**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Melike CENGİZ**

# BAZI TURUNÇGİL GENOTİPLERİNİN KLASİK VE YENİ NESİL DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE MİKROÇOĞALTIMI VE GENETİK KARARLILIĞININ BELİRLENMESİ

**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ADANA-2018**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# BAZI TURUNÇGİL GENOTİPLERİNİN KLASİK VE YENİ NESİL DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE MİKROÇOĞALTIMI VE GENETİK KARARLILIĞININ BELİRLENMESİ

**Melike CENGİZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez 08/08/2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

| | | |
|---|---|---|
| ..... | ..... | ..... |
| Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR<br>DANIŞMAN | Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ<br>ÜYE | Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU<br>ÜYE |

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
**Kod No:**

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

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.**
**Proje No: FYL-2016-6482**

**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

## BAZI TURUNÇGİL GENOTİPLERİNİN KLASİK VE YENİ NESİL DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE MİKROÇOĞALTIMI VE GENETİK KARARLILIĞININ BELİRLENMESİ

**Melike CENGİZ**

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

Danışman : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Yıl: 2018, Sayfa: 75
Jüri : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU

Tez çalışmasında turunçgiller için önemli ve yaygın olarak kullanılan 'Tuzcu 31-31 turuncu' ve 'C-35 sitranjı' anaçlarının, Plantform biyoreaktör sistemi ve katı besin ortamlarında karşılaştırmalı olarak mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmaları yürütülmüştür. Öncelikle turunçgil anaçlarının katı kültür mikroçoğaltım denemeleri için, MS ve WPM besin ortamları ile BAP (0, 1.0, 2.0 mg/L), Kinetin (0, 0.5, 1.0 mg/L) ve 2IP (0, 1.0, 2.0 mg/L) denenmiştir. Katı kültür köklenme denemeleri için MS, ½ MS, WPM besin ortamları ile NAA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) ve IBA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) denenmiştir. Her iki genotip içinde en iyi mikroçoğaltım sonuçları 2.0 mg/L BAP içeren MS besin ortamından ve en iyi köklenme sonuçları 0.5 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamından elde edilmiştir. Mikroçoğaltım ve köklenme için belirlenen en iyi besin ortamı içeriği ile Plantform sisteminde çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, Tuzcu 31-31 turuncu çoğaltma ortamında Plantform sistemi bitki boyu, çoğalma katsayısı ve bitki kalitesi bakımından katı kültür sistemine göre daha iyi sonuç vermiştir. Köklenme ortamında Plantform sistemi kök sayısı, kök uzunluğu, bitki boyu ve köklenme yüzdesi bakımından katı kültür besin ortamına göre daha avantajlı bulunmuştur. C35 sitrancında ise çoğaltma ortamında Plantform ve katı kültür arasında istatistiksel farklılık görülmemekle birlikte, köklendirme ortamında kök uzunluğu, bitki boyu ve köklenme yüzdesi bakımından Plantform sisteminde katı kültüre göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda da Plantform sisteminde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik açılımın olmadığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Plantform Geçici Daldırmalı Biyoreaktör Sistem, BAP, NAA, MS, Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı

## ABSTRACT

## MSc THESIS

**MICROPROPAGATION OF SOME CITRUS GENOTYPS WITH CLASSICAL AND NEW GENERATION TISSUE CULTURE TECHNIQUES AND DETERMINATION OF GENETIC STABILITY**

**Melike CENGİZ**

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

Supervisor : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Year: 2018, Pages: 75
Jury : Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU

In this study, 'Tuzcu 31-31' and 'C35 Citrange' rootstocks, which are important and widely used for citrus, were carried out in comparative propagation and rooting studies in the Plantform system and solid medium. First of all, micropropagation and rooting of citrus rootstocks were evaluated in solid MS and WPM media supplemented with BAP (0, 1.0, 2.0 mg / L), Kinetin (0, 0.5, 1.0 mg / L) and 2IP (0, 1.0, 2.0 mg / L) for micropropagation, in MS, ½ MS and WPM media supplemented with NAA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg / L) and IBA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg / L) for rooting. Based on the solid media, the best results in both genotypes were obtained from MS medium containing 2 mg / L BAP for micropropagation, ½ MS medium containing 0.5 mg / L NAA for rooting. Micropropagation and rooting studies were carried out in the Plantform system with the best-defined media content. As a result of the study, Plantform system showed better plant growth, multiplication coefficient and plant quality than solid culture system in Tuzcu 31-31 sour orange propagation medium. Plantform system in rooting medium was found to be more advantageous than solid culture nutrient medium in terms of root number, root length, plant height and rooting percentage. In the C-35 citrange , no statistically significant difference was observed between Plantform and solid culture in the replication medium, but better results were obtained in the Plantform system than the solid culture in terms of root length, plant height and rooting percentage. Genetic stability of plants grown and rooted in solid culture and Plantform systems was tested by SSR markers.



**Key words:** Plantform Temporary Immersion Bioreactor Systems, BAP, NAA, MS, Tuzcu 31-31 Sour Orange and C-35 Citrange

## GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Turunçgiller, Dünya'da yetiştiriciliği yapılan en büyük meyve gruplarından biri'dir. Anavatanı Güneydoğu Asya olan turunçgiller günümüzde Dünya'da geniş bir coğrafyaya dağılım göstermiştir. Bu anlamda turunçgiller içerisinde hızlı bir çeşit dinamiğinin var olması, farklı ıslah yöntemleriyle değişik iklim ve toprak koşullarına uyum sağlayabilen anaç ve çeşitlerin elde edilmesi önemli bir etken olmuştur. Tropik ve semitropik kökenli olan turunçgillerin sofralık olarak yetiştiriciliği daha çok subtropik bölgelerde yoğunlaşmış durumdadır. Akdeniz havzası içerisinde yer alan ülkemiz, kaliteli sofralık üretim bakımından uygun ekolojik koşullara sahiptir. Turunçgiller, portakal, limon, mandarin ve altıntop gibi "*Citrus*" cinsine ait türleri içermektedir. Zengin bir C vitamini içeriğine sahip olan turunçgiller insan sağlığı için çok önemlidir. Tüm bu özelliklerinden dolayı *in vitro* koşullarda performansı incelenmesi gereken önemli bir bitki türüdür. Klasik doku kültürü teknikleri olarak adlandırdığımız agar vb ile katılaştırılmış besi ortamları, kitlesel üretimde başarıyı sağlayan ve ticari laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Katı kültürler gerek yüksek işgücü gerek girdi maliyeti ile *in vitro* çalışmaları güçleştirebilmektedir. Katı kültürlere alternatif olarak geçici daldırma yöntemi geleneksel yarı-katı ve sıvı besi ortamlarının avantajlı yönlerini kombine eden bir sistemdir. Geçici daldırma yöntemi ile ilgili pek çok prototip geliştirilmiş olup bunlar arasında "Plantform" sistemi son yıllarda geliştirilen geçici daldırma yöntemi esasına dayanan ve kültür kaplarında bağımsız havalandırmaya odaklanılmıştır.

Tez kapsamında, turunçgiller için önemli ve yaygın olarak kullanılan Tuzcu 31-31 ve C-35 sitranjı anaçlarının *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı, köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması gerçekleştirilmiştir. Katı kültür denemeleri sonrasında belirlenen besin ortamı ile son yıllarda geliştirilen geçici daldırma yönteminin bitki çoğalma ve köklenmesine etkileri incelenmiştir. Geçici daldırma yöntemi olarak Plantform biyoreaktör sistemleri kullanılmıştır.

Plantform biyoreaktör sisteminde bütün denemeler için, daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde MS ve WPM besin ortamları ile BAP (0, 1.0, 2.0 mg/L), KİN (0, 0.5, 1.0 mg/L) ve 2IP (0, 1.0, 2.0 mg/L) denenmiştir. Bitki boyu (cm) ve kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitkicik) parametreleri incelenmiştir. Tuzcu 31-31 genotipi katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda kardeşlenme katsayısının 3.4 (kardeş/bitkicik) ile 2.0 mg/L BAP içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. C-35 sitranjının katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda kardeşlenme katsayısının 13.4 (kardeş/bitkicik) ile 2.0 mg/L BAP içeren 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 sonuçlar ile katı kültür mikroçoğaltım denemelerinin sonuçları karşılaştırıldığında Tuzcu 31-31 turuncunu bitki boyu açısından incelediğimizde katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyu 1.0 cm iken Plantform'da 6.23 cm olarak elde edilmiştir. Kardeşlenme katsayısı ise katı kültür mikroçoğaltım denemesinde 3.4 (kardeş/bitkicik) iken Plantform mikroçoğaltım denemesinde 5.2 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Kardeşlenme katsayısı bakımından Tuzcu 31-31 genotipi katı kültür mikroçoğaltım ve Plantform sistemi mikroçoğaltım denemeleri için istatistiki açıdan fark görülememesine karşın Plantform sisteminde kardeşlenme katsayısı ortalaması daha yüksek bulunmuş olup bitki kalitesinin daha iyi olduğu belirlenmiştir. C-35 sitranjını bitki boyu açısından incelediğimizde katı kültür mikroçoğaltım denemesi bitki boyu 2.1 cm iken Plantform'da 2.0 cm olarak elde edilmiştir. Kardeşlenme katsayısı ise katı kültür mikroçoğaltım denemesinde 13.4 (kardeş/bitkicik) iken Plantform sistemi mikroçoğaltım denemesinde 13.3 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. C-35 sitranjı katı kültür ve Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde istatistiki açıdan fark bulunmamıştır.

Katı kültür köklenme denemeleri için MS, ½ MS, WPM besin ortamları ile farklı oksin konsantrasyonları ve kombinasyonları [NAA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) ve IBA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L)] denenmiştir. Çalışmada bitki boyu (cm), köklenme oranı (%), kök uzunluğu (cm), kök sayısı parametreleri incelenmiştir. Köklenen bitkiler dış koşullara aktarılmıştır. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemeleri sonucunda en iyi köklenme oranı 0.5 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamında %100 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçla beraber 1.0 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamı, 0.5 mg/L NAA içeren WPM ve MS besi ortamları, 1.0 mg/L IBA içeren MS ve ½ MS besin ortamı ve 0.5 mg/L IBA ile 2.0 mg/L IBA içeren ½ MS besin ortamında da %100 köklenme elde edilmiştir. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemeleri sonucunda en iyi köklenme oranı 0.5 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamında %100 olarak tespit edilmiştir.

Katı kültür köklenme denemeleri sonucunda belirlenen en iyi besin ortamı ve hormon konsantrasyonu ile Plantform sisteminde köklenme denemeleri kurulmuştur. Plantform sistemi köklenme denemeleri sonuçları ile katı kültür köklenme denemelerinin sonuçları karşılaştırıldığında, Tuzcu 31-31 turuncu bitki boyu parametresi bakımından katı kültür köklenme denemesinde 1.73 cm sonucu elde edilirken Plantform sistemi köklenme denemesi bitki boyu 3.16 cm bulunmuştur. Kök sayısı kıyaslandığında katı kültürde 3.13 (kök/bitki) iken Plantform sisteminde 3.46 (kök/bitki) bulunmuştur. Kök uzunluğu sonuçlarına bakıldığında katı kültür köklenme denemesinde 6.03 cm iken Plantform'da 6.40 cm olarak bulunmuştur. Köklenme oranlarına baktığımızda ise katı kültürde %91.66 iken Plantform sisteminde %100 olarak elde edilmiştir. Tuzcu 31-31 anacı için katı kültür köklenme denemeleri ile Plantform sistemi köklenme denemelerini kıyasladığımızda bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm) ve köklenme yüzdeleri (%) bakımından Plantform sisteminde daha başarılı sonuçlar elde edilmiş olmanın yanı sıra daha sağlıklı ve kaliteli köklenmiş bitkiler elde edilmiştir.

Plantform köklenme denemeleri sonuçları ile katı kültür köklenme denemelerinin sonuçları karşılaştırıldığında, C-35 sitranjı bitki boyu (cm) parametresi bakımından katı kültür köklenme denemesinde 2.73 cm sonucu elde edilirken Plantform sistemi köklenme denemesi bitki boyu 6.50 cm bulunmuştur. Kök sayısı kıyaslandığında katı kültürde 6.6 (kök/bitki) iken Plantform sisteminde 4.03 (kök/bitki) bulunmuştur. Kök uzunluğu (cm) sonuçlarına bakıldığında katı kültür köklenme denemesinde 1.83 cm iken Plantform'da 6.26 cm olarak bulunmuştur. Köklenme oranlarına baktığımızda ise katı kültürde %91.66 iken Plantform sisteminde %100 olarak elde edilmiştir. C-35 sitranjı için katı kültür köklenme denemeleri ile Plantform sistemi köklenme denemelerini kıyasladığımızda bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm) ve köklenme yüzdeleri (%) bakımından Plantform sisteminde daha başarılı sonuçlar elde edilmiş olmanın yanı sıra daha sağlıklı ve kaliteli köklenmiş bitkiler elde edilmiştir.

Çalışma sonunda Plantform'un, mikroçoğaltım ve köklenme uygulamalarında iyi bir potansiyele sahip olabileceği belirlenmiştir. SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda da katı kültür ve Plantform sisteminde çoğaltılan ve köklendirilen 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 ve köklenme sistemine göre daha az maliyetli, daha az işçilik gerektirdiği, daha kısa zamanda daha kaliteli ve kitlesel çoğaltımın yapılabileceği belirlenmiştir

**TEŞEKKÜR**

Yüksek lisans öğrenimim süresince, tezimin belirlenmesinden sonuçlanmasına kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, akademik alanda gelişimime sonsuz katkı sağlayan ve her alanda örnek aldığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin değerlendirilmesine emek harcayan hocalarım Sayın Prof. Dr. N. Yeşim YALÇIN MENDİ ve Sayın Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında her türlü konuda yardımlarını benden esirgemeyen Dr. Özhan ŞİMŞEK, Dr. Dicle DÖNMEZ ve Biyolog Emine ACAR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında bana yardımcı olan Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanları Dr. Şaire Ramiz TÜRKOĞLU, Ziraat Yüksek Mühendis'i Belgin BİÇEN, Yüksek Lisans öğrencisi Senem UĞUR, Fatma KARA ve Eda ARSLANKILIÇ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan canım annem Ayşe Dilek CENGİZ ve ablam Aylin CENGİZ ULUĞTÜRKAN başta olmak üzere değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

**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 ..... 7
2.1. Turunçgillerde Klasik Yöntemlerle Yürütülen Doku Kültürü Çalışmaları ..... 7
2.2. GDS ile Yürütülen Çalışmalar ..... 10
3. MATERYAL VE METOD ..... 17
3.1 Materyal ..... 17
3.1.1 Bitkisel Materyal ..... 17
3.2 Metod ..... 19
3.2.1 Tohumların Sterilizasyonu ..... 19
3.2.2 Çimlendirme Besin ortamı ..... 19
3.2.3 Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemelerinin Kurulması ..... 21
3.2.4 Katı Kültür Köklendirme Denemelerinin Kurulması ..... 22
3.2.5 Plantform Biyoreaktör Sistemi ile Mikroçoğaltım Denemesinin Kurulması ..... 22
3.2.6 Plantform Biyoreaktör Sistemi ile Köklendirme Denemesinin Kurulması ..... 23
3.2.7 Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması ..... 23
3.2.8 Doku Kültürü Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Bitkilerde Genetik Kararlılığın Belirlenmesi ..... 24

