, GIB, SETIS biyoreaktör ve Plantform sistemleri bulunmaktadır (Cengiz, 2018). Son yıllarda geliştirilen bu sistemler arasında Plantform biyoreaktör sistemi oldukça yoğun kullanım alanına sahip olmuş ve birçok araştırmacı tarafından farklı türdeki bitkiler için kullanılmıştır. Süs bitkilerinden endüstriyel bitki türlerine kadar geniş bir kullanım alanı bulunan bu sistem ile; su mercimeği (Yenice, 2010), yüksük otu, kirpi otu ve ahududu (Welandar ve ark, 2014), saplı meşe (Gatti ve ark, 2015), mersin ve zeytin (Benelli ve ark, 2015), süs çimi, kasımpatı, incir ve kırmızı frenk üzümü (Lambardi ve ark, 2015), şeker otu (Sacco ve ark, 2015), phalaenopsis (Masnoddin ve ark, 2016), vanilya bitkisi (Ramírez-Mosqueda ve Iglesias-Andreu, 2016), muz (Daungban ve ark, 2017), bambu (Gutiérrez ve ark, 2016), su oku bitkisi (Meiping ve ark, 2016), mersin bitkisi (Biçen, 2017), gerbera (Frómata ve ark, 2017), bitkilerinin Plantform biyoreaktör sisteminde rejenerasyonu incelenmiştir.

Cavallaro ve ark (2015), keçiboynuzunun *in vitro* koşullarda farklı kültür ortamlarının mikroçoğaltıma etkisini araştırmak amacıyla katı kültür ve Plantform biyoreaktör sistemlerini kıyaslamışlardır. Çalışma sonunda Plantform biyoreaktör sisteminden elde edilen bitkilerde bitki boyu, taze ve kuru ağırlık parametreleri katı kültürlerden elde edilen parametrelere göre daha yüksek oranda sonuçlar vermiştir. Bu tez çalışmasında Plantform biyoreaktör sisteminin farklı üç keçiboynuzu genotipinin mikroçoğaltımı ve köklenmesi üzerine etkinliği agar ile katılaştırılmış klasik doku kültürü yöntemi ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Tez çalışmasında elde edilen bulgulara göre Plantform biyoreaktör sistemi Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerinin mikroçoğaltımında kardeşlenme katsayısı açısından katı kültür ortamına göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Plantform biyoreaktör sistemi Kıbrıs genotipi için bitki boyu (cm) açısından daha iyi sonuç verirken, Monoik ve Adana genotipleri için istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Buna rağmen bu iki genotipe ait bitkicikler Plantform sisteminde yaprak sayısı ve kalitesi bakımından daha iyi gelişme göstermiştir.

Goncalves ve ark (2005), keçiboynuzu genotiplerinde mikroçoğaltım ve köklendirme denemeleri yapmış, çalışmalarında MS, ½ MS ve MS+N besin ortamlarında eksplantları kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda MS+N besin ortamında kültüre alınan sürgünlerin %50'sinin köklendiğini belirtmişlerdir. Sürgünlerin temin edildiği ana bitkilerden alınan yaprak örnekleri ile makro besin madde içeriği analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlara göre yeni bir besin ortamı hazırlamışlardır. Modifiye edilen ortamda kültüre alınan bitkilerin %80'nin de köklenme sağlamışlardır. Bu tez çalışmasında MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarında (0, 1.0 ve 2.0 mg/L) kültüre alınan bitkiciklerde önemli bir köklenme başarısı sağlanamamıştır. Tez çalışması kapsamında köklenmeyi teşvik etmek amacıyla besin ortamlarında ve miktarlarında, bitki büyüme düzenleyicilerinde ve oranlarında ve çevresel faktörlerde yapılan modifikasyonlara rağmen köklenme sağlansa da istatistiksel açıdan istenilen başarı elde edilememiştir. Bu durum

keçiboynuzunun köklenme güçlüğü çekmesinde genotiplerin genetik yatkınlığı ile ilgili olduğunu ortaya koymaktadır. Keçiboynuzu yeşil aksamında kaempferol, tannik asit, kateşin hidrat ve polidatin gibi birçok fenolik bileşik bulunmaktadır (Rtibi ve ark, 2017). Kültüre alınan genotiplerin salgıladığı bu biyokimyasallar kültür ortamını kontamine ederek besin ortamının yapısını bozmaktadır. Bu durum kültür ortamında bulunan besin elementlerinin ve bitki büyüme düzenleyicilerinin bitkiler tarafından yararlanma oranını azaltarak keçiboynuzu genotiplerinin vejetatif kök gelişimine engel olduğu ihtimalini desteklemektedir.

Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde uygulanan teknik parametreler (daldırma, havalandırma vb) gelişme ortamlarının optimizasyonunda etkili olmaktadır. Bunun yanında kültür kaplarına transfer edilen eksplant sayısı da bitki gelişimini etkilemektedir. Bu duruma bağlı olarak optimum daldırma - havalandırma süreleri ve başlangıç eksplant sayısında net bir ölçüt söylenemez. Gatti ve ark (2015) *Quercus robur* L. bitkisinin *in vitro* koşullarda Platform sisteminde mikroçoğaltımında 8 saatte bir 12 dk ve 16 saatte bir 8 dk olmak üzere iki farklı daldırma süresi uygulamışlardır. Çalışmada 8 saatte bir 12 dk'lık daldırma süresinin bitki gelişimi üzerine daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Marbun ve ark (2015) Platform biyoreaktör sisteminde kültüre aldıkları Afrika yağ palmiyesi (*Elaeis guineensis* Jacq.) bitkisinin embriyojenik kallus oranını artırmak amacıyla yaptıkları çalışmada 1 saatte bir 3 dk, 3 saatte bir 3 dk ve 6 saatte bir 3 dk olmak üzere daldırma sürelerini uygulamışlardır. Çalışma neticesinde en yüksek embriyojenik kallus oluşumunun 3 saatte bir 3 dk daldırma süresinden elde edildiğini belirtmişlerdir. Zhang ve ark (2017) *Pinellia ternate* bitkisinde farklı daldırma sürelerinin kardeşlenme katsayısına ve gelişmesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Buna ek olarak kültür kaplarına alınan eksplant sayısının bitki gelişimine etkilerini incelemek amacıyla kültür kaplarına farklı sayılarda eksplant koymuşlardır. Çalışma sonunda, bitki çoğalması ve büyümesi üzerinde en başarılı daldırma süresini 12 saatte bir 5 dk olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca en fazla yaş ağırlık kültür kaplarına 60 eksplant konulduğu zaman elde edilirken, kültür

kaplarına 80 ve 100 eksplant koyulduğunda bitkilerin 60 eksplant koyulan sisteme göre daha zayıf gelişme gösterdiğini belirtmişlerdir. Pramita ve ark (2018), *Gynura procumbens* sürgün kültüründe sürgünlerin içerdiği biyokütle ve flavonoidin üretimindeki değişkenliğe kültür ortamının içeriği ve daldırma sürelerinin etkisini araştırmak amacıyla geçici daldırma sisteminde farklı büyüme düzenleyici kombinasyonları ve farklı daldırma süreleri (3 saatte bir 5 dk ve 12 saatte bir 15 dk) uygulamışlardır. Kültür sonucunda en yüksek flavonoidin oranı 12 saatte bir 15 dk daldırma süresinde elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında kullanılan üç farklı keçiboynuzu genotipi için Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte bir 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte bir 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım denemelerinde 60 bitki kültüre alınmıştır. Biçen ve ark, (2017) tarafından mersin bitkisinde yürütülen çalışmalarda Plantform biyoreaktör sisteminde kültür kaplarına farklı sayılarda eksplant konularak bitki gelişimlerini incelemiş, 500 ml sıvı besin ortamlarına 100, 120 ve 150 bitki konulduğu zaman bitki gelişiminin 60 ve 80 bitki konulan kültür kaplarına göre daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. Elde edilen bu verilere göre geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde kültüre alınan eksplant sayısının her bitki türü için optimize edilmesi bitki gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bitki doku ve organ kültüründe, türe bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte uzun süre bitki büyüme düzenleyici içeren ortamlarda kültüre alınan bitkilerde bitki genetiğinde yapısal değişimler meydana gelebilmektedir. Bu olay somaklonal varyasyon olarak adlandırılmaktadır. Klonal çoğaltımın esas olduğu bitki doku ve organ kültüründe bu olay vejetatif çoğaltıma engel teşkil etmektedir. Plantform geçici daldırma sistemlerinin klasik katı kültür sistemlerine göre büyük bir avantaj sağladığı kültür sürelerinin daha kısa tutulması ve altkültür sayılarının daha aza indirgenmesi bitkilerde meydana gelebilen bu sorunu azaltmaktadır (Biçen, 2017).