3.2.9 DNA İzolasyonu ..... 25
3.2.10 DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması ..... 25
3.2.11 DNA İzolasyon Aşamaları ..... 26
3.2.12 DNA Kalitesi ve Kantitesinin Belirlenmesi ..... 28
3.2.13 SSR-PCR Koşulları ..... 29
3.2.14 SSR Primerlerinin Belirlenmesi ..... 31
3.2.15 Li-Cor için Poliakrilamid Jel Hazırlığı ..... 31
3.2.16 Li-Cor Elektroforez Koşulları ..... 32
3.2.17 Deneme Planı, İstatistiki Analizler ve İncelenen Kriterler ..... 33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA ..... 35
4.1. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemelerine ait Bulgular ..... 35
4.1.1. Tuzcu 31-31 Turuncuna ait Bulgular ..... 35
4.1.2. C-35 Sitranjına ait Bulgular ..... 38
4.2. Katı Kültür Köklenme Denemelerine ait Bulgular ..... 41
4.2.1. Tuzcu 31-31 Turuncuna ait Bulgular ..... 42
4.2.2. C-35 Sitranjına ait Bulgular ..... 46
4.3. Plantform Mikroçoğaltım Denemesine ait Bulgular ..... 50
4.4. Plantform Köklenme Denemesine ait Bulgular ..... 52
4.5. Moleküler Çalışmalara ait Bulgular ..... 56
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER ..... 63
KAYNAKLAR ..... 67
ÖZGEÇMİŞ ..... 75

**ÇİZELGELER DİZİNİ** **SAYFA**


Çizelge 1.1. Dünya turunçgil üretim miktarının yıllara dağılımı. ..... 1
Çizelge 1.2. Türkiye turunçgil üretim miktarının yıllara dağılımı ..... 2
Çizelge 3.1. MS Besin ortamı içeriği ..... 20
Çizelge 3.2. WPM Besin ortamı içeriği ..... 21
Çizelge 3.3. DNA izolasyon yönteminde kullanılan tampon çözeltisinin içeriği. . ..... 26
Çizelge 3.4. PCR koşullarının içeriği ..... 29
Çizelge 3.5. SSR analizinde kullanılan primer listesi ..... 31
Çizelge 3.6. Poliakrilamid jel için kullanılan kimyasallar ..... 31
Çizelge 4.1. Tuzcu 31-31 turuncunun katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyuna (cm) ait veriler ..... 36
Çizelge 4.2. Tuzcu 31-31 turuncunda katı kültür mikroçoğaltım denemesi kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) ait veriler ..... 37
Çizelge 4.3. C-35 sitranjı katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyuna (cm) ait veriler ..... 39
Çizelge 4.4. C-35 sitranjı katı kültür mikroçoğaltım denemesi kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) ait veriler ..... 40
Çizelge 4.5. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi kök sayısına (adet) ait veriler ..... 42
Çizelge 4.6. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi kök uzunluğu (cm) ..... 43
Çizelge 4.7. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi bitki boyu (cm) verileri ..... 44
Çizelge 4.8. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi köklenme oranı (%) ..... 45
Çizelge 4.9. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi kök sayısı (adet) verileri ..... 46

Çizelge 4.10. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi kök uzunluğu (cm) ..... 47
Çizelge 4.11. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi bitki boyu (cm) verileri ..... 48
Çizelge 4.12. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi köklenme oranı (%) ..... 49
Çizelge 4.13. Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjına ait katı kültür ve Plantform sistemi mikroçoğaltım sonuçlarına ait veriler ..... 51
Çizelge 4.14. Tuzcu 31-31 turuncuna ait katı kültür ve Plantform sistemi köklenme sonuçları ..... 53
Çizelge 4.15. C-35 sitranjına ait katı kültür ve Plantform sistemi köklenme sonuçları ..... 54
Çizelge 4.16. DNA kalite ve miktarına ait sonuçlar ..... 57

**ŞEKİLLER DİZİNİ** **SAYFA**


Şekil 3.1. Tuzcu 31-31 turuncu ..... 17
Şekil 3.2. C-35 sitranjı. ..... 18
Şekil 3.3. Bitkisel materyale ait tohumların sterilizasyonu..... 19
Şekil 3.4. Planform biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemesinde kültür kapları..... 23
Şekil 3.5. Bitkilerin dış koşullara alıştırılması. A: Bitkilerin dikilmesi. B: Bitkilerin tünele alınması. C: Plastik tünellerde gelişmiş bitkiler..... 24
Şekil 3.6. Bitkisel materyale ait yaprak örneklerinin öğütülmesi ..... 25
Şekil 3.7. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması..... 26
Şekil 3.8. DNA izolasyon aşamaları A: Çekerocak'ta tüplere Kloroform:izoamilalkol eklenmesi B: Tüplerin santrifüj edilmesi C: Süpernatant'ın alınması D: Süpernatant'ın yeni tüplere aktarılması..... 28
Şekil 3.9. DNA kalite ve kantitesinin ölçülmesi A: Nanodrop cihazı B: DNA miktarının ölçülmesi..... 29
Şekil 3.10. PCR çalışmalarına ait görüntüler A: Reaksiyon için gerekli malzemelerin hazırlanması B: Reaksiyon için gerekli kimyasalların tüplere aktarımı C: Tüplerin PCR cihazına yerleştirilmesi..... 30
Şekil 3.11. Poliakrilamid jel hazırlanması ve Li-Cor elektroforez cihazı A: Aparatın hazırlanması B: Aparatın Li-Cor elektroforez cihazına yerleştirilmesi ..... 32
Şekil 4.1. Tuzcu 31-31 turuncunun katı kültürde kardeşlenmesi (2 mg/L BAP içeren MS ortamı). ..... 38
Şekil 4.2. C-35 sitranjında katı kültür 2 mg/L BAP içeren MS besin ortamından elde edilen bitkicikler. ..... 41

Şekil 4.3. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi sonucunda 0.5 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamından elde edilen köklü bitkiler. ..... 50
Şekil 4.4. Tuzcu 31-31 turuncunun Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkiler. ..... 51
Şekil 4.5. C-35 sitranjı Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkiler. ..... 52
Şekil 4.6. Tuzcu 31-31 turuncu Plantform sisteminde köklenen bitkiler. ..... 53
Şekil 4.7. C-35 sitranjında Plantform sisteminde gelişen köklü bitkiler. ..... 55
Şekil 4.8. Tuzcu 31-31 turuncunda katı kültürde köklendirilipdış koşullara alıştırılan bitkiler. ..... 55
Şekil 4.9. Plantform sisteminde dış koşullara alıştırılan bitkiler. A: Tuzcu 31-31 turuncu. B: C-35 sitranjı. ..... 56
Şekil 4.10. 14 nolu primere ait poliakrilamid jel görüntüsü. ..... 58

**KISALTMALAR**

| | |
|---|---|
| µl | : Mikrolitre |
| 2,4-D | : Dichlorophenoxyacetic acid |
| 2IP | : 6-(g,g-dimethylallylamino)-purine |
| BAP | : 6-Benzylamino purine |
| BBD | : Bitki Büyüme Düzenleyici |
| BIG | : The Gravity Immersion Bioreactor (Yerçekimi Daldırmalı Biyoreaktör) |
| BIT-TIB | : Temporary İmmersion Bioreactors (Geçici Daldırmalı Biyoreaktörler) |
| CTAB | : Cetyltrimeyhhylamoniumbromide |
| dk | : Dakika |
| DKW | : (Driver and Kuniyuki Walnut Medium) |
| DNA | : Deoxyribonucleic acid |
| FAO | : Food and Agriculture Organisation (Gıda ve Tarım Örgütü) |
| g | : Gram |
| $GA_3$ | : Gibberallic acid IBA: Indolebutyric acid |
| IAA | : Indoleasetic acid |
| KİN | : 6-furfurylamino purine |
| L | : Litre |
| mg | : Miligram |
| ml | : Mililitre |
| Mm | : Milimolar |
| MS | : (Murashige ve Skoog, 1962) |
| NAA | : Naphtalaneacatic acid |
| ng | : Nanogram |
| PCR | : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) |

| | |
|---|---|
| RAPD | : Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) |
| 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 | : (WP, Lloyd ve McCown, 1980) |
| µM | : Mikromolar |

# 1. GİRİŞ

Dünya'da yetiştiriciliği yapılan en büyük meyve gruplarından biri turunçgillerdir. Anavatanı Güneydoğu Asya olan turunçgiller günümüzde Dünya'da geniş bir coğrafyaya dağılım göstermiştir. Bu anlamda turunçgiller içerisinde hızlı bir çeşit dinamiğinin var olması, farklı ıslah yöntemleriyle değişik iklim ve toprak koşullarına uyum sağlayabilen anaç ve çeşitlerin elde edilmesi önemli bir etken olmuştur. Tropik ve semitropik kökenli olan turunçgillerin sofralık olarak yetiştiriciliği daha çok subtropik bölgelerde yoğunlaşmış durumdadır. Akdeniz havzası içerisinde yer alan ülkemiz, kaliteli sofralık üretim bakımından uygun ekolojik koşullara sahiptir (Tuzcu, 1998).

Turunçgiller, portakal, limon, mandarin ve altıntop gibi "*Citrus*" cinsine ait türleri içermektedir. Zengin bir C vitamini içeriğine sahip olan turunçgiller insan sağlığı için çok önemlidir. Taze olarak tüketiminin yanında meyve suyu, konsantre, reçel, marmelat olarak çeşitli ürünlere işlenebildiği gibi kabuklarından da esans elde edilmektedir (Güven, 2010).Yıllara göre turunçgil üretimleri Çizelge 1.1 ve Çizelge 1.2'de sunulmuştur.

Çizelge 1.1. Dünya turunçgil üretim miktarının yıllara dağılımı (FAO, 2018)

| Yıllar | Dünya (Ton) |
|---|---|
| 2012 | 134.241.631 |
| 2013 | 141.682.421 |
| 2014 | 140.444.729 |
| 2015 | 144.876.944 |
| 2016 | 146.429.018 |

Çizelge 1.2. Türkiye turunçgil üretim miktarının yıllara dağılımı (TÜİK, 2018)

| Yıllar | Türkiye (Ton) |
|---|---|
| 2012 | 3.475.024 |
| 2013 | 3.681.158 |
| 2014 | 3.783.517 |
| 2015 | 3.975.873 |
| 2016 | 4.293.007 |

Turunçgiller grubunda Citrus türleri herdem yeşil özellik gösterirler. Kendi içlerinde tür ve çeşitlere göre farklılık gösteren ağaç, meyve ve yaprak özellikleri vardır. Çiçekleri hermafrodit özelliktedir ve böceklerle tozlanır.

Çok yıllık bahçe bitkilerinde üretimde kullanılan çeşitler, heterozigot kalıtsal yapıları nedeniyle tohumla çoğaltıldıklarında genetik yapı olarak açılım gösterirler, bazı meyve tür ve çeşitlerinde tohum oluşmaz, bazı meyve türlerinde ise tohumlar oluşur, ancak tohumların çimlenme gücü ya çok düşüktür ya da çimlenme gücü hiç yoktur. Bu gibi nedenlerden dolayı generatif yolla çoğaltım tercih edilmez.

Turunçgiller (*Citrus spp.*), yetiştiricilikte yaygın olarak aşı ile çoğaltılmaktadır. Bunun yanında daha küçük bitki dokularının kullanılabilmesine imkan sağlayan doku kültürü teknikleri, klasik yöntemlerle çoğaltmada sorun yaşanan durumlarda seri ve hızlı üretim için kullanılmaktadır (Gülşen ve Uzun, 2011).

Doku kültürü, bitkiden izole edilen doku (eksplant) parçasını yapay besin ortamında yaşatma tekniğidir. Hücre ve dokular bölünerek kök, yaprak, sürgün, embriyo veya tam bitki geliştirirler. Bazen kültürdeki hücre ve dokulardan kallus olarak adlandırılan farklılaşmamış hücre topluluğu gelişebilir. Bu bilgi ekonomik önemi olan çoğu bitkilerin klonal olarak çoğaltılmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca bitki doku kültürü, bitkilerin kitlesel üretimine ilave

olarak laboratuvarda sentezlenemeyen ikincil metabolitlerin ve tıbbi bileşenlerin üretiminde de kullanılmaktadır (Onay ve ark, 2012).

Bir bitkiden alınan ve yeni bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip embriyo, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi gibi bitki kısımlarından *in vitro'*da yapay besin ortamında yeni bitkilerin elde edilmesine mikroçoğaltım denir. Bitkilerin *in vitro* üretimi, kullanılan eksplantın özelliğine göre (embriyo, meristem, anter, hücre veya protoplast kültürü vb.) adlandırılır. Mikroçoğaltımın başarısı, eksplantların alındığı anaç bitkinin genotipi, sağlık durumu, ve yetişme koşulları (beslenme, ışık, sıcaklık, vb.) ile doğrudan ilişkilidir. Mikroçoğaltımın avantajları, hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyal elde edilmesi, kitlesel üretimde üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerlik (homojenite), diğer yöntemlerden daha kısa kültür süresi, zor üretilen türlerin daha kolay üretimi, seçilen belirli/üstün genotiplerin hızlı üretimi, üretimde daha az anaç kullanılması, somaklonal varyasyondan dolayı yeni çeşitlerin/genotiplerin elde edilmesidir (Aka Kaçar, 2015).

Odunsu ve çalı formundaki bitkilerin *in vitro* koşullarda çoğaltılması ile ilgili yapılan çalışmalarda klasik katı ve yarı-katı besin ortamları kullanılmaktadır. Fakat sıvı ortamda kullanım ile ilgili olarak az sayıda literatür mevcuttur. Katı kültürlerde, çeşitli polisakkarit bileşimlerini içeren agar, agaroz, aljinat, phytagel (gelrite) gibi jel yapıcı maddeler kullanılmaktadır. Bu katılaştırıcılar bitkilerin besin ortamına tutunmasını sağlamaktadır. Bununla beraber bitkilerde Vitrifikasyon (camlaşma) dediğimiz agar ile ilişkili bazı fizyolojik sorunlara da sebep olabilmektir.

*İn vitro* çoğaltım teknikleri hızlı çoğaltım protokollerin kurulması ve genetik manipülasyon çalışmaları için önemli bir yaklaşımdır. Kitlesel çoğaltım için kullanılan klasik doku kültürü tekniklerinde agar ile katılaştırılmış katı veya yarı-katı ortamlar kullanılmaktadır.

Geleneksel mikroçoğaltım yöntemleri pahalıdır ve yoğun işgücü istemektedir. Ayrıca, bitkilerde çoğalma katsayısı ve bitki kalitesinde olumsuz etkiler

yapabilmektedir. Besin ortamından besin alımında en önemli dezavantaj, sürgünlerin basal kısımlarından besin elementlerinin absorbsiyonudur. Ancak, yeni bir metodoloji geliştirilmesi ile biyoreaktörlerde sıvı kültür sistemlerini kullanarak daha uygun maliyetli mikroçoğaltımın gerçekleştirilmesi mümkün olmuştur (Welander ve ark, 2017). Fakat biyoreaktör gibi sıvı sistemlerde eksplantın sürekli sıvı ortamda kalması dokularda camlaşma ve oksijensiz kalarak zarar görme gibi pek çok sorunu da beraberinde getirmektedir (Lambardi ve ark, 2015).

Geçici daldırma yöntemi geleneksel yarı-katı ve sıvı besi ortamlarının avantajlı yönlerini kombine eden bir sistemdir.

Bu sistemin avantajları (Lambardi ve ark, 2015):

1. Klasik doku kültürü sistemlerine göre kültür ortamı ve bitkinin besin ortamına teması daha üniformdur,
2. Oksijensiz kalarak boğulma ve vitrifikasyon gibi sorunlar daha azdır,
3. Kültürler tarafından salgılanan ve kahverengileşmeye neden olan toksik bileşikler sıvı ortamda daha azdır,
4. Kültür kapları içerisindeki atmosferin periyodik olarak değişimini sağlaması, $CO_2$ ve etilen gibi zararlı gaz birikmesini önler,
5. Daha büyük kültür kabı kullanıldığı için altkültür süresi daha uzundur,
6. Katı besin ortamında kültüre alma işlemi daha özen ve dikkat ister, fakat sıvı besin ortamında bu işlem daha kolay ve çabuk olur böylece işgücünden de tasarruf edilmiş olur,
7. Hava sirkülasyonu sonucunda oluşan baloncuklar sayesinde hücre bölünmesi teşvik edilir, böylece hem çoğalma katsayısı hem de sürgün kalitesinde artış olur.

Etienne ve Berthouly'nin (2002) bildirdiğine göre, Yenice (2010) yeni nesil doku kültürü teknikleri başlığı altında geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin ilk olarak Harris ve Mason (1983) tarafından geliştirilmiş olup ilk

başarılı bitki rejenerasyonu sonuçlarının *Solanum tuberosum* ve *Coffee arabicanı*'nın somatik embriyolarından elde edildiğini tanımlamıştır.

Geçici daldırma sistemi (TIS) olarak tanımlanan biyoreaktörlerden ilk olarak RITA tanımlanmıştır (Alvard ve ark, 1993: Welander ve ark. 2017'den). Bu biyoreaktör tek bir birimden oluşmaktadır. Bir diğeri ikiz kap sistemine dayanan Escalona ve arkadaşları tarafından (1999, 2003) tanımlanandır (Welander ve ark, 2017). Bu sistemde bir kapda eksplantlar ve diğer kapda besin ortamı bulunmaktadır. Elma ve pek çok bahçe bitkileri ürünleri için Zhu ve arkadaşlarının (2005)'de bildirdiğine göre, Welander ve ark (2007) RITA ve ikiz kap sistemini kullandıklarını tanımlamışlardır. Ancak mevcut ekipmanla ilgili bazı problemler yaşanmıştır. RITA'nın mevcut çalışmalar için çok küçük olduğu ve birkaç kez otoklavlandığı zaman renk değiştirdiği görülmüştür. İkiz sistemde ise kullanılan cam kaplar çok ağır bulunmuştur. Bu sebeplerden dolayı Plantform adı verilen yeni bir biyoreaktör geliştirilmiştir (Welander ve ark, 2014). Bu biyoreaktör, düşük ağırlığa sahip ve bir bütünden oluşmaktadır. Besin ortamını doldurması ve değiştirmesi kolaydır. Aynı zamanda pompa zamanlayıcılarına ve elektrik sistemine kolayca bağlanabilir valflere sahiptir.

Geçici daldırma sistemleri arasında son yıllarda geliştirilen "Plantform" sisteminde kültür kaplarında bağımsız havalandırmaya odaklanılmıştır (Lambardi ve ark, 2015). Sistem geçici daldırma yöntemi ile kültür kaplarının içerisinde havalandırma sayesinde kabın içerisindeki havanın yenilenmesini sağlar. Böylece bitki kalitesinde artışın yanı sıra, daha ekonomik, hızlı ve kolay bir çoğaltma yöntemi sunar.

Diğer biyoreaktörlere göre avantajları bulunan Plantform biyoreaktör sistemi kullanım kolaylığı, otoklavlanabilirliği, şeffaf olması, taşıma kolaylığı, gaz değişimi olması, hava pompası ve zaman ayarlarının bulunması bu sistemi diğerlerine göre farklı kılmaktadır ve *in vitro* kültürlerde kaliteyi arttırmaya yönelik bir sistemdir. Sistemin esası kültür kabı içerisindeki havanın sirküle olması ve

geçici daldırma yöntemine dayanmaktadır. Kültür kaplarının daldırma süresi ve sıklığı ayarlanabilmekte ve gaz değişimi zaman ayarı ile yapılabilmektedir.

Bitki doku kültüründe bazı durumlarda somaklonal varyasyon olarak adlandırılan bazı genetik değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu durum vejetatif çoğaltımda istenmeyen bir durumdur. Plantform geçici daldırma sistemleri ile kültür sürelerinin daha kısa tutulması ve altkültür sayılarının daha aza indirgenmesi ile bu risk azaltılmaktadır (Biçen ve ark, 2017). Moleküler markırlar, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasıdır. Moleküler markırlar bitki ıslahında kültür çeşitlerinin tanımlanmasında, genetik haritalamada, genetik akrabalıkların belirlenmesinde, gen kaynaklarının karakterizasyonu gibi farklı amaçlar için kullanılır. SSR markırları 1-4 arasında tekrarlanan nükleotid motifleri içerirler, bu bölgeler "mikrosatellit" olarak adlandırılır ve PCR'da bireysel olarak amplifiye olurlar. Güvenilir, kodominant, polimorfizm oranı yüksek nispeten kolay ve ucuz bir şekilde uygulanabilen markırlardır (Aka Kaçar ve ark, 2009). SSR yöntemine başvurulma sebepleri arasında yüksek oranda bilgi içermesi ve kodominant olmaları gelmektedir. Ayrıca, PCR yöntemiyle kolayca tespit edilebilmeleri tercih edilme nedenleri arasındadır. Yöntemin sınırlayıcı etkisi ise zaman alıcı ve fazla işgücü gerektirmesi ile bir türe ait yeni mikrosatellitlerin elde edilmesidir (Büyükünal Bal, 2003).

Bu tez çalışmasında, Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı turunçgil anaçlarında Plantform biyoreaktör sisteminin, klasik doku kültürü tekniklerine göre etkisi test edilmiş ve her iki teknikte de çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik açılım olup olmadığı başlangıç materyali ile karşılaştırarak tespit edilmiştir. Başlangıç materyaline göre genetik açılım olup olmadığı SSR markırları kullanılarak belirlenmiştir.

# 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

## 2.1. Turunçgillerde Klasik Yöntemlerle Yürütülen Doku Kültürü Çalışmaları

Mandarin (*C. reticulata* Blanco cv. Khasi mandarini) ve Limon (*C. lemon* Burm) bitkilerinden alınan sürgün ucu eksplantları ile mikroçoğaltım çalışmışlardır. Mikroçoğaltım denemelerinde, 1.0 mg/L BAP, 0.5 mg/L Kinetin ve 0.5 mg/L NAA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Köklenme denemelerinde ise, 0.25 mg/L BAP, 0.5 mg/L NAA ve 0.5 mg/L IBA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Köklenen bitkiler dış koşullara aktarılmıştır (Sing ve ark, 1994).

Biçen (2008), çalışmasında on turungil genotipinde [*Citrus aurantium* L. (cv 'Tuzcu 891'), *Citrus aurantium* L. (cv 'Tuzcu 31-31'), *Citrus aurantium* L. (cv 'Gou Tou'), *Citrus sinensis* (L.) Osb. (cv 'Alanya Dilimli'), *Citrus reshni Hort. ex.Tan*. (cv 'Cyprus Cleopatra mandarine'), *Poncirus trifoliata* (L) Raf (cv 'Pomeroy'), *Citrus sinensis* (L) *Osb. x Poncirus trifoliata* (L) Raf. (cv 'Tuzcu M2 Citrange'), *Citrus sinensis* (L) *Osb. x Poncirus trifoliata* (L) Raf. (cv 'Carrizo Citrange'), *Citrus paradisi Macf. x Poncirus trifoliata* (L) Raf. (cv 'Swingle Citrumelo), *Citrus volkameriana Tan.& Pasg.* (cv 'CRC 01 Volkameriana')] stil ve ovül kültürü kullanılarak kallus oluşumu, somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu çalışmıştır. Eksplantlar MS makro ve mikro elementleri ve Murashige & Tucker (MT) vitaminlerine ek olarak 500 mg/L Malt Ekstrakt ile 1.0 mg/L 2,4-D ve 3 farklı BAP konsantrasyonu (0, 0.5, 1.0 mg/L) birinci yıl denemelerinde besin ortamı olarak kullanmıştır. İkinci yıl stil eksplantları, MS basal ortamı, ME ile beraber 3 farklı BAP konsantrasyonu (1.0, 2.0, 3.0 mg/L) içeren ortamda kültüre alınmıştır. İkinci yıl denemelerinde MS makro ve mikro elementleri, MT vitaminleri ile ME herhangi bir büyümeyi düzenleyici içermeyen ortamda kültüre alınmış, ayrıca 2,4-D (1.0 mg/L) ve 3 farklı BAP (0, 0.5, 1.0 mg/L) konsantrasyonu içeren ortamlar ovül eksplantları için kullanılmıştır. Stil eksplantlarından somatik embriyo oluşumu %0 (AREC Swingle Sitrumelo, M2 Sitranjı, Volkameriana, Pomeroy üç yapraklısı) ve % 100 (Gou Tou turuncu)

arasında değişirken, aynı şekilde ovül eksplantlarinde somatik embriyo oluşum oranları %0 (Carrizo Sitranjı, Alanya Dilimli portakalı, AREC Swingle Sitrumelo) ile %100 (Tuzcu 891 ve Kleopatra Mandarini) arasında değişmiştir.

Sharma ve ark (2009), Kaba limon, Kleopatra mandarini, Troyer sitranjı ve Pectinifera anaçlarının sürgün ucu ve nod eksplantları ile çalışmışlardır. 0.5 mg/L Kinetin, 2.0 mg/L NAA ve 2.0 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Ayrıca eksplant başına düşen maksimum kardeş sayısı 1.0 mg/L BAP içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Kaba limon ve Kleopatra mandarini anaçları için ½ MS ve 10.0 mg/L IBA ile maksimum köklenme sağlanmıştır. Troyer sitranjında kallus gelişimi ve kardeşlenme olmasına rağmen sürgün ve kök oluşumu meydana gelmemiştir. Köklendirilen bitkiler dış koşullara aktarılmıştır.

Şen (2010), yapmış olduğu çalışmada on bir turunçgil anacının *in vitro* koşullarda geliştirilen bitkilerinin kök segmentleri, kotiledon, epikotil, yaprak ve embriyo eksplantları kullanılarak embriyogenik kallus (EK) eldesi hedeflemiştir. Eksplantlar farklı besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda, embriyo eksplantlarından elde edilen kalluslardan en yüksek embryogenik kallus oluşum oranı 2,4-D (2.0 mg/L)+BAP (0.5 mg/L) içeren besin ortamında Troyer sitranjı (*Citrus sinensis* (l) *Osb. X Poncirus trifoliata* (L) Raf) anacında (%80 EK) gözlenmiştir. Epikotil, yaprak ve kotiledon kültürlerinin her üçünde de en iyi besi ortamı 2,4-D (2.0 mg/L)+KİN (0.5 mg/L)+NAA (2.0 mg/L) içeren denemede gözlenmiştir. Epikotil eksplantı denemesinde, en iyi EK oluşumu Rubidoux (*Poncirus trifoliata* (L) Raf.) üç yapraklı genotipinde görülmüştür. Kotiledon eksplantı denemesinde en iyi EK oluşumu Troyer sitranjı genotipinde rastlanmıştır. Kök eksplantı denemesinde en yüksek EK Gou Tou turuncu (*Citrus aurantium* L.) genotipinde görülmüştür. En iyi besin ortamı ise 2,4-D (2.0 mg/L) + KİN (0.5 mg/L) olmuştur

Perez ve ark (2010), Fino 46, Fino 49, Fino 77, Eureca, Lizbon ve Messina limon çeşitlerine ait nodal segmentler ile mikroçoğaltım ve köklendirme

çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. En iyi kardeşlenme 2.0 mg/L BAP ve 2.0 mg/L $GA_3$ içeren ortamdan ve en iyi köklenme ise 3.0 mg/L IBA ile elde edilmiştir.

Savita ve ark (2011), Limon'da (*C. jambhiri*) mikroçoğaltım ve RAPD markır sistemi ile genetik kararlılığın belirlenmesini çalışmışlardır. Çalışmada eksplant olarak nodal segmentler kullanılmıştır. 3.0 mg/L BAP içeren MS besin ortamı kullanılarak maksimum kardeş (%75) oluşumu ve 2.0 mg/L 2IP içeren MS besin ortamı kullanılarak maksimum sürgün (2.57 cm) uzunluğu elde edilmiştir. Maksimum köklenme (%87) 0.5 mg/L NAA içeren MS besin ortamı ile elde edilmiştir. RAPD analizleri sonucunda somaklonal varyasyon gözlenmemiştir.

İnceoğlu (2013), çalışmasında dört farklı turunçgil anacının (Carrizo sitranjı, Tuzcu 31-31 turuncu, Gou Tou turuncu) *in vıtro* koşullarda çimlendirilen tohumlarından gelişen kök eksplantları kullanılarak bitki rejenerasyonunun optimizasyonunu hedeflemiştir. Çalışmada kullanılan turunçgil genotiplerine ait kök eksplantları BAP ve NAA'nın 21 farklı konsantrasyonunu içeren besin ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda kök eksplantlarından elde edilen kalluslardan en yüksek başarı 0.5 mg/L BAP içeren MS ortamında Carrizo sitranjında (%90.73), Tuzcu 31-31 turuncunda (%83.33) ve Tuzcu Kleopatra mandarininde (%62.87) sağlanmıştır. Gou Tou turuncunda ise kallus oluşum oranı %58.33 olarak belirlenmiştir. Rejenerasyon oranlarına bakıldığında en yüksek başarı Carrizo sitranjında (%88.09), daha sonra Tuzcu 31-31 genotipinde (%25.95) sağlanmıştır. En düşük rejenerasyon oranı ise Gou Tou turuncunda (%2.75) bulunmuştur. Tuzcu Kleopatra mandarininde rejenerasyon sağlanamamıştır. Sürgün oluşum oranlarına bakıldığında Carrizo sitranjı en başarılı genotip olarak belirlenmiştir (%60.95). Carrizo sitranjında 0.5 mg/L BA, 1.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA ve 2.0 mg/L BAP içeren MS ortamlarında %100 başarı elde edilmiştir. Gou Tou turuncunda sürgün başarı oranı %0.23 olarak belirlenmiştir.

Tallon ve ark (2013), Alemow (*C. macrophylla*) ve Turunç (*C. aurantium*) bitkilerinden alınan nodal eksplantlarla *in vitro* organogenesis çalışmışlardır. Çalışmada farklı besinn ortamlarının (MS, WPM ve DKW) optimum koşullarda

farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicilerle kombinasyonu denenmiştir. En iyi sonuçlar Alemow için 3 mg/L BA, Turunç için 2 mg/L BA içeren ortamlarda elde edilmiştir. Anaçlarda 3 farklı temel ortamdan Alemow için WPM ya da DKW en iyi sonuçları verirken, Turunç için DKW en iyi ortam olarak belirlenmiştir.

### 2.2. GDS ile Yürütülen Çalışmalar

Cabasson ve ark (1997), *Citrus deliciosa* Ten. genotipinde somatik embriyoların gelişimi üzerine RITA geçici daldırma sisteminin etkisini araştırmışlardır. Zayıf embriyo gelişiminin üstesinden gelmek amacıyla katı kültür, süspansiyon ve geçici daldırma sistemi olmak üzere üç farklı kültür koşullarını kullanmışlardır. Katı kültürde somatik embriyoların %60'ı kotiledon aşamasına kadar gelişmiş, ancak bitkilerde camlaşma görülmüştür. Süspansiyon kültüründe somatik embriyoların gelişimi globuler safhada durmuştur. Geçici daldırma sistemi somatik embriyo gelişimini teşvik etmiş ve somatik embriyoların %66'sı kotiledon safhasına ulaşmış ve morfolojik olarak nuseller embriyolarla aynı olmuştur.

Yenice (2010), su mercimeğinde geçici daldırma sistem biyoreaktör ile *in vitro* çoğaltım ve bitki büyüme düzenleyicilerinin bitkinin protein miktarına etkisinin belirlenmesini çalışmıştır. Materyal farklı oranlarda BAP, Kinetin, TDZ içeren sukroz içeren ve içermeyen sıvı MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Mikroçoğaltım için yapılan denemeler 8 saat karanlıkta ve 16 saat beyaz floresan ışığı fotoperiyot altında ve 24±1°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Eksplant başına bitki çoğaltımı 0.2 mg/L BAP içeren, sukroz içermeyen sıvı MS besin ortamında 50.44 adet, 0.05 mg/L Kinetin içeren sıvı MS besin ortamında 57.82 adet ve 0.6 mg/L, TDZ içeren sıvı MS ortamında 50.74 adet hesaplanmıştır. Kjendahl Yöntemi ile yapılan azot tayininde bitkinin protein oranı %25.5 olarak tespit edilmiş olup, hormon uygulaması sonucunda 0.5 mg/L BAP ile bitkideki protein miktarı oranı %29.18'e çıktığı gözlemlenmiştir. Su mercimeği bitkisinde bitki

büyüme düzenleyicilerinin geçici daldırma biyoreaktör sistemleriyle çoğaltımının bitki protein miktarına olumlu yönde etkileri görülmüştür.