Cengiz, (2018), turunçgil anaçlarında yaptığı mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmalarında katı kültür ile Plantform biyoreaktör sistemlerinin

rejenerasyona etkilerini incelemiştir. Yapılan çalışmada katı kültürde elde edilen optimum besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyicileri referans alınarak Platform biyoreaktör sisteminde bitkileri kültüre almıştır. Çalışma boyunca farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında kültüre alınan bitkilerde, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve alt kültür sürelerinin rejenerasyon sonucunda elde edilen bitkilerin genetik yapılarında herhangi bir değişmeye sebep olup olmadığını turunçgiller için polimorfik özellik taşıyan 22 SSR markırı ile moleküler testleri yapmış ve taramalar sonucunda somaklonal varyasyona rastlanmadığını belirtmiştir. Geliştirilen biyoreaktör sistemlerinin katı kültür sistemlerine göre daha etkin ve uygulanabilir olmasına karşın Platform ve diğer geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde bitki büyüme düzenleyicilerinin ve kültür sürelerinin etkisiyle bitkilerde meydana gelebilecek somaklonal varyasyonun kontrolüne yönelik çalışmalar sınırlı kalmıştır. Bu tez çalışmasında keçiboynuzu genotipleri için geliştirilen SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda Platform sisteminde çoğaltılan bitkilerde somaklonal varyasyonun bulunmadığı moleküler çalışmalarla belirlenmiş olup, başlangıç materyali ile herhangi bir genetik farklılık görülmemiştir. Bu sonuç Platform sisteminin keçiboynuzu genotiplerinin klonal çoğaltımında kullanılabilir bir yöntem olduğunu desteklemektedir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ticari öneme sahip yüksek verim ve kalitede meyve oluşturan Kıbrıs ve Monoik genotipleri ve morfolojik açıdan iyi bir taç oluşumuna sahip peyzaj amaçlı kullanılan Adana genotipinin katı kültür ve Platform sistemlerinde mikroçoğaltım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kullanılan üç genotip içinde Platform biyoreaktör sistemi katı kültür teknikleriyle kıyaslanmıştır. Çalışmada her genotip için ayrı ayrı iki farklı katı kültür mikroçoğaltım denemesi yürütülmüştür. I. katı kültür mikroçoğaltım denemesinde MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile bitki büyüme düzenleyicilerinden BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) ve 2,4-D (0, 0.5, 1.0 mg/L)'nin kombinasyonları kullanılmıştır. Bu denemelerde Kıbrıs ve Monoik olarak adlandırılan genotipler yer alırken, Adana genotipi çalışmaya daha sonra dahil edilmiştir. Yapılan bu deneme de Kıbrıs genotipine ait eksplantların %95'inde ve Monoik genotipine ait eksplantların %97'inde kallus oluşumu meydana gelmiştir. Bitkilerde herhangi bir sürgün gelişimi olmadığı görülmüştür. II. katı kültür mikroçoğaltım denemesinde MS, ½ MS ve WPM besin ortamları olmak üzere üç farklı besin ortamı ve BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) ve GA₃ (0, 0.1, 0.5 mg/L) grubu bitki büyüme düzenleyicilerinde her üç genotipe ait eksplantlar kültüre alınmıştır. Çalışmada kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitkicik) ve bitki boyu (cm) parametreleri incelenmiştir. Katı kültür mikroçoğaltım sonuçları göz önüne alındığında, her üç genotip içinde MS besin ortamı başarılı bulunmuştur. Genotip faktörü bitki doku kültürü çalışmalarında gelişmeyi etkileyen önemli bir etkidir. Bu çalışmada en iyi kardeşlenme ve bitki gelişimini Kıbrıs genotipi için MS besin ortamında 1.5 mg/L BA+ 0.5 mg/L GA₃, Monoik genotipi için MS besin ortamında 2 mg/L BA+ 0.5 mg/L GA₃ ve Adana genotipi için ½ MS besin ortamında 0.5 mg/L BA+ 0.5 mg/L GA₃ bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonundan elde edilmiştir. Farklı besin ortamlarının, bitki büyüme düzenleyicilerinin ve altkültürlerin etkisi ile genotiplerde meydana gelebilme ihtimaline karşı hem katı kültür hem de Platform sisteminden elde edilen

bitkiciklerde SSR markır sistemi kullanılarak incelenen bitkilerde genetik kararlılık tespit edilmiştir.