Welander ve ark (2014), *Digitalis lutea× purpurea, Echinacea purpurea* ve *Rubus idaeus* türlerinde, geçici daldırma sistem ve agarlı ortam ile karşılaştırmalı olarak mikroçoğaltım çalışmışlardır. Agarlı ortamda elde ettikleri sonuçlara göre çoğalma oranı ve bitkicik kalitesi, biyoreaktördeki bitkilerle ya aynı ya da agarlı ortamdaki bitkilerden daha iyi olarak kaydedilmiştir. *Digitalis* ve *Rubus* için her iki teknikte de kardeş sayısı benzer görülürken, Ekinezya'da kardeş sayısı ve kalitesinin biyoreaktörde daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Digitalis ve Ekinezya türlerinde yaş ağırlık biyoreaktörde, Rubus için ise agarlı ortamda kazanılmıştır. Kuru ağırlık üç genotip içinde iki sistemde de benzerlik göstermiştir. Bu çalışma ile Plantform biyoreaktör sistemlerinin bitki mikroçoğaltımında kullanımının uygun olduğu gösterilmiştir.

Benelli ve ark (2015), *Myrtus communis* ve *Olea europaea*'nın *in vitro* çoğaltımı için Geçici Daldırma Sistemi teknolojilerinden Plantform sistemini kullanmışlardır. Her iki tür içinde Plantform biyoreaktör sisteminin doku kültürü ile kitlesel üretimde basit ve etkili bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Üretim maliyetlerinin azalması için bu sistemde bitki büyüme düzenleyicilerini azaltmanın mümkün olduğu belirtilmiştir. Mersin ve Zeytin'nin altkültür boyunca yarı katı kültür ve Plantformla karşılaştırmalı olarak biyokütleleri incelenmiştir. Her iki tür içinde Plantform'da bitkilerin hayatta kalma oranı ve kalitesinin daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır. Zeytin'de gelişme oranının iyi olması için Zeatin hormonu kullanılmıştır. Zeatin hormonunun *in vitro*'da yüksek bir girdi olduğu için Zeatin kullanımı 10 µM'dan 5 µM'a düşürülmüş ve yarı katı kültür ortamı ile kıyaslandığında büyüme oranının arttığı gözlemlenmiştir.

Gatti ve ark (2015), *Quercus robur* bitkisinin mikroçoğaltımında klasik doku kültürü ve Plantform biyoreaktör sistemini karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Çalışmada materyal olarak nodal segmentler kullanılmıştır. Mikroçoğaltım ortamlarında (Plantform biyoreaktör sistemi için agar hariç) WP

medium, 20.0 g/L sukroz, 6 g/L agar ve 0.2 mg/L BA kullanılmıştır. Plantform için 8 saatte bir 12 dakika ve 16 saatte bir 8 dakika olmak üzere iki farklı daldırma süresi denenmiştir. Havalandırma süresi ise 4 saatte bir 15 dakika olarak belirlenmiştir. Her iki Plantform denemesi içinde eksplantların yaş ağırlığı klasik doku kültürü çalışmalarında kullanılan kaplardan daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada Plantform biyoreaktör sisteminin *Quercus robur* bitkisinde hızlı ve etkili bir metod olduğu bildirilmiştir.

Ticari öneme sahip Güney Afrika baklagili *Cyclopia genistoides* fenolik sekonder metabolit eldesi için farklı biyoreaktör tiplerinde [membranerafts (MR) ve GDS] sıvı ortamda kültüre alınmıştır. Tıbbi içerikli sekonder metabolitlerin en yüksek konsantrasyonu geçici daldırma sisteminden elde edildiği bildirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, *C. genistoides'*in GDS kültürlerinin nispeten pahalı olduğu; bununla birlikte bugüne kadar ticari kaynaklardan kolay temin edilemeyen sekonder bileşenlerin, alternatif bir kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Kokotkiewicz ve ark, 2015).

Lambardi ve ark (2015), yapmış oldukları çalışmada süs bitkilerinden herdem yeşil olan *Carex oshimensis* ve *Chrysanthemum morifolium* ile meyve türlerinden *Ficus carica* ve *Ribes rubrum* bitkilerinde geçici daldırma sistemi Plantform ile sürgün kardeşlenmesi gelişimini çalışmışlardır. Plantform sistemi ile daha yüksek kalitede bitkiler elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmalarında bazı bitkilerin direk köklenme gösterdikleri ve böylece doğrudan dış koşullara adaptasyonunun sağlandığını bildirmişlerdir.

*Stevia rebaudiana* tatlandırıcı bir madde içeren ve şekere alternatif olarak düşünülen bir bitkidir. Sacco ve ark (2015), bu bitki türü için etkin mikroçoğaltım protokolü geliştirmek amacıyla çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada RITA ve Plantform biyoreaktör sistemleri agarla katılaştırılmış ortam ile karşılaştırılmıştır. *In vitro* kültürler için 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 ortamları kullanılmıştır. Sıvı ortamlarda (RITA ve Plantform) çoğalma

katsayısı agarla katılaştırılmış ortama göre daha yüksek bulunmuş (14 eksplant/bitki), BAP eksplant başına sürgün sayısını arttırmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde 3 saatte bir daldırma kallus ve camlaşma problemi meydana getirdiği, bununla birlikte 8 saatte bir daldırmanın daha kaliteli sürgün oluşumu sağladığı belirtilmektedir.

Daungban ve ark (2016), muz bitkisini *in vitro* koşullarda karşılaştırmalı olarak geleneksel yarı-katı besin ortamı ve geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanarak çoğaltmışlardır. Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde her 4 saatte bir 2 dk daldırma uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan sıvı ve katı besin ortamlarına farklı konsantrasyonlarda TDZ (0, 0.125 ve 0.250 mg/L) ilave edilmiştir. Çalışma sonunda en fazla sürgün oluşum oranı 11.03 ile 0.125 mg/L TDZ içeren geçici daldırma biyoreaktör sisteminden elde edilmiştir.

Gutiérrez ve ark (2016), yapmış oldukları çalışmada, *Guadua angustifolia* bitkisini geçici daldırma biyoreaktör sistemi olan RITA sisteminde çoğaltmışlardır. Kültür kaplarına 6 ve 8 saatte bir 2 dk olmak üzere iki farklı daldırma sıklığı uygulanmıştır. Çalışma sonunda en fazla çoğalma 6 saatte bir 2 dk daldırma uygulanan kültür kaplarından elde edilmiştir.

Masnoddin ve ark (2016), yarı-katı MS ortamında elde ettikleri *Paphiopedilum rothschildianum* kalluslarından RITA geçici daldırma biyoreaktör sisteminde sürgün rejenerasyonu ile bitki elde etmişlerdir. Çalışmada kültür kaplarına her 125 dk'da bir 5 dk daldırma uygulanmıştır. Çalışmada, 15 ve 58 mM sakkaroz içeriğinin sürgün oluşumuna etkisi de araştırılmıştır. Sakkaroz konsantrasyonu 58 mM olduğunda, 1 g kallus başına rejenerasyon oranı 190 olarak belirlenmiştir.

Meiping ve ark (2016), yapmış oldukları çalışmada, geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanarak *Sagittaria sagittifolia* bitkisinin mikroçoğaltımı için yeni bir protokol geliştirmişlerdir. Çalışmada farklı bitki büyüme düzenleyici, altkültür, daldırma sıklığı ve inokülasyon yoğunluğunun etkisi araştırılmıştır. TIS sisteminde oldukça iyi morfolojiye sahip bitkiler elde edilmiştir. *S. sagittifolia*

bitkisinin çoğalması ve büyümesi için 3.0 mg/L BAP + 0.01 mg/L NAA içeren kültür kapları başarılı olmuştur. En yüksek çoğalma oranı 5. altkültürde elde edilmiştir. Bitkilerin çoğalmasında, TIS kültür kaplarında her litre için 10 bitki konulması ve 3 saatte bir 10 dk daldırma döngüsü oldukça başarılı bulunmuştur.

Ramírez-Mosqueda ve Iglesias-Andreu (2016), *Vanilla planifolia* bitkisinin *in vitro* koşullarda çoğaltılmasında ve köklendirilmesinde farklı geçici daldırma sistemlerinin etkinliğini araştırmışlardır. Araştırmada, BIT, BIG ve RITA sistemleri kullanılmıştır. Çalışma sonunda, eksplant başına en fazla sürgün oluşumu 18.06 ile TIB sisteminde elde edilmiştir. Bunu 12.77 ile RITA ve 6.83 ile BIG sistemi takip etmiştir. Köklenme denemelerinde, en fazla uzun kök sayısı BIT sisteminde elde edilmiştir.

Biçen ve ark (2017), yapmış oldukları çalışmada mersin bitkisinde (*Myrtus communis* L.) Plantform sistemi ile katı kültürünü karşılaştırmışlardır. Bu amaçla iki farklı Mersin genotipi kullamışlardır. 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 ortamları hazırlanmıştır. Geçici daldırma biyoreaktör sisteminde 4 ve 8 saat olmak üzere iki farklı daldırma süresi sıklığı katı besin ortamları ile karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda Plantform sisteminde gelişen bitkilerin katı kültürlere göre açık bir şeklide 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.

Frómeta ve ark (2017), Gerbera bitkisini TIB geçici daldırma biyoreaktör sisteminde çoğaltmışlardır. Çalışmada daldırma sıklığı (6, 8 ve 12 saat) ve kültür süresi (14, 21, 28 ve 35 gün) faktörleri test edilmiştir. Çalışma sonunda, 8 saatte bir daldırma uygulanan grupta sürgünler kontrole göre daha iyi bir morfoloji göstermiştir. Her 6 saatte bir daldırma uygulanan grupta daha yüksek yaş ve kuru

ağırlık elde edilmiştir. Sekiz ve 12 saat daldırma uygulanan gruplarda sürgünler arasında fark gözlenmemiştir.

Szopa ve ark (2017), *Schisandra chinensis*'te yapmış oldukları çalışmada, sürgün uçları RITA ve Plantform olmak üzere iki farklı biyoreaktörde kültüre alınmıştır. Besin ortamı olarak; 3 mg/L BA ve 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Sürgünlerde büyüme ve lignan içeriği (bitkisel-östrojen) LC-DAD ve LC-DAD-ESI-MS ile değerlendirilmiştir. Test edilen biyoreaktörlerden Plantform lignin içeriği (546.98 mg/100g kuru ağırlık) ve büyüme bakımından daha iyi sonuçlar vermiştir.

Zhang ve ark (2017), *Pinelli alternate* bitkisini geçici daldırma biyoreaktör sisteminde çoğaltmışlardır. Çalışmada 9 farklı daldırma döngüsünün bitki çoğalması ve büyümesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonunda, bitki çoğalması ve büyümesi üzerinde en başarılı daldırma döngüsü 12 saatte bir 5 dk olarak belirlenmiştir. En fazla yaş ağırlık kültür kaplarına 60 eksplant konulduğu zaman elde edilmiştir. Kültür kaplarına 80 ve 100 eksplant konulduğu zaman bitkiler zayıf gelişme göstermiştir.

# 3. MATERYAL METOD

## 3.1. Materyal

### 3.1.1. Bitkisel Materyal

Tez çalışmasında bitkisel materyal olarak Tuzcu 31-31 turuncu (*Citrus aurantium* L.) ve C-35 sitranjı (*Citrus sinensis* Osb. 'Ruby' x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) olmak üzere iki farklı genotip kullanılmıştır. Bitkisel materyale ait özellikler aşağıda sunulmuştur.

**Tuzcu 31-31 turuncu:** Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere turunçgil üreticisi ülkelerde en çok kullanılan anaç olan turunç; portakal, altıntop, mandarin ve limon için anaç olarak kullanılmaktadır (Davies ve Albrigo, 1994). Tuzcu 3131 anacı Kök Boğazı Çürüklüğü (*Phytophthora citrothora*) ve Uçkurutan (*Phoma tracheiphila*) hastalığına tolerant olan bir turunçtur. 1974 yılında Prof. Dr. Önder Tuzcu tarafından Doğu Akdeniz Bölgesi'nden selekte edilmiştir (Yeşiloğlu, 1982). Tuzcu 3131 turunçgil anacına ait görüntü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Tuzcu 31-31 turuncu
(http://subtropik.cu.edu.tr/Tr/detay.aspx?pageId=1647).

**C-35 sitranjı:** Ruby Kan portakalı ve üç yapraklı anacının melezlenmesiyle elde edilmiştir. Pytophthora ve tristezaya karşı troyer anacına göre daha toleranttır. Nematodlara karşı oldukça dayanıklıdır. California Üniversitesi tarafından 1987 yılında yayılmaya başlamıştır. Troyerden daha küçük taç yapısına sahiptir. Soğuklara dayanımı Carizzo anacı kadar iyi veya biraz daha fazladır. Kumlu, tınlı ve killi topraklarda iyi gelişme gösterir ancak kireçli topraklara Carizzo anacından daha hassastır (Saunt, 2000). C-35 sitranjı'na ait görüntü Şekil 3.2'de verilmiştir



Şekil 3.2. C-35 sitranjı (http://subtropik.cu.edu.tr/Tr/detay.aspx?pageId=1649).

## 3.2. Metod

### 3.2.1. Tohumların Sterilizasyonu

Tez çalışması kapsamında turunçgil genotiplerine ait tohumlar, beher kaplar içerisinde çeşme suyu altında yıkanmıştır. Tohumların sterilizasyonuna ait görüntü Şekil 3.3'de verilmiştir. Tohumlar steril kabin içerisinde önce % 70'lik alkolde 15 dk bekletilip ardından, % 10'luk sodyumhipoklorit + 1-2 damla tween 20 çözeltisinde 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra 3 kez steril saf su ile çalkalanmıştır.



Şekil 3.3. Bitkisel materyale ait tohumların sterilizasyonu

### 3.2.2. Çimlendirme Besin ortamı

Sterilizasyon sonrası tohumlar bitki büyüme düzenleyici içermeyen, 30 g/L sükroz, 7.5 g/L agar içeren MS besin ortamında çimlendirilmiştir. Besin ortamının pH'sı 5.7'ye ayarlanmıştır. MS besin ortamı içeriği Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. MS Besin ortamı içeriği

| **Bileşik** | **Konsantrasyon(mg/L)** |
|---|---|
| **Makro Elementler** | **(MS, 1962)** |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 370 |
| $KH_2PO_4$ | 170 |
| $KNO_3$ | 1900 |
| $NH_4NO_3$ | 1650 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 440 |
| **Mikro Elementler** | **(MS, 1962)** |
| $H_3BO_3$ | 6,2 |
| $MnSO_4.H_2O$ | 15,6 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 8,6 |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0,25 |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0,025 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0,025 |
| KI | 0,83 |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 27,8 |
| $Na_2$ EDTA | 37,3 |
| **Organik Bileşikler** | **(MS, 1962)** |
| Sakkaroz | 30-50 g |
| Myo-inositol | 100 |
| Nikotinik asit | 0.5 |
| Piridoksin HCl | 0.5 |
| Thiamine HCl | 0.1 |
| Glisin | 2 |

### 3.2.3. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemelerinin Kurulması

Anaçlara ait tohumlar *in vitro* koşullarda çimlendirildikten sonra bitkilerin sürgün ucu ve nodları MS ve WPM besin ortamlarında kültüre alınmıştır. WPM besin ortamı içeriği Çizelge 3.2'de verilmiştir. Mikroçoğaltım denemelerinde bitki büyüme düzenleyicilerinden BAP (0, 1.0, 2.0 mg/L), KİN (0, 0.50, 1.0 mg/L) ve 2İP (0, 1.0, 2.0 mg/L)'nin konsantrasyonları/kombinasyonları uygulanmış ve 10 bitki kültüre alınmıştır. Besin ortamlarının içerisine 30 g/L sükroz ve 7.5 g/L agar ilave edilmiştir. Ortamların pH'sı 5.7'ye ayarlanmıştır. Deneme süresince bitkicikler, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 25°C hava koşullarında kültüre alınmıştır. Bitkicikler dört haftada bir ve toplamda 3 kez altkültüre alınmıştır.

Çizelge 3.2. WPM Besin ortamının içeriği

| **Bileşik** | **Konsantrasyon (mg/L)** |
|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 400 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 96 |
| $Ca(NO_3)_2$ | 386.34 |
| $MgSO_4$ | 180.69 |
| $KH_2PO_4$ | 17 |
| $K_2SO_4$ | 990 |
| $MnSO_4.H_2O$ | 22.3 |
| $H_3BO_3$ | 6.2 |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.25 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 8.6 |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0.25 |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 27.8 |
| $Na_2$ EDTA | 37.3 |
| **Vitamin** | **Konsantrasyon** |
| Myo-inositol | 100 |
| Nikotinikasit | 1 |
| Piridoksin HCl | 0.5 |
| Thiamine HCl | 0.5 |
| Glisin | 2 |

### 3.2.4. Katı Kültür Köklendirme Denemelerinin Kurulması

Anaçlara ait tohumlar *in vitro* koşullarda çimlendirildikten sonra bitkilerin sürgün ucu ve nodları ile köklendirme denemesi kurulmuştur. Bu denemede oksin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden IBA ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarını (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) içeren WP/MS ve ½MS besin ortamları kullanılmıştır. Besin ortamlarının içerisine 30 g/L sükroz ve 7.5 g/L agar ilave edilmiştir. Ortamların pH'sı 5.7'ye ayarlanmıştır. Köklendirme ortamlarına 10 bitki aktarılmış ve bitkicikler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık, 25°C sıcaklık koşullarında 8 hafta süre ile kültüre alınmıştır. 8 hafta sonunda köklenen bitkiler alıştırma seralarına alınmıştır.

### 3.2.5. Plantform Biyoreaktör Sistemi ile Mikroçoğaltım Denemesinin Kurulması

Katı kültür mikroçoğaltım denemesi sonucunda elde edilen en iyi çoğalmayı sağlayan besin ortamı ile Plantform geçici daldırma sisteminde mikroçoğaltım denemesi kurulmuştur. Plantform sistemi için hazırlanacak besin ortamlarına agar ilave edilmemiştir. Plantform biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemesinde her kültür kabına 500 ml besin ortamı eklenmiş ve 150 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 gerçekleştirilmiştir. Plantform biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemesinde kültür kaplarına ait görüntü Şekil 3.4'de sunulmuştur.



Şekil 3.4. Plantform biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemesinde kültür kapları

### 3.2.6. Plantform Biyoreaktör Sistemi ile Köklendirme Denemesinin Kurulması

Katı kültür köklendirme denemesinden elde edilen en iyi köklenmeyi sağlayan besin ortamı içeriği ile Plantform biyoreaktör sistemi köklendirme denemesi kurulmuştur. Plantform biyoreaktör sistemi köklenme denemesinde her kültür kabına 500 ml besin ortamı eklenmiş ve 60 bitki konulmuştur. Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Bitkiciklerin Plantform sistemine transfer edilmesinden 8 hafta sonra altkültür işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.7. Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması

Köklenen bitkiler dış koşullara aktarılmadan önce bitkilerin bulunduğu kültür kapları kademeli olarak açılarak iklimatizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bitkiler su ve agardan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra serada 1:1 oranda steril torf:perlit karışımı içeren viyollere aktarılmıştır. Bu aşamada, kök sayısı, kök uzunluğu ve bitki boyu parametreleri incelenmiştir. Bitkiler mini plastik tünel altında yavaş yavaş dış koşullara alıştırılmıştır (Şekil 3.5).




Şekil 3.5. Bitkilerin dış koşullara alıştırılması A: Bitkilerin dikilmesi B: Bitkilerin tünele alınması C: Plastik tünellerde gelişmiş bitkiler

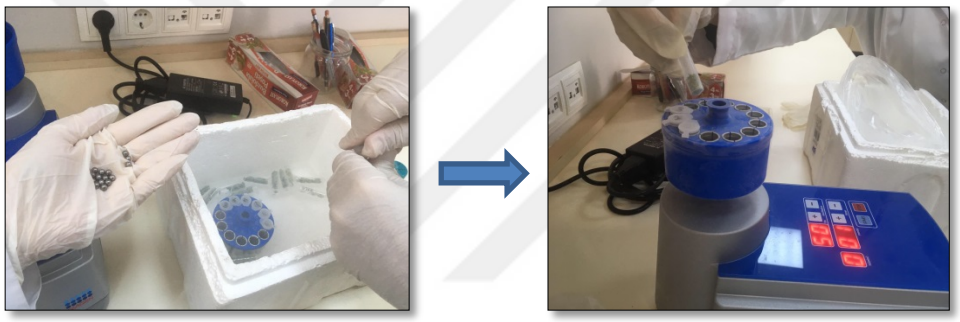
### 3.2.8. Doku Kültürü Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Bitkilerde Genetik Kararlılığın Belirlenmesi

Tez kapsamında katı kültür ve Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik varyasyon olup olmadığı başlangıç materyali ile karşılaştırma sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla katı kültür mikroçoğaltım denemesinde 3 altkültür sonunda elde edilen bitkicikler, Plantform biyoreaktör sistemi ile mikroçağıltım ve kök denemeleri sonucunda çoğaltılan bitkiciklerden ve köklendirilen bitkilerden olmak üzere üç

farklı dönemde yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan yaprak örnekleri -196 °C'de sıvı azota daldırılıp –80°C'de muhafaza edilmiştir. Genetik kararlılığın belirlenmesi amacıyla turunçgiller için geliştirilmiş olan SSR markırları kullanılmıştır.

### 3.2.9. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için farklı dönemlerde alınan bitkisel materyallere ait yapraklar 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine yerleştirilmiş ve sıvı azota daldırılarak Tissue-Lyser cihazı ile parçalanmıştır. Çalışmada yaprak örneklerinin öğütülmesine ait görüntü Şekil 3.6'da verilmiştir.



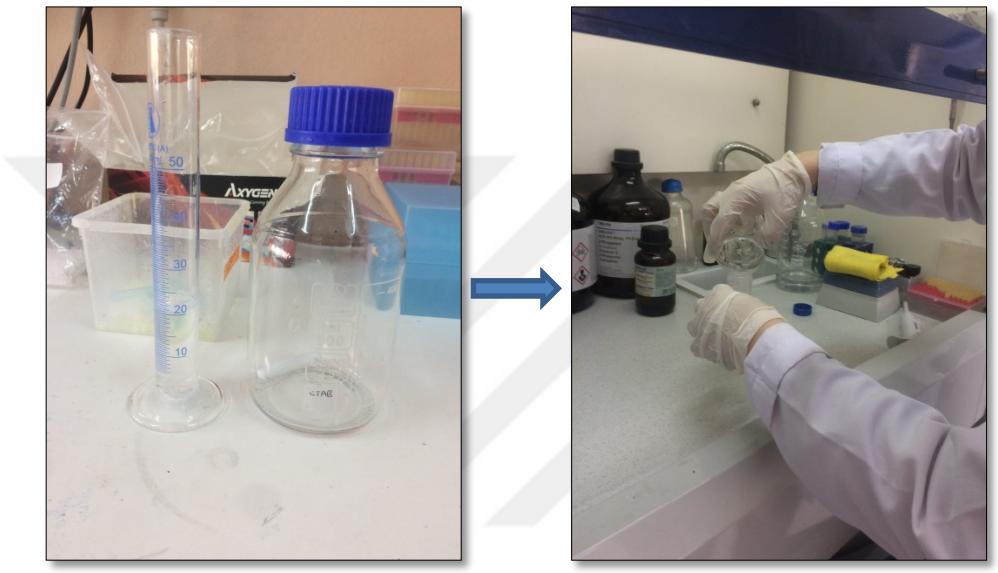
Şekil 3.6. Bitkisel materyale ait yaprak örneklerinin öğütülmesi

### 3.2.10. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

Bu çalışmada MiniPrep DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır (Dellaporta ve ark, 1983). DNA izolasyonu aşamasında kullanılan tampon çözeltinin içeriği Çizelge 3.3'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. Şekil 3.7'de tampon çözeltileri hazırlama aşamasına ait görüntü verilmiştir.

Çizelge 3.3. 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 |



Şekil 3.7. Tampon çözeltilerin hazırlanması

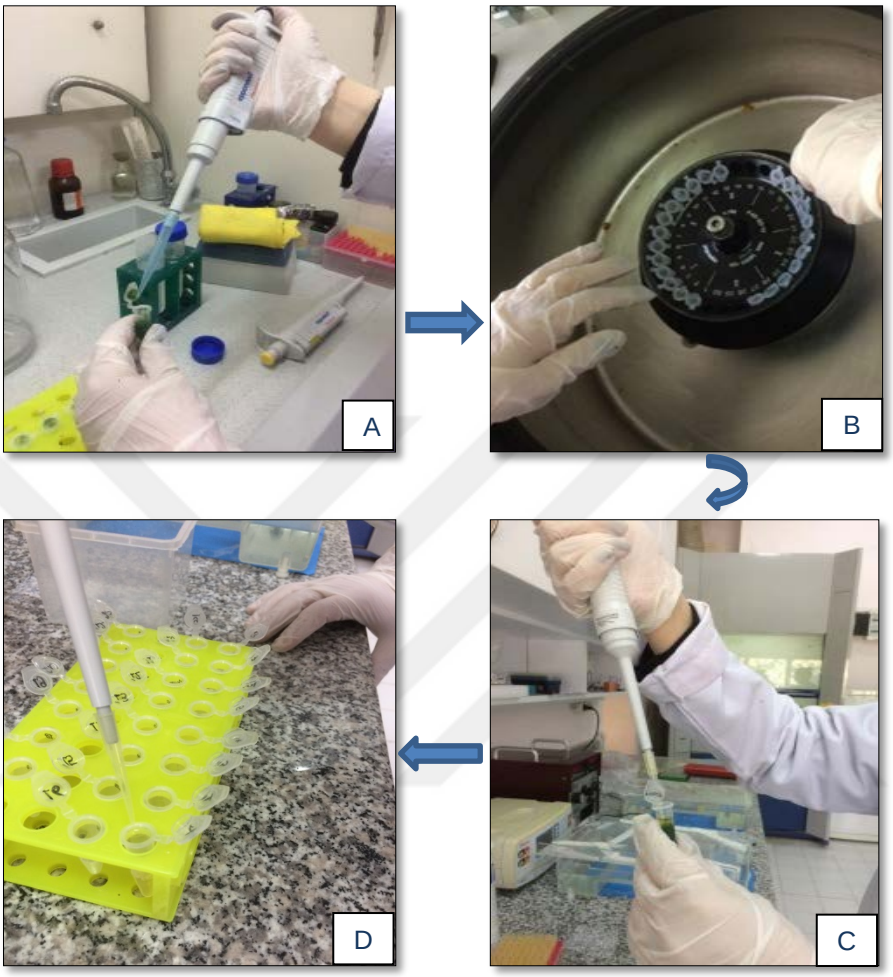
### 3.2.11. DNA İzolasyon Aşamaları

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

- Bir pipet aracılığıyla tüpler homojenlik sağlanana kadar karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 65°C'de 20 dakika bekletilip ve iki defa karıştırılmıştır.
- Her tüpe 400µl kloroform:izoamilalkol eklenmiş ve 15 dakika karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.

- Tüpler 5 dakika 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 mikrolitre 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 dakika 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 çözülmüştür
- 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 dakika).
- Pellet 100 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür.
- Örnekler –20°C'de saklanmıştır.

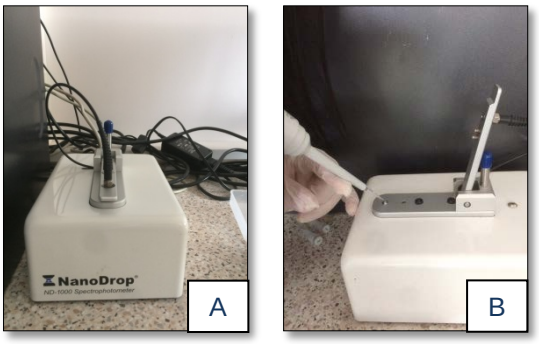
DNA izolasyonu aşamalarına ait görüntüler Şekil 3.8'de verilmiştir.




Şekil 3.8. DNA izolasyon aşamaları A: Çekerocak'ta tüplere Kloroform:izoamilalkol eklenmesi B: Tüplerin santrifüj edilmesi C: Süpernatant'ın alınması D: Süpernatant'ın yeni tüplere aktarılması

### 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 verilmişti




Şekil 3.9. DNA kalite ve kantitesinin ölçülmesi A: Nanodrop cihazı B: DNA miktarının ölçülmesi

### 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 µl olacak şekilde Çizelge 3.4'de verilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

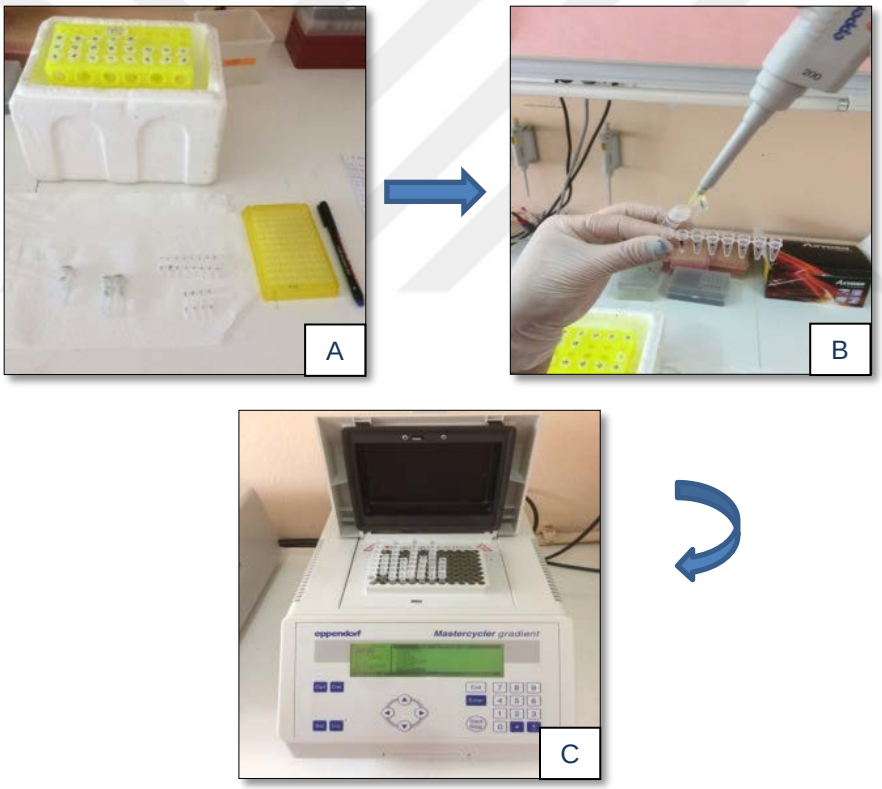
Çizelge 3.4. PCR koşullarının içeriği

| Kullanılan Kimyasallar | Her örnek için kullanılan miktar (µl) |
|---|---|
| ddH2O | 5,00 |
| PCR Master Mix 2X | 8,00 |
| MgCl2 | 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 "***denaturation***" |
| 95°C 1dk | DNA'nın çift iplikçiğinin ayrılması "***denaturation***" |
| 55*°C 30sn | primer bağlanması "***annealing***" |
| 72°C 1dk | yeni iplikçiğin yazılımı "***extension***" |
| 35 döngü, | |
| 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 Primerlerinin Belirlenmesi

Tez çalışmasında PCR reaksiyonu için kullanılan turunçgillere ait sentetik primerler Çizelge 3.5'de verilmiştir (Aka Kaçar ve ark, 2007).