Çalışmada gerçekleştirilen I. katı kültür mikroçoğaltım denemesinde MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile bitki büyüme düzenleyicilerinden BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) ve 2,4-D (0, 0.5, 1.0 mg/L)'nin kombinasyonları kullanılmış olup, bu denemeler neticesinde eksplantlarda yoğun bir şekilde kallus oluştuğu görülmüştür. Keçiboynuzu mikroçoğaltım çalışmalarında indirekt sürgün oluşumunu teşvik etmek adına elde edilen bu kalluslardan, hormonsuz veya farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren besin ortamlarında kültüre alınarak sürgün elde edilebilir. Bu tez çalışmasında indirekt organogenesis çalışmalarına yer verilmemesine karşın elde edilen bu kallus yapıları farklı keçiboynuzu çalışmalarında eksplant kaynağı olarak kullanılabilir.

Çalışmada 2016 Kasım ayı ve 2017 Mayıs ayında alınan başlangıç materyallerinin mikroçoğaltım performansları gözlemsel olarak kıyaslanmıştır. İncelemeler sonucunda, bahar döneminde (Mayıs 2017) alınan eksplantların kardeşlenme oranı ve bitki gelişimleri güz döneminde (Kasım 2016) alınan eksplantların kardeşlenme oranı ve bitki gelişiminden daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Bu gelişim farkının aktif büyüme döneminde bitki bünyesinde bulunan uyarıcı biyokimyasalların etkisiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Ayrıca yağış sonrası alınan eksplantlarda meydana gelen kontaminasyon oranı yağış öncesinde alınan eksplantlarda meydana gelen kontaminasyon oranından 5 kat daha fazla olmuştur. Bu durum, yağış ile birlikte bitki sürgünlerinde artan nem miktarının mikroorganizmaların çoğalması ve yayılmasına olanak sağladığı için sebep olduğu düşünülmektedir.

Başlangıç materyallerinin *in vitro* da kültüre alınmadan önce uygulanan sterilizasyon protokolünde cıva klorür oranındaki artışın, kontaminasyon oranını azaltırken, eksplant canlılığında önemli azalışlara sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca sodyum hipoklorit oranındaki artışın ve uygulama sürelerinin kontaminasyon oranını azaltırken eksplant canlılığında da azalışa sebep olduğu

tespit edilmiştir. Kontaminasyon oranının azaltılması ve eksplant canlılığının artırılması için yapılan sterilizasyon çalışmalarında en iyi protokol: 30 dk boyunca çeşme suyu altında yıkama, 0.3 mg/L cıva klorür ($HgCl_2$) solüsyonunda 15 dk bekletme, sonrasında %70 oranında etil alkol çözeltisinde 3 dk bekletme ve son olarak %20 oranında sodyum hipoklorit ($NaClO$) içeren solüsyonda 15 dk süre boyunca bekletme sonucunda elde edilmiştir. Bu uygulama ile %3 oranında kontaminasyon görülürken eksplantların tamamının canlı kaldığı görülmüştür.

Tez çalışmasında kullanılan tüm genotiplerin bitki boyu (cm) ve kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitki) verilerinin Plantform sisteminde katı kültüre kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Katı kültür köklenme denemesinde MS, $\frac{1}{2}$ MS ve WPM besin ortamları ile oksin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden NAA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) ve IBA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) içeren ortamlarda bitkicikler kültüre alınmıştır. Bu uygulamada Monoik genotipine ait bitkiciklerde köklenme sağlansa da istatistiksel açıdan önemli bulunamamıştır.

Köklendirmeyi teşvik etmek amacıyla: MS besin ortamında NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerinin oranları artırılmış (0, 1.0, 5.0 ve 10.0 mg/L) ve ortamlar aktif karbonlu (3 mg/L) ve aktif karbonsuz olmak üzere hazırlanarak köklendirme denemesi tekrarlanmıştır. Yapılan farklı bir denemede, 2 kuvvetli MS ve Rugin Olive Medium besin ortamında NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmış (0, 1.0 ve 2.0 mg/L) ayrıca ortama toz haline getirilmiş keçiyoynuzu tozu (20 g/L) eklenerek bitkiciklerin köklenmesi teşvik edilmeye çalışılmıştır. Köklendirmeyi sağlamak amacıyla yapılan farklı bir denemede, mikroçoğaltımdan elde edilen bitkiciklerin uzun süre boyunca bitki büyüme düzenleyicilere maruz kaldığı göz önüne alınarak bitkicikler hormonsuz MS besin ortamında dinlenmeye alınmıştır. Bir aylık inkübasyon sonrasında bitkicikler $\frac{1}{2}$ MS besin ortamında NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak (0, 1.0, 5.0 ve 10.0 mg/L) hazırlanan ortamlara transfer edilmiştir. Bitkiciklerde strese bağlı olarak köklenmenin teşvik edilmesi amacıyla tüplerde bulunan bitkicikler bir