Çizelge 3.5. SSR Analizinde Kullanılan Primer Listesi

| No | Primer | No | Primer |
|---|---|---|---|
| 1 | 84 | 12 | 161 |
| 2 | 105 | 13 | 171 |
| 3 | 173 | 14 | 178 |
| 4 | 506 | 15 | 458 |
| 5 | AC01 | 16 | 472 |
| 6 | G05 | 17 | 473 |
| 7 | C08 | 18 | 488 |
| 8 | 121 | 19 | 494 |
| 9 | 54 | 20 | 495 |
| 10 | 83 | 21 | 501 |
| 11 | 139 | 22 | 506 |

### 3.2.15. Li-Cor için Poliakrilamid Jel Hazırlığı

Laboratuvar çalışması sonucunda elde edilen PCR ürünlerini koşmak amacıyla %6.5 poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Bu jelin hazırlanmasında kullanılan kimyasalların listesi ve kullanılan miktarları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. 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 jel'in 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 buffer'ı eklenmiş ve PCR'da 95°C'de 4 dk denatüre edilerek örneklerden 1 µl jel'e pipet yardımıyla yüklenmiştir. Daha sonra cihaz çalışma şartları olan 1500 V, 35 mA, 50 W 48°C'de jel koşullarında 1.5 saat koşturulmuştur.




Şekil 3.11. Poliakrilamid jel hazırlanması ve Li-Cor elektroforez cihazı A: Aparatın hazırlanması B: Aparatın Li-Cor elektroforez cihazına yerleştirilmesi

### 3.2.17. Deneme Planı, İstatistik Analizleri ve İncelenen Kriterler

Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı turunçgil anaçlarının mikroçoğaltımı ve köklendirilmesi amacıyla kurulan denemelerin tamamı 3 tekerrürlü olacak şekilde, faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Turunçgil anaçlarının *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. Mikroçoğaltım denemelerinde 3 altkültür yapılmış olup altkültürlerin ortalamaları alınmıştır. Katı kültür denemelerinde bitkiler 4 haftada bir altkültüre alınmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde ise bitkiler 8 haftada bir altkültüre alınmıştır. Her altkültür sonunda 10'ar bitki incelenmiştir. Her iki sistemde, her altkültür sonunda, kardeşlenme katsayısı (adet/bitkicik), bitki boyu (cm) ve bitkilerin genel görünümlerine ait kriterler incelenmiştir. Köklenme denemelerinde; köklendirme ortamında kültüre alma işleminden 8 hafta sonra köklenme oranı (%), bitki uzunluğu (cm), kök sayısı (kök/bitki), kök uzunluğu (cm) değerleri hesaplanmıştır.

Tez çalışmasında elde edilen yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmıştır. Çalışmada elde edilen veriler ile varyans analizleri gerçekleştirilmiştir. Önemli çıkan ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile belirlenmiştir. İstatistik analizlerde JMP 8.01 programı kullanılmıştır.

# 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Tez çalışmasında, Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı turunçgil anaçlarının katı kültür mikroçoğaltım ve köklendirme denemeleri sonucunda belirlenen en başarılı besin ortamı ve BBD konsantrasyonları kullanılarak katı kültüre kıyasla Plantform geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin etkisi gözlemlenmiştir. Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminde kültür kaplarına 4 saatte bir 10 dk daldırma süresi ve 4 saatte bir 15 dk havalandırma işlemi uygulanmıştır. Çalışmada katı kültür ve Plantform sisteminden elde edilen köklü bitkiler seraya aktarılmıştır. Çalışma sonucunda katı kültür ve Plantform sistemlerinde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik açılım olup olmadığı başlangıç materyali ile karşılaştırma sağlanarak gerçekleştirilmiştir.

## 4.1. Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemelerine ait Bulgular

Tez çalışmasında ilk önce katı kültür mikroçoğaltım denemeleri yürütülmüştür. Katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde MS ve WPM besin ortamları ile BAP (0, 0.1, 2.0 mg/L), 2İP (0, 0.1, 0,2 mg/L) ve KİN'in (0, 0.5 ve 1.0 mg/L) farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. Mikroçoğaltım denemelerinde genotiplere ait kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitkicik) ve bitki boyu (cm) parametleri incelenmiştir.

### 4.1.1. Tuzcu 31-31 Turuncuna ait Bulgular

Tuzcu 31-31 turuncunda katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin bitki boyu üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.1). Tuzcu 31-31 turuncunda farklı besin ortamları ve BBD tipi/konsantrasyonlarının katı kültürde bitki boyu üzerine etkisi incelendiğinde, en başarılı besin ortamı WPM, en başarılı bitki büyüme düzenleyicisi KİN olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Tuzcu 31-31 turuncunun katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyuna (cm) ait veriler

| BBD | BBD Konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|
| BAP | 1.0 | 0.80e | 1.1de | 0.95C |
| | 2.0 | 1.0de | 1.60bcd | 1.30BC |
| 2İP | 1.0 | 1.20cde | 1.66bcd | 1.43BC |
| | 2.0 | 1.23cde | 1.80bc | 1.51B |
| KİN | 0.5 | 1.33cde | 2.90a | 2.11A |
| | 1.0 | 1.1de | 3.16a | 2.13A |
| Kontrol | 0.0 | 2.2b | 2.1b | 2.15A |
| **Ortam Ortalaması** | | 1.38B | 2.05A | - |

$LSD_{Ortam}$: 0.24***
$LSD_{BBD}$: 0.48***
$LSD_{Ortam \times BBD}$: 0.68***

Çizelge 4.1 incelendiğinde, en yüksek bitki boyunun 3.16 cm ile 0.5 mg/L KİN eklenmiş WPM besin ortamında elde edildiği görülmektedir. Çalışmada bitki büyüme düzenleyici içermeyen kontrol grubu (2.15 cm) ve KİN'in 0.5 mg/L (2.11 cm) ve 1 mg/L (2.13 cm) konsantrasyonları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre besin ortamı*BBD interaksiyonunun istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin BBD tipi/konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır.

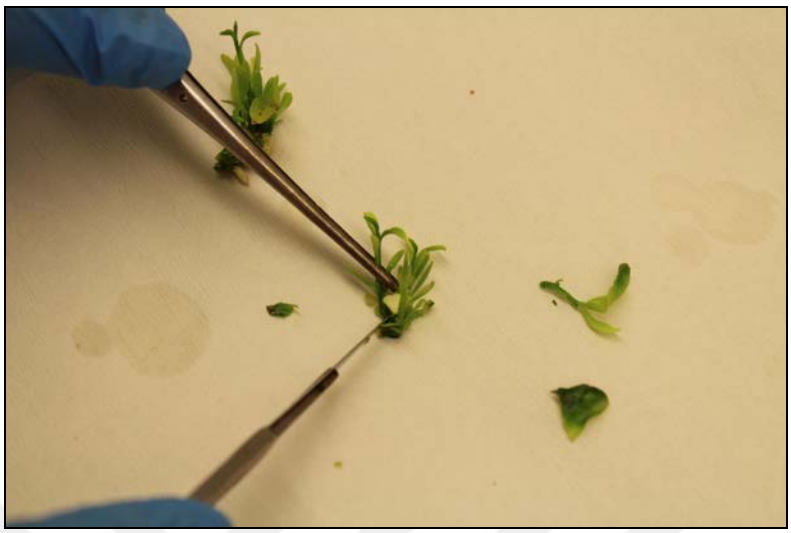
Katı kültürde Tuzcu 31-31 turuncunun kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitkicik) üzerine farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisine ait veriler Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Kardeşlenme katsayısına ait veriler incelendiğinde, ortam ve ortam*BBD interaksiyonu istatistiksel olarak önemsiz bulunurken, BBD tipi/konsantrasyonları istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Tuzcu 31-31 turuncunda katı kültür mikroçoğaltım denemesi kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) ait veriler

| BBD | BBD Konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|
| BAP | 1.0 | 2.3bc | 2.4ab | 2.4A |
| | 2.0 | 3.4a | 2bcd | 2.7A |
| 2İP | 1.0 | 1.8bcde | 0.7fg | 1.3BC |
| | 2.0 | 1.2defg | 0.8fg | 1.01BC |
| KİN | 0.5 | 1.2defg | 0.8fg | 1.05BC |
| | 1.0 | 0.4g | 0.9efg | 0.66C |
| Kontrol | 0.0 | 1.4def | 1.4cdef | 1.4B |
| **Ortam Ortalaması** | | 1.66A | 1.33A | - |

$LSD_{Ortam}$: Ö.D.
$LSD_{BBD}$: 0.67***
$LSD_{Ortam \times BBD}$:Ö.D

Araştırmada kullanılan besin ortamlarından MS (1.66 kardeş/bitkicik) besin ortamının WPM (1.33 kardeş/bitkicik) ortamına göre istatistiksel olarak farklı olmamasına rağmen ortalamasının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. BBD'ler arasında istatistiksel fark bulunması, besin ortamlarının kardeşlenme üzerindeki etkisinin BBD tipi/konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Çalışmada en yüksek kardeşlenme katsayısı 3.4 kardeş/bitkicik ile 2.0 mg/L BAP eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Bu oranı 2.4 kardeş/bitkicik ile 1.0 mg/L BAP eklenmiş WPM besin ortamı izlemiştir, ancak bu iki ortam arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Tuzcu 31-31 turuncunun katı kültürde kardeşlenmesine ait görüntü Şekil 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Tuzcu 31-31 turuncunun katı kültürde kardeşlenmesi (2 mg/L BAP içeren MS ortamı)

### 4.1.2. C-35 sitranjına ait Bulgular

C-35 sitranjı genotipine ait katı kültür mikroçoğaltım denemesinde farklı besin ortamı ve BBD tipi/konsantrasyonlarının bitki boyu üzerine etkileri belirlenmiştir. Bitki boyu gelişimi için besin ortamı ve BBD'lerin etkilerine ait veriler Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Veriler incelendiğinde, bitki boyu üzerine besin ortamı ve BBD tipi/konsantrasyonlarının etkisinin istatistiksel açıdan önemli olduğu, ortam*BBD interaksiyonunun ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. C-35 sitranjı katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyuna (cm) ait veriler

| BBD | BBD Konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|
| BAP | 1.0 | 2.13d | 2.96bcd | 2.55BC |
| | 2.0 | 2.10d | 3.46abc | 2.78BC |
| 2İP | 1.0 | 2.60cd | 4.10ab | 3.35AB |
| | 2.0 | 3.03bcd | 4.30a | 3.66A |
| KİN | 0.5 | 3.36abc | 4.46a | 3.91A |
| | 1.0 | 1.90d | 4.33a | 3.11ABC |
| Kontrol | 0.0 | 2.50cd | 2.43cd | 2.46C |
| **Ortam Ortalaması** | | 2.51B | 3.72A | - |

$LSD_{Ortam}$: 0.46***
$LSD_{BBD}$: 0.86*
$LSD_{Ortam \times BBD}$: Ö.D.

C-35 sitranjının katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde, en yüksek bitki boyu 4.46 cm ile 0.5 mg/L KİN içeren WPM besin ortamından elde edilmiştir. Bunu sırasıyla 4.33 cm ile 1.0 mg/L KİN ve 4.30 cm 2 mg/L 2İP eklenmiş WPM besin ortamları izlemiştir. Çalışmada 0.5 mg/L KİN (4.46 cm) ve 1.0 mg/L KİN (4.33 cm) eklenmiş WPM besin ortamları ile 2 mg/L 2İP (4.30 cm) eklenmiş WPM besin ortamları arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Bitki boyu açısından çalışmada kullanılan besin ortamları değerlendirildiğinde, WPM (3.72 cm) besin ortamı MS (2.51 cm) besin ortamına göre daha başarılı bulunmuştur. WPM ve MS besin ortamları ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Tez çalışması kapsamında C-35 sitranjı anacına ait katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitkicik) üzerine etkileri belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. C-35 sitranjı katı kültür mikroçoğaltım denemesi kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) ait veriler

| BBD | BBD Konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|
| BAP | 1.0 | 8.53ab | 5.56bc | 7.05B |
| | 2.0 | 13.40a | 10.80ab | 12.10A |
| 2İP | 1.0 | 1.46c | 1.36c | 1.41C |
| | 2.0 | 2.23c | 1.63c | 1.93C |
| KİN | 0.5 | 0.80c | 1.36c | 1.08C |
| | 1.0 | 0.83c | 1.70c | 1.26C |
| Kontrol | 0.0 | 0.40c | 0.36c | 0.38C |
| **Ortam Ortalaması** | | 3.95A | 3.25A | - |

$LSD_{BBD}$: 4.27***
$LSD_{Ortam}$: Ö.D.
$LSD_{Ortam \times BBD}$: Ö.D.

C-35 sitranjı genotipine ait katı kültür mikroçoğaltım denemesi kardeşlenme katsayısı sonuçlarına göre kullanılan BBD'ler arasında istatistiki olarak önemli farklılık tespit edilirken, besin ortamı ve besin ortamı*BBD interaksiyonu önemsiz bulunmuştur. Çizelge 4.4 incelendiğinde, araştırmada kullanılan besin ortamları arasında istatistiksel olarak önemli farklılık olmamasına rağmen MS besin ortamında kardeşlenme katsayısı (3.95 kardeş/bitkicik) WPM besin ortamındaki kardeşlenme sayısından (3.25 kardeş/bitkicik) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada en yüksek kardeşlenme katsayısı 13.4 kardeş/bitkicik ile 2.0 mg/L BAP içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Bu oranı 10.8 kardeş/bitkicik ile 1.0 mg/L BAP ilave edilmiş WPM besin ortamı takip etmiştir. C-35 sitranjı katı kültür mikroçoğaltım denemesi kardeşlenme katsayısı parametresi istatistiksel analiz sonuçlarına göre kontrol ortamı, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L KİN ve 1.0 mg/L, 2.0 mg/L 2İP BBD konsantrasyonlarının MS ve WPM besin ortamları ile interaksiyonları arasındaki fark önemsiz olup en düşük kardeşlenme

katsayıları bu interaksiyonlardan elde edilmiştir. C-35 sitranjında katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen görüntü Şekil 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. C-35 sitranjında katı kültür 2 mg/L BAP içeren MS besin ortamından elde edilen bitkicikler

### 4.2. Katı Kültür Köklenme Denemelerine ait Bulgular

Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı anaçlarının başarılı bir şekilde çoğaltılmasının ardından katı kültür köklenme denemeleri kurulmuştur. Köklendirme denemelerinde MS, 1/2 MS ve WPM besin ortamları ile NAA ve IBA bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları (0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L) kullanılmıştır. Sekiz haftalık kültür süresi sonucunda bitkilerde kök sayısı (kök/bitki), kök uzunluğu (cm), bitki boyu (cm) ve köklenme oranı (%) parametreleri incelenmiştir.

### 4.2.1. Tuzcu 31-31 Turuncuna ait Bulgular

Tuzcu 31-31 turuncu kök sayısı verileri değerlendirildiğinde ortamlar, BBD'ler ve ortam*BBD interaksiyonu sonuçları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Tuzcu 31-31 genotipi katı kültür köklenme denemesine ait veriler Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

Kök sayısı sonuçlarına bakıldığında en başarılı ortam 3.09 (kök/bitki) ile ½ MS besin ortamından elde edilmiştir. Çalışmada MS (2.44 adet) ve WPM (2.04 adet) besin ortamları arasında istatistiki açıdan önemli farklılık bulunmamıştır. Tuzcu 31-31 turuncunda katı kültür kök sayısında en başarılı BBD tipi/konsantrasyonu 2 mg/L NAA (4.62 kök/bitki) olarak tespit edilmiştir. Besin ortamı*BBD tipi/konsantrasyon interaksiyonuna bakıldığında 2 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamı (6.43 kök/bitki) en başarılı bulunmuştur.