hafta süreyle karanlık iklimlendirme ortamında tutulmuştur. Köklendirmeyi teşvik etmek amacıyla yapılan bir başka denemede ½ MS besin ortamında NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmış (0, 1.0 ve 2.0 mg/L) ve ortama ek olarak makro besin elementi olan azot ilavesi yapılmıştır. Azot kaynağı olarak KNO₃ (202.31 mg/L) kullanılmıştır. Köklendirmeyi sağlamak amacıyla yapılan bir başka denemede MS besin ortamında IBA bitki büyümesi düzenleyicisi kullanılmış (10 mg/L) ve ortama ek olarak MgSO₄ (36.674 g/L) ve KNO₃ (202.31 mg/L) ilave edilmiştir. Köklenmeye teşvik etmek amacıyla gerçekleştirilen bir başka denemede, hormon free MS besin ortamı kullanılmış ve 0,7 cm uzunlukta eksplantlar 1000 ppm oranındaki IBA çözeltisine 3 dakika boyunca daldırılmıştır. Daldırma sonrasında bitkicikler hormon free MS besin ortamlarına transfer edilmiştir. Yapılan bu protokollerde bitkiciklerde vegetatif açıdan önemli gelişmeler olsa da köklendirme konusunda her üç genotip içinde başarı sağlanamamıştır. Doku kültürü çalışmaları incelendiğinde keçiboynuzunun *in vitro*'da köklendirilmesi ile alakalı başarılı çalışmalar bulunmaktadır. Bitkilerin *in vitro* rejenerasyonunda genotip faktörü önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu tez çalışmasında köklendirmeyi teşvik etmek amacıyla yapılan birçok denemede genotiplerin köklenmeye karşı düşük oranda cevap vermesinin genotiplerin genetik yatkınlığına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Keçiboynuzu *in vitro* köklendirilmesi ile ilgili yapılması düşünülen çalışmalarda farklı oksin grubu büyüme düzenleyicilerinin ve farklı dozlarının köklenmeye etkileri araştırılmalıdır.

Doku kültüründe klonal çoğaltmanın en büyük avantajı üretilen tüm bitkilerin ana bitkiyle aynı genetik yapıya sahip olarak üretilmesidir. Besin ortamları, bitki büyüme düzenleyicileri, alt kültür çalışmaları ve diğer uygulamalar bitkilerde strese bağlı olarak somaklonal varyasyonlara neden olabilmektedir. Keçiboynuzunda *in vitro* klonal çoğaltmada bu sorunun ortaya çıkma ihtimaline karşı, doku kültürü çalışmalarının tamamlanmasının ardından keçiboynuzu genotiplerinin kararlılığının belirlenmesi amacıyla moleküler çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan genotiplere ait eksplantlardan alınan bitki

dokuları ile DNA izolasyonu yapılmış ve 9 adet keçiboynuzu için polimorfik SSR markırları ile moleküler çalışmalar tamamlanmıştır. Başlangıç materyali ile katı kültür ve Plantform sisteminde kültüre alınan bitkilerden elde edilen test sonuçlarına göre, her üç genotip içinde herhangi bir genetik farklılık tespit edilmemiştir. Bu tez çalışması neticesinde yapılan moleküler çalışmalar ile Plantform biyoreaktör sisteminin bu yönüyle doku kültürü çalışmalarında uygulanabilir bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur.

Tez çalışmasında bitkisel materyallerin gelişimlerine ait parametrelerden bitki boyu (cm), çoğalma katsayısı (kardeş/bitkicik) ve bitki kalitesi göz önüne alındığında, Plantform biyoreaktör sisteminin katı kültür sistemine nazaran oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, Plantform biyoreaktör sisteminin keçiboynuzu mikroçoğaltım çalışmalarında kalite parametreleri için beklentileri karşılayabilir nitelikte olduğunu ispatlamaktadır. Keçiboynuzu ve diğer türler için biyoreaktör sistemin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla planlanan çalışmalarda, bu tez çalışmasında incelenen parametrelere ek olarak farklı parametrelerinde incelenmesi tavsiye edilmektedir. Yeni nesil doku kültürü teknikleri içinde yer alan Plantform geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar göz önüne alındığında, farklı daldırma ve havalandırma sürelerinin bitki gelişimine etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Plantform biyoreaktör sistemleri kullanılarak yapılacak keçiboynuzu mikroçoğaltım çalışmalarında optimum daldırma ve havalandırma sürelerinin belirlenmesi amacıyla çalışmaların yapılması önerilmektedir. Tez çalışması öncesinde yapılan ön denemelerde Plantform kültür kaplarına transfer edilen bitki sayısı artışının bitki gelişiminde uyarıcı etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre keçiboynuzunda yapılması planlanan mikroçoğaltım çalışmalarında Plantform kaplarına daha fazla bitkisel materyal konularak bu durumun etkisi araştırılabilir. Ayrıca yapılan ön denemelerde Plantform kaplarına keçiboynuzu genotipleri ile Mersin bitkisi (*Myrtus communis* L.)'ne ait eksplantlar aktarılmış ve bitkilerde morfolojik açıdan olumlu gelişmeler görülmüştür. Bu durum bitkilerin

salgıladıkları biyokimyasalların sinerjistik etki sağlayarak kültür ortamının optimize edilmesine olumlu etki sağladığı düşüncesini desteklemektedir.

Bu ve benzeri çalışmalar göz önüne alınarak Plantform biyoreaktör sistemlerinin farklı biyoreaktör sistemleri ile kıyaslanması ve uygulanan teknik parametrelerdeki farklılıkların bitki gelişiminde etkinliğinin belirlenmesi mümkündür. Plantform biyoreaktör sisteminin kullanılabilirliği, işgücü ve zamandan tasarruf sağlaması, üretimde girdi maliyetlerinin azaltılması ve daha etkili kitle üretiminin mümkün olması yönüyle katı kültürlerle kıyasla iyi bir potansiyele sahip olduğu bu tez çalışmasıyla ortaya konmuştur. Yapılan bu tez çalışmasından elde edilen veriler neticesinde, Plantform biyoreaktör geçici daldırma sisteminin keçiyoynuzu mikroçoğaltımında kalite ve kantite yönünden uygulanabilir olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Ahraz A., 2003. Locust Bean Gum (Keçiboynuzu Zamkı) E-410'un Türkiye'de Üretimi. Gıda Teknolojisi, 7, 36-37.
- Anonim, 2017. Food and Agriculture Organization of The United Nations Database. <http://www.fao.org/home/en/>, Erişim Tarihi: 15.11.2018.
- Anonim, 2018. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr> Erişim Tarihi: 15.11.2018.
- Anonim. 2017. Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı. Araştırma Enstitüsü-Bakış Dergisi, Sayı:3, Nüsha:5.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., 2004. Bitki Biyoteknolojisi. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları.
- Benelli, C., De Carlo, A., 2018. *In vitro* multiplication and growth improvement of *Olea europaea* L. cv Canino with temporary immersion system (Plantform™). *3 Biotech*, 8(7), 317.
- Benelli, C., Fernanda, C. M., De Carlo, A., 2015. Plant Form, a temporary immersion system, for *in vitro* propagation of *Myrtus communis* and *Olea europaea*. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants Abstract Book.
- Bıçen, B., 2017. Mersin Bitkisinin (*Myrtus communis* L.) Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Çoğaltılması ve Köklendirilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Brugaletta, M., La Malfa, S., Gentile, A., Almeida, R., Romano, A., 2009. *In vitro* Culture Establishment of *Ceratonia siliqua* (L.) Mature Trees from Cultivars of Different Mediterranean Countries. III. International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants, Acta Horticulturae:812:113-120

- Büyükünal Bal, E., 2003. Arpa Mikrosatellitlerinin Ekmeklik Buğdaydaki Genetik Çalışmalar İçin Kullanım Olanaklarının Araştırılması. KSÜ, Fen ve Mühendislik Dergisi, 6(2):34-40.
- Cabasson, C., Alvard, D., Dambier, D., Ollitrault, P., Teisson, C., 1997. Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 50(1), 33-37.
- Canhoto, J. M., Rama, S. C., Cruz, G. S., 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 42(6), 514-519.
- Carimi, F., Dilorenzo, R., Crescimanno, F., 1997. Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Carob (*Ceratonia siliqua* L.) from ovule culture. Scientia Horticulturae, 70:1- 73-79
- Cavallaro, V., Scalisi, C., Saita, A., Malvuccio, A., La Rosa, S., Pellegrino, A., Barbera, A. C., 2015. Improving in vitro mass proliferation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) from seedling apices by temporary immersion systems. In VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155:221-226.
- Cengiz, M., 2018. Bazı Turunçgil Genotiplerinin Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Mikroçoğaltımı ve Genetik kararlılığının Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Çürük, P., İzgü, T., Şimşek, Ö., Çömlekçiöglü, S., Mendi, Y. Y., 2017. The effects of different explants, basal media and growth regulators on regeneration of carob (*Ceratonia siliqua* L.). Journal of Applied Biological Sciences, (3), 10-19.
- Custodio, L., Romano, A., 2006. *In vitro* Morphogenesis in Zygotic Embryo Cultures of Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.). Proceedings of the Vth International Symposium on *In vitro* Culture and Horticulture Breeding, Vols 1 and 2, Acta Horticulturae:725:477-481.