Çizelge 4.5. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi kök sayısına (kök/bitki) ait veriler

| BBD | BBD konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | 1/2 MS Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|---|
| NAA | 0.5 | 3.4de | 3.6cd | 3.1def | 3.40B |
| | 1.0 | 3.6cd | 3.1def | 5.0bc | 3.90AB |
| | 2.0 | 5.16ab | 2.26defg | 6.43a | 4.62A |
| IBA | 0.5 | 1.1gh | 1.0gh | 1.96fgh | 1.35C |
| | 1.0 | 1.33gh | 1.93fgh | 1.73fgh | 1.66C |
| | 2.0 | 1.66gh | 1.33gh | 2.06efgh | 1.68C |
| Kontrol | 0.0 | 0.66h | 1.0gh | 1.33gh | 1.0C |
| **Ortam Ortalaması** | | 2.41B | 2.04B | 3.09A | - |

$LSD_{Ortam}$: 0.53**
$LSD_{BBD}$: 0.81***
$LSD_{Ortam \times BBD}$: 1.41**

Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi kök uzunluğu (cm) sonuçları değerlendirildiğinde, besin ortamı ve besin ortamı*BBD interaksiyonu istatistiksel açıdan önemsiz bulunurken, BBD'ler arasındaki fark önemli bulunmuştur. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi kök uzunluğu (cm) sonuçları Çizelge 4.6'da sunulmuştur. En başarılı BBD tipi ve konsantrasyonu 1.0 mg/L (7.7 cm) ve 2.0 mg/L (7.63 cm) IBA olarak tespit edilmiştir. Bunu 0.5 mg/L IBA (7.38 cm) konsantrasyonu takip etmiştir. 0.5 mg/L (5.96 cm), 1.0 mg/L (5.85 cm), ve 2.0 mg/L (3.21 cm) NAA ise istatistiksel açıdan en düşük BBD tipi/konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi kök uzunluğu (cm)

| BBD | BBD konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | 1/2 MS Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|---|
| NAA | 0.5 | 5.16defgh | 6.70abcdef | 6.03cdefg | 5.96BC |
| | 1.0 | 6.26bcdef | 6.63abcdef | 4.6efgh | 5.85C |
| | 2.0 | 3.33h | 3.66gh | 2.6h | 3.21D |
| IBA | 0.5 | 8.80ab | 6.06cdefg | 7.30abcd | 7.38AB |
| | 1.0 | 8.86a | 6.60abcdef | 7.63abcd | 7.7A |
| | 2.0 | 7.86abc | 7.26abcd | 7.76abc | 7.63A |
| Kontrol | 0.0 | 3.66gh | 4.23fgh | 7.03abcde | 4.97C |
| **Ortam Ortalaması** | | 6.28A | 5.88A | 6.15A | - |

$LSD_{Ortam}$:Ö.D.
$LSD_{BBD}$: 1.47***
$LSD_{Ortam \times BBD}$: Ö.D.

Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi bitki boyu (cm) sonuçları değerlendirildiğinde, besin ortamı, BBD ve besin ortamı*BBD interaksiyonu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi bitki boyu (cm) sonuçları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi bitki boyu (cm) verileri

| BBD | BBD konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | 1/2 MS Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|---|
| NAA | 0.5 | 2.86abcd | 3.60a | 1.73efgh | 2.73A |
| | 1.0 | 2.86abcd | 3.43ab | 1.23h | 2.51AB |
| | 2.0 | 1.50gh | 2.36cdef | 1.03h | 1.63C |
| IBA | 0.5 | 1.60fgh | 2.73bcd | 2.16defg | 2.16B |
| | 1.0 | 2.16defg | 2.66bcd | 2.46cde | 2.43AB |
| | 2.0 | 1.83efgh | 2.90abcd | 1.53gh | 2.08BC |
| Kontrol | 0.0 | 2.10defg | 3.16abc | 1.73efgh | 2.33AB |
| **Ortam Ortalaması** | | 2.13B | 2.98A | 1.70C | - |

$LSD_{Ortam}$: 0.30***
$LSD_{BBD}$: 0.46***
$LSD_{Ortam \times BBD}$: 0.80*

Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemelerinde en başarılı ortam WPM (2.98 cm) iken MS (2.13 cm) ve ½ MS (1.70 cm) besin ortamları onu takip etmiştir. En başarılı BBD tipi/konsantrasyonu 2.73 cm ile 0.5 mg/L NAA olarak tespit edilmiştir. Bunu 2.51 cm ile 1.0 mg/L NAA, 2.43 cm ile 1.0 mg/L IBA ve kontrol ortamı takip etmiştir. İstatistiksel açıdan bitki boyu en düşük 1.63 cm ile 2.0 mg/L NAA ve 2.08 cm ile 2 mg/L IBA BBD tipi/konsantrasyonu olmuştur. Besin ortamı*BBD interaksiyonuna baktığımızda en başarılı ortam 3.60 cm bitki boyu ile 0.5 mg/L NAA içeren WPM besin ortamı olarak belirlenmiştir.

Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi köklenme oranı (%) sonuçları değerlendirildiğinde, besin ortamı, BBD ve besin ortamı*BBD interaksiyonu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi köklenme oranı (%) sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi köklenme oranı (%)

| BBD | BBD konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | 1/2 MS Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|---|
| NAA | 0.5 | 100 (90)a | 100 (90)a | 100 (90)a | 100 (90)A |
| | 1.0 | 70 (57.78)c | 91.66 (80)a | 100 (90)a | 87.22 (75.92)B |
| | 2.0 | 40 (38.85)d | 91.66 (80)a | 70 (57.78)c | 67.22 (58.88)C |
| IBA | 0.5 | 70 (57.78)c | 30 (33.21)de | 100 (90)a | 66.66 (60.33)C |
| | 1.0 | 100 (90)a | 70 (57.78)c | 100 (90)a | 90 (79.26)AB |
| | 2.0 | 90 (75)ab | 30 (33.0)de | 100 (90)a | 73.33 (66.00)C |
| Kontrol | 0.0 | 20 (21.93)e | 20 (26.56)de | 80(63.43)bc | 40 (37.31)D |
| **Ortam Ortalaması** | | 70 (61.62)B | 61.90 (57.22)C | 92.85 (81.60)A | - |

$LSD_{Ortam}$: 6.20***
$LSD_{BBD}$: 9.47***
$LSD_{Ortam \times BBD}$: 16.40***

Tuzcu 3131 katı kültür köklenme denemesinde en başarılı ortam ½ MS (%92) iken, MS (%70) ve WPM (%61) besin ortamları onu takip etmiştir. En başarılı BBD %100 köklenme oranı ile 0.5 mg/L NAA olmuştur. Bunu 1.0 mg/L NAA (%87) takip etmiştir. İstatistiksel açıdan en başarısız köklenme oranı kontrol ortamında (%40) görülmüştür. Besin ortamı*BBD interaksiyonuna baktığımızda 1.0 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamı, 0.5 mg/L NAA içeren WPM ve MS besin ortamları, 1.0 mg/L IBA içeren MS ve ½ MS besin ortamları ve 0.5 mg/L IBA ile 2.0 mg/L IBA içeren ½ MS besin ortamında da %100 köklenme elde edilmiştir.

### 4.2.2. C-35 Sitranjına ait Bulgular

C-35 sitranjı katı kültür kök sayısı verileri değerlendirildiğinde ortamlar, BBD'ler ve ortam*BBD interaksiyonu sonuçları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. C-35 sitranjı genotipine ait katı kültür köklenme denemesi kök sayısı (kök/bitki) sonuçları Çizelge 4.9'de verilmiştir.

Çizelge 4.9. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi kök sayısı (kök/bitki) verileri

| BBD | BBD konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | 1/2 MS Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|---|
| NAA | 0.5 | 2.0de | 3.66cd | 6.60a | 4.08A |
| | 1.0 | 3.86bc | 3.33cd | 5.66ab | 4.28A |
| | 2.0 | 4.66bc | 4.86abc | 4.5bc | 4.67A |
| IBA | 0.5 | 0.33e | 1.0e | 0.66e | 0.66B |
| | 1.0 | 0.66e | 1.0e | 0.33e | 0.66B |
| | 2.0 | 1.0e | 1.0e | 1.0e | 1.0B |
| Kontrol | 0.0 | 0.66e | 1.0e | 1.0e | 0.88B |
| **BBD Ortalaması** | | 1.88B | 2.26AB | 2.82A | - |

$LSD_{Ortam}$: 0.69*
$LSD_{BBD}$: 1.05***
$LSD_{Ortam \times BBD}$: 1.82*

C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi kök sayıları (kök/bitki) incelendiğinde, en başarılı besin ortamının 2.82 adet kök sayısı ile ½ MS besin ortamı olduğu tespit edilmiştir. ½ MS besin ortamını WPM (2.26 adet) ve MS (1.88 kök/bitki) besin ortamları takip etmiştir. En iyi BBD tipi/konsantrasyonu 2.0 mg/L (4.67 kök/bitki), 1.0 mg/L (4.28 kök/bitki) ve 0.5 mg/L (4.08 kök/bitki) NAA olarak belirlenmiştir. Besin ortamı*BBD tipi/konsantrasyon interaksiyonuna bakıldığında en başarılı kombinasyon 0.5 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamı (6.60 kök/bitki) olmuştur.

C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi kök uzunluğu (cm) sonuçları değerlendirildiğinde istatistiki açıdan herhangi bir fark elde edilememiştir. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi kök uzunluğu (cm) sonuçları Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi kök uzunluğu (cm)

| BBD | BBD konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | 1/2 MS Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|---|
| NAA | 0.5 | 1.53ab | 1.73ab | 1.83ab | 1.7AB |
| | 1.0 | 1.5ab | 3.16a | 1.0b | 1.88A |
| | 2.0 | 1.73ab | 1.33b | 1.8ab | 1.62ABC |
| IBA | 0.5 | 0.33b | 1.93ab | 1.16b | 1.14ABC |
| | 1.0 | 0.5b | 1.23b | 1.0b | 0.91ABC |
| | 2.0 | 0.4b | 0.66b | 1.03b | 0.7C |
| Kontrol | 0.0 | 0.53b | 1.06b | 1.0b | 0.86BC |
| **Ortam Ortalaması** | | 0.93B | 1.59A | 1.26AB | - |

$LSD_{Ortam:}$ Ö.D.
$LSD_{BBD}$: Ö.D.
$LSD_{Ortam \times BBD}$: Ö.D.

C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi kök uzunluğu (cm) sonuçlarına göre, ortalaması en yüksek BBD 1.0 mg/L NAA (1.88 cm), besin ortamı ortalaması en yüksek WPM besin ortamı (1.59 cm) ve besin ortamı*BBD tipi/konsantrasyonu interaksiyonunda en yüksek kök uzunluğu 1 mg/L NAA (3.16 cm) içeren WPM besin ortamından elde edilmiştir.

C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi bitki boyu (cm) sonuçları değerlendirildiğinde, besin ortamı, BBD ve besin ortamı x BBD interaksiyonu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi bitki boyu (cm) verileri

| BBD | BBD konsantrasyonu (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | 1/2 MS Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|---|
| NAA | 0.5 | 3.5a | 2.90abcd | 2.73abcde | 3.04A |
| | 1.0 | 2.96abcd | 3.03abcd | 1.66fg | 2.55ABC |
| | 2.0 | 3.23abc | 2.53bcdef | 2.3cdefg | 2.68ABC |
| IBA | 0.5 | 3.46ab | 2.26defg | 2.43cdef | 2.72AB |
| | 1.0 | 2.1defg | 1.86efg | 2.46cdef | 2.14CD |
| | 2.0 | 1.4g | 2.36cdef | 2.2defg | 1.98D |
| Kontrol | 0.0 | 2.63abcde | 2.23defg | 2.33cdefg | 2.4BCD |
| **Ortam Ortalaması** | | 2.75A | 2.45AB | 2.30B | - |

$LSD_{Ortam}$: 0.35*
$LSD_{BBD}$: 0.54**
$LSD_{Ortam \times BBD}$: 0.94*

C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesinde bitki boyu (cm) açısından en başarılı ortam MS (2.75 cm) iken, MS besin ortamını sırasıyla WPM (2.45 cm) ve ½ MS (2.30 cm) besin ortamları izlemiştir. En başarılı BBD tipi/konsantrasyonu 3.04 cm bitki boyu uzunluğu ile 0.5 mg/L NAA olarak belirlenmiştir. Besin ortamı*BBD interaksiyonunda bitki boyu açısından en başarılı BBD tipi/konsantrasyonu 3.5 cm ile 0.5 mg/L NAA içeren MS besin ortamı olmuştur. En kısa bitki boyu 1.4 cm ile 2.0 mg/L IBA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir.

C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi köklenme oranı (%) sonuçları değerlendirildiğinde, besin ortamı, BBD ve besin ortamı*BBD interaksiyonu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi köklenme oranı (%) sonuçları Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi köklenme oranı (%)

| BBD | BBD konsant. (mg/L) | MS Besin ortamı | WPM Besin ortamı | 1/2 MS Besin ortamı | BBD Ortalaması |
|---|---|---|---|---|---|
| NAA | 0.5 | 40 (38.85)def | 30 (33.21)efg | 100 (90.0)a | 56.66 (54.02)BC |
| | 1.0 | 80 (68.06)b | 70 (57.78)bcd | 70 (57.78)bcd | 73.33 (61.21)A |
| | 2.0 | 60 (51.14)bcde | 70 (62.00)bc | 60 (51.14)bcde | 63.33 (54.76)AB |
| IBA | 0.5 | 10 (15.00)g | 50 (45.00)cdef | 30 (33.21)efg | 30 (31.07)D |
| | 1.0 | 20 (26.56)fg | 60 (51.84)bcde | 10 (15.00)g | 30 (31.13)D |
| | 2.0 | 30 (33.00)efg | 50 (45.00)cdef | 60 (51.14)bcde | 46.66 (43.04)C |
| Kontrol | 0.0 | 20 (26.07)fg | 30 (33.00)efg | 40 (39.23)def | 30 (32.76)D |
| **Ortam Ortalaması** | | 37.14 (36.95)B | 51.42 (46.83)A | 52.85 (48.21)A | - |

$LSD_{Ortam}$: 7.87**
$LSD_{BBD}$: 12.03***
$LSD_{Ortam \times BBD}$: 20.84**

C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi köklenme oranı (%) sonuçlarında en başarılı ortam ½ MS (%52) ve WPM (%51) olmuştur. MS besin ortamı %37 ile en az köklenme oranına sahip olmuştur. En başarılı BBD %73 ile 1.0 mg/L NAA olarak belirlenmiştir. 1.0 mg/L NAA'yı %54 ile 2.0 mg/L NAA takip etmiştir. İstatistiksel açıdan en başarısız köklenme oranı kontrol ortamında (%30) görülmüştür. Besin ortamı*BBD interaksiyonuna baktığımızda 0.5 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamında %100 köklenme elde edilmiştir. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemeleri sonucunda elde edilen köklü bitkiler Şekil 4.3'te sunulmuştur.



Şekil 4.3. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi sonucunda 0.5 mg/L NAA içeren 1/2 MS besin ortamında elde edilen köklü bitkiler

### 4.3. Plantform Mikroçoğaltım Denemesine ait Bulgular

Katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda belirlenen 2.0 mg/L BAP içeren MS besin ortamı ile Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri kurulmuş olup bu sonuçlar ile katı kültür mikroçoğaltım denemelerinin sonuçları karşılaştırılmıştır. Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı anaçlarının katı kültür mikroçoğaltım sonucu ile Plantform sistemi mikroçoğaltım sonucuna ait veriler Çizelge 4.13'de sunulmuştur. Tuzcu 31-31 turuncunu bitki boyu (cm) açısından incelediğimizde katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyu 1.0 cm iken Plantform'da 6.23 cm olarak elde edilmiştir. Kardeşlenme katsayısı ise katı kültür mikroçoğaltım denemesinde 3.4 (kardeş/bitkicik) iken Plantform mikroçoğaltım denemesinde 5.2 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Kardeşlenme katsayısı bakımından Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür mikroçoğaltım ve Plantform sistemi mikroçoğaltım denemeleri için istatistiki açıdan fark görülmesine karşın, Plantform sisteminde kardeşlenme katsayısı ortalaması daha yüksek bulunmuş olup bitki kalitesinin daha iyi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.13. Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı genotiplerine ait katı kültür ve Plantform sistemi mikroçoğaltım sonuçlarına ait veriler

| Genotip | Ortam | Kardeş Sayısı (kardeş/bitkicik) | Bitki Boyu (cm) |
|---|---|---|---|
| Tuzcu 31-31 Turuncu | Katı | 3.4 A | 1.0 B |
| | Plantform | 5.26 A | 6.23 A |
| C-35 Sitranjı | Katı | 13.4 A | 2.10 A |
| | Plantform | 13.3 A | 2.03 A |



Şekil 4.4. Tuzcu 31-31 turuncunun Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkiler

C-35 sitranjı anacı bitki boyu açısından incelediğinde katı kültür mikroçoğaltım denemesi bitki boyu 2.1 cm iken Plantform'da 2.0 cm olarak tespit edilmiştir. Kardeşlenme katsayısının ise katı kültür mikroçoğaltım denemesinde 13.4 (kardeş/bitkicik), Plantform sistemi mikroçoğaltım denemesinde 13.3 (kardeş/bitkicik) olduğu belirlenmiştir. C-35 sitranjı katı kültür ve Plantform sistemi mikroçoğaltım denemeleri için bitki boyu ve kardeşlenme katsayısı bakımından elde edilen farklılık, istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur. C-35 sitranjı Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkilere ait görüntü Şekil 4.5'te sunulmuştur.



Şekil 4.5. C-35 sitranjı Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkiler

### 4.4. Plantform Köklenme Denemesine ait Bulgular

Katı kültür köklenme denemeleri sonucunda belirlenen 0.5 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamı ile Plantform sisteminde köklenme denemeleri kurulmuştur. Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi sonucu ile Plantform sistemi köklenme denemesine ait sonuçlar Çizelge 4.14'de verilmiştir. Plantform köklenme denemeleri sonuçları ile katı kültür köklenme denemelerinin sonuçları karşılaştırıldığında, Tuzcu 31-31 turuncu bitki boyu parametresi bakımından katı kültür köklenme denemesinde bitki boyu 1.73 cm elde edilirken Plantform sistemi köklenme denemesinde bitki boyu 3.16 cm olarak bulunmuştur. Kök sayısı kıyaslandığında katı kültürde 3.13 (kök/bitki) iken Plantform sisteminde 3.46 (kök/bitki) olarak belirlenmiştir. Kök uzunluğu sonuçlarına bakıldığında katı kültür köklenme denemesinde 6.03 cm iken Plantform'da 6.40 cm olarak bulunmuştur. Köklenme oranlarına baktığımızda ise katı kültürde %91.66 iken Plantform sisteminde %100 olarak elde edilmiştir. Tuzcu 31-31 turuncu için katı kültür köklenme denemeleri ile Plantform sistemi köklenme denemelerini

kıyasladığımızda bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm) ve köklenme yüzdeleri (%) bakımından Plantform sisteminde daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca Plantform sisteminde daha sağlıklı ve kaliteli köklenmiş bitkiler elde edilmiştir (Şekil 4.6).

Çizelge 4.14. Tuzcu 31-31 turuncuna ait katı kültür ve Plantform sistemi köklenme sonuçları

| Ortam | Kök Sayısı (kök/bitki) | Kök Uzunluğu (cm) | Bitki Boyu (cm) | Köklenme Oranı (%) |
|---|---|---|---|---|
| **Katı** | 3.13a | 6.03a | 1.73b | 91.66 (80.00)a |
| **Plantform** | 3.46b | 6.40a | 3.16a | 100 (90.00)a |



Şekil 4.6. Tuzcu 31-31 turuncu Plantform sisteminde köklenen bitkiler

Çalışmada C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemeleri sonucunda en başarılı olarak belirlenen 0.5 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamı ile Plantform sisteminde köklenme denemesi kurulmuştur. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi sonucu ile Plantform sistemi köklenme denemesine ait sonuçlar Çizelge 4.15'de verilmiştir. Plantform köklenme denemeleri sonuçları ile katı kültür köklenme denemelerinin sonuçları karşılaştırıldığında, C-35 sitranjı anacı bitki

boyu katı kültür köklenme denemesinde 2.73 cm, Plantform sistemi köklenme denemesinde 6.50 cm olarak tespit edilmiştir. Kök sayısı kıyaslandığında katı kültürde 6.6 (kök/bitki) iken Plantform sisteminde 4.03 (kök/bitki) bulunmuştur. Kök uzunluğu sonuçlarına bakıldığında, katı kültür köklenme denemesinde 1.83 cm iken Plantform'da 6.26 cm olarak bulunmuştur. Köklenme oranları ise katı kültürde %91.66, Plantform sisteminde %100 olarak elde edilmiştir. C-35 sitranjı için katı kültür köklenme denemeleri ile Plantform sistemi köklenme denemelerini kıyasladığımızda bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm) ve köklenme yüzdeleri (%) bakımından Plantform sisteminde daha başarılı sonuçlar elde edilmiş, ayrıca daha sağlıklı ve kaliteli köklenmiş bitkiler elde edilmiştir. C-35 sitranjının Plantform sisteminde köklenmesine ait görüntü Şekil 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.15. C-35 sitranjı genotipine ait katı kültür ve Plantform sistemi köklenme sonuçları

| Ortam | Kök Sayısı (kök/bitki) | Kök Uzunluğu (cm) | Bitki Boyu (cm) | Köklenme Oranı (%) |
|---|---|---|---|---|
| **Katı** | 6.6 a | 1.83 b | 2.73 b | 91.66 (80.00)a |
| **Plantform** | 4.03 b | 6.26 a | 6.50 a | 100 (90.00)a |



Şekil 4.7. C-35 sitranjında Plantform sisteminde gelişen köklü bitkiler

Katı kültür ve Plantform sistemlerinden elde edilen köklü bitkiler dış koşullara alıştırılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı genotiplerinde katı kültür ve Plantform sistemlerinden elde edilen köklü bitkilerin dış koşullarda yaşama oranı %100 olmuştur. Katı kültür sonrası dış koşullara alıştırılan bitkilere ait görüntü Şekil 4.8'de, Plantform sisteminde dış koşullara alıştırılan bitkilere ait görüntü Şekil 4.9'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Tuzcu 31-31 turuncunda katı kültürde köklendirilip dış koşullara alıştırılan bitkiler




Şekil 4.9. Plantform sisteminde dış koşullara alıştırılan bitkiler. A: Tuzcu 31-31 turuncu. B: C-35 sitranjı

### 4.5. Moleküler Çalışmalara ait Bulgular

Tez çalışması sonucunda, Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı turunçgil anaçlarının katı kültür mikroçoğaltım ve köklendirme denemeleri sonuçları elde edildikten sonra Plantform sisteminde mikroçoğaltım ve köklendirme denemeleri kurulup başarılı bir şekilde sonuçlandırılmıştır. Çalışmada katı kültür ve Plantform biyoreaktör sistemlerinde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik farklılık olup olmadığı başlangıç materyali ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında Plantform siteminin kullanımı ile ilgili başarılı bir protokolün geliştirilebilmesi için Plantform sisteminde çalışılan bitkilerin başlangıç materyali ile genetik olarak farklı olmaması gerekmektedir. Çalışmada kullanılan Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı genotiplerinin katı kültür ve Planform sistemlerinden elde edilen klonlarında genetik açılımın olup olmadığı SSR markırları ile tespit edilmiştir. Bu amaçla toplam 22 SSR primeri kullanılmıştır. SSR analizlerinde kullanılmak üzere Tuzcu 31-31 turuncundan 6 ve C-35 sitranjından 6 olmak üzere toplam 12 örnek alınmıştır. SSR analizlerinde kullanılan örneklerin DNA kalite ve miktarına ait bilgiler Çizelge 4.16'te

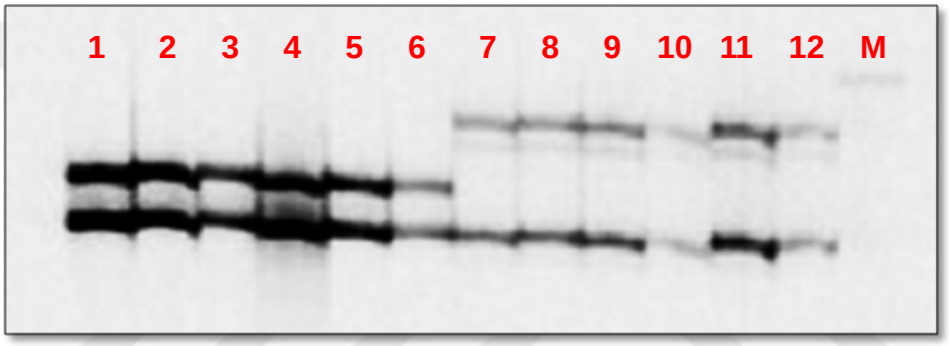
sunulmuştur. Kullanılan bu SSR primerleri kesin olarak polimorfik sonuç veren primerler arasından seçilmiştir.

Çizelge 4.16. DNA kalite ve miktarlarına ait sonuçlar

| Örnek No | Örnek Adı | ng/ul | 260/280 |
|---|---|---|---|
| 1 | Tuzcu 3131 kontrol | 279,68 | 1,89 |
| 2 | Tuzcu 3131 katı kültür mikroçoğaltım denemesi sonrası | 100,63 | 1,8 |
| 3 | Tuzcu 3131 Plantform mikroçoğaltım denemesi öncesi | 124,66 | 1,73 |
| 4 | Tuzcu 3131 Plantform mikroçoğaltım denemesi sonrası | 262,97 | 1,94 |
| 5 | Tuzcu 3131 Plantform köklenme denemesi öncesi | 227,75 | 1,72 |
| 6 | Tuzcu 3131 Plantform köklenme denemesi sonrası | 218,74 | 2,09 |
| 7 | C-35 sitranjı kontrol | 246,63 | 1,78 |
| 8 | C-35 sitranjı katı kültür mikroçoğaltım denemesi sonrası | 210,31 | 1,97 |
| 9 | C-35 sitranjı Plantform mikroçoğaltım denemesi öncesi | 268,23 | 1,99 |
| 10 | C-35 sitranjı Plantform mikroçoğaltım denemesi sonrası | 270,39 | 1,99 |
| 11 | C-35 sitranjı Plantform köklenme denemesi öncesi | 133,94 | 1,9 |
| 12 | C-35 sitranjı Plantform köklenme denemesi sonrası | 511,98 | 2,13 |

Çalışmada PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra tez çalışmasında kullanılan Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı turunçgil anaçlarının katı kültür ve Planform sistemi mikroçoğaltım ve köklendirme denemelerine ait bitkisel

materyallerden alınan DNA örnekleri ile SSR analizleri gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bu primerlerin turunçgiller için polimorfik sonuçlar vermesi nedeniyle bu çalışma sonucunda elde edilen monomorfik DNA bant profilleri bu bitkilerin genetik olarak sabit olduğunu ispatlamaktadır. Sonuç olarak, 22 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. 14 nolu primere ait poliakrilamid jel görüntüsü.

1: Tuzcu 3131 kontrol,
2: Tuzcu 3131 katı kültür mikroçoğaltım denemesi sonrası,
3: Tuzcu 3131 Plantform mikroçoğaltım denemesi öncesi,
4: Tuzcu 3131 Plantform mikroçoğaltım denemesi sonrası,
5: Tuzcu 3131 Plantform köklenme denemesi öncesi,
6: Tuzcu 3131 Plantform köklenme denemesi sonrası,
7: C-35 sitranjı kontrol,
8: C-35 sitranjı katı kültür mikroçoğaltım denemesi sonrası,
9: C-35 sitranjı Plantform mikroçoğaltım denemesi öncesi,
10: C35 sitrajı Plantform mikroçoğaltım denemesi sonrası,
11: C-35 sitranjı Plantform köklenme denemesi öncesi,
12: C-35 sitranjı Plantform köklenme denemesi sonrası, M: Markır,

*In vitro* bitki doku ve organ kültürleri genellikle teknolojik zorluklarla karşı karşıyadır. Kontrollü bir ortamda bitki hücrelerinin kültüre alınması istendiğinde, farklılaşan organ kültürlerinin karakteristik büyüme morfolojisi ve fizyolojisi bakımından gelişme sürecinde problem oluşturmaktadır. Bu sıkıntıları gidermek için GDS on yıl önce geliştirilmiştir. Bu sistemler, bitkilerin *in vitro* kültürü için en doğal ortamı sağlamaktadır. Geçtiğimiz on yıl içerisinde TIS, bitki mikro-yayılımı, bitki kaynaklı ikincil metabolitlerin üretimi, yabancı proteinlerin sentezlenmesi ve bitki iyileştirmede potansiyel çözümler için bir perspektif teknoloji olarak kabul edilmiştir. Günümüzde, benzer veya farklı teknolojik prensipler üzerinde çalışan birkaç GDS, somatik embriyolar, mikroçoğaltım ve kök kültürleri de dahil olmak üzere çeşitli çalışmalarda materyallerin *in vitro* sistemler kullanılarak başarılı bir şekilde gelişebilmesi için uygulanmıştır (Georgiev ve ark, 2014). Geliştirilen GDS'ler arasında TIB, RITA, GIB, SETIS biyoreaktör ve Plantform sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler arasında Plantform biyoreaktör sistemi son yıllarda oldukça yoğun kullanım alanına sahip olmuştur ve farklı araştırıcılar tarafından su mercimeği (Yenice, 2010), yüksük otu, kirpi otu ve ahududu (Welander ve ark, 2014), mersin ve zeytin (Benelli ve ark, 2015), saplı meşe (Gatti ve ark, 2015), süs çimi, kasımpatı, incir ve kırmızı frenk üzümü (Lambardi ve ark, 2015), *Stevia rebaudiana* (Sacco ve ark, 2015), saplı meşe (Enrico ve ark, 2015), Güney Afrika baklagili (Kokotkiewicz ve ark, 2015), vanilya bitkisi (Ramírez-Mosqueda ve Iglesias-Andreu, 2016), orkide (Masnoddin ve ark, 2016), muz (Daungban ve ark, 2016), bambu (Gutiérrez ve ark, 2016), *Sagittaria sagittifolia* (Meiping ve ark, 2016), mersin bitkisi (Biçen ve ark, 2017), gerbera (Frómeta ve ark, 2017), şizandra (Szopa ve ark, 2017) bitkilerinin Plantform biyoreaktör sisteminde gelişimleri incelenmiştir.

Cavallaro ve ark (2017) keçiboynuzu bitkisinin *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım etkinliğini artırmak için Plantform biyoreaktör sistemini kullanmışlardır. Çalışmada Plantform biyoreaktör sisteminin etkinliği agar ile katılaştırılmış klasik doku kültürü yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda

Plantform biyoreaktör sisteminden elde edilen bitkilerin agar kullanılan kültürlerden elde edilen bitkilere göre daha iyi geliştiği, yaş ve kuru ağırlığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında Plantform biyoreaktör sisteminin farklı iki turunçgil anacının mikroçoğaltımı ve köklenmesi üzerine etkinliği agar ile katılaştırılmış klasik doku kültürü yöntemi ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Tez çalışmasında elde edilen bulgulara göre Plantform biyoreaktör sisteminde Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjının bitkileri daha iyi gelişmiştir, bitki boyu (cm) ve kök uzunluğu (cm) daha yüksek