- Daungban, S., Pumisitapon, P., Topoonyanont, N., and Poonnoy, P., 2017. Effects of Explants Division by Cutting, Concentrations of TDZ and Number of Sub-culture Cycles on Propagation of 'Kluai Hom Thong' Banana in A Temporary Immersion Bioreactor System. *Thai Journal of Science and Technology*, 6(1):89-99.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B., 1983. A Plant DNA Mini Preparation: Version 11. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19-21.
- Ergül, A., 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs.) genomic DNA Parmak İzi Analizi ile Moleküler Karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Escalant, J. V., Teisson, C., Cote, F., 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *In Vitro-Plant*, 30(4), 181-186.
- Eti, S., 2015. Bahçe Bitkilerinde Dölllenme Biyolojisi. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ders notu.
- Etienne, H., Berthouly, M., 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69.3: 215-231.
- Etienne, H., Berthouly, M., 2006. Bioreactors in coffee micropropagation. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18.1: 45-54.
- Frómata, O. M., Morgado, M. M. E., Da Silva, J. A. T., Morgado, D. T. P., Gradaille, M. A. D., 2017. *In vitro* Propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a Temporary Immersion Bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-9.
- Gatti, E., Ozudogru, A., Lambardi, M., and Sgarbi, E., 2015. Comparison between a conventional culture system and Plantform bioreactor in *Quercus robur* micropropagation. 6th International Symposium on Production a Establishment of Micropropagated Plants Abstract Book.

- Goncalves, S., Correia, Pj., Martins-Loucao, Ma., Romano, A, 2005. A New Medium Formulation for *In vitro* Rooting of Carob Tree Based on Leaf Macronutrients Concentrations. *Biologia Plantarum*, 49:2-277-280
- Gutiérrez, L.G., López-Franco, R., and Morales-Pinzón, T., 2016. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) Using A Temporary Immersion System RITA®. *African Journal of Biotechnology*, 15(28):1503-1510.
- Hakim, L., Islam, M. R., Mamun, A. N. K., Ahmed, G., Khan, R., 2010. Clonal Propagation of Carob (*Ceratonia siliqua* L., Fabaceae). *Bangladesh Journal of Botany*, 39:1-15-19.
- Hoisington, D., 1992. Laboratory protocols. CIMMITY Applied Molecular Genetics Lab. Mexico, D.F. CIMMITY.
- Kaçar, Y. A., Yeşiloğlu, T., Yıldırım, B., Şimşek, Ö., İncesu, M., Kamiloğlu, M., Tuzcu, Ö., 2009. Bazı Turunçgil Anaçlarının SSR Markırları ile Moleküler Tanımlanması. *Alatarım Dergisi*, 8(2):8-16.
- Ksia, E., Harzallah-Skhiri, F., Verdeil, J. L., Gouta, H., Alemanno, L., Bouzid, S., 2008. Somatic embryo production from immature seeds of carob (*Ceratonia siliqua* L.): histological evidence. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(4), 401-406.
- Kokotkiewicz, A., Bucinski, A., Luczkiewicz, M., 2015. Xanthone, Benzophenone and Bioflavonoid Accumulation in *Cyclopia genistoides* (L.) Vent.(honeybush) Shoot Cultures Grown on Membrane Rafts and in A Temporary Immersion System. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(1):373-378.
- Lambardi, M., Roncasaglia, R., Bujasha, D., Baileiro, F., Correia Da Silva, D. P., Ozudogru, E. A., 2015. Improvement of shoot proliferation by liquid culture in temporary immersion. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants Abstract Book.

- Malfa, S., Curro, S., Douglas, A., Brugaletta, M., Caruso, M., Gentile, A., 2014. Genetic diversity revealed by EST-SSR markers in carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*. 08/2014; 55:205–211. DOI: 10.1016/j.bse.2014.03.022.
- Marbun, C. L. M., Toruan-Mathius, N., Utomo, C., Liwang, T., 2015. Micropropagation of embryogenic callus of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using temporary immersion system. *Procedia Chemistry*, 14, 122-129.
- Masnoddin, M., Repin, R., Aziz, Z.A., 2016. Micropropagation of an Endangered Borneo Orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* Callus Using Temporary Immersion Bioreactor System. (*Thai Agricultural Research Journal*), 34(2):161-171.
- Meiping, G., Zhicheng, L., Chi, Z., Wen, J., Fanglian, H., Liu, Y., Shaolong, W., 2016. Optimization of *Sagittaria sagittifolia* Rapid Propagation in Temporary Immersion Bioreactors System. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 29(11):2704-2708.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Naghmouchi S., Khouja ML., Romero A., Tous J., Boussaid M., 2009. Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. *Scientia Horticulturae* 121: 125-130.
- Naghmouchi, S., Khouja, Mohamed L., Romero, A., Boussaid, M., 2012. Micropropagation of Carob, *Ceratonia siliqua* L., by apex culture. *Acta Botanica Gallica*, 159:3, 357-361.
- Naghmouchi, S., Khouja, Mohamed L., Rejeb, Mohamed N., Boussaid, M., 2008. Effect of Growth Regulators and Explant Origin on *In vitro* Propagation of *Ceratonia siliqua* L. via cuttings. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement*, 12:3, 251-258.

- Pramita, A. D., Kristanti, A. N., Utami, E. S. W., Manuhara, Y. S. W., 2018. Production of biomass and flavonoid of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr shoots culture in temporary immersion system. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
- Radi, A., Echchgadda, G., Ibjibjen, J., Rochd, M. 2013. *In vitro* propagation of Moroccan carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11(1), 1103-1107.
- Ramírez-Mosqueda, M.A., Iglesias-Andreu, L.G., 2016. Evaluation of Different Temporary Immersion Systems (BIT®, BIG, and RITA®) in The Micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(2):154-160.
- Romano, A., Barros, S., Martins-Loucao, Ma., 2002. Micropropagation of the Mediterranean Tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 68:1,35-41.
- Rtibi, K., Selmi, S., Grami, D., Amri, M., Eto, B., El-Benna, J., Marzouki, L., 2017. Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 522-528.
- Sacco, E., Mascarello, C., Pamato, M., Musso, V., Ruffoni, B., 2015. Evaluation of Temporary Immersion System for *In vitro* Propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Acta Horticulturae*, 1083:327-333.
- Sekeri-Pataryas, K.H., Mitrakos, K.A., Georgi, M.K., 1973. Yields of fungal protein from carob sugars. *Econ. Bot.* 27: 311-319.
- Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Luczkiewicz, M., Ekiert, H., 2017. Schisandralignans Production Regulated by Different Bioreactor Type. *Journal of Biotechnology*, 247: 11-17.
- Takayama, S., Akita, M. 2005. Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. In *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 61-78). Springer, Dordrecht.

- Takayama, S., Misawa, M., 1981. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. *Plant Cell Physiol.* 22: 461-467.
- Tunalıoğlu, R., Özkaya, M.T., 2003. Keçiboynuzu. *Tarımsal Ekonomi.*
- 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.
- Yaman, C., 2011. Doku Kültürü İle Düşük Maliyetli Tohumluk Patates (*Solanum tuberosum* L.) Üretiminin Araştırılması. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Yenice, Z., 2010. Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktörlerle Su Mercimeği (*Lemna minor* L.) Bitkisinin *In vitro* Çoğaltımı. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Zhang, B., Hu, Y., Jia, M., Jin, L., Xu, D., Chen, J., 2017. Micropropagation of *Pinellia ternata* (Thunb.) Berit. Plantlets Using Temporary Immersion Bioreactors. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 11(1):59-65.



ÖZGEÇMİŞ

Mustafa Alparslan UMARUSMAN, 1989 yılı Kadirli doğumlu olup öğrenim hayatına Adana' da başlamıştır. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden mezun olmuştur. 2013-2014 eğitim döneminde Mediterranean Agronomic Institute of Bari CIHEAM IAMB/İtalya'da "Integrated Pest Management (IPM)" konusunda tezsiz master çalışmasını tamamlamıştır. 2015 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı ve Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda yüksek lisans çalışmalarına başlamıştır. 2018 yılında Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamlamıştır. 2016 yılında Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi, Tarım ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümünde araştırma görevlisi olarak akademik hayatına başlamış ve halen bu görevini sürdürmektedir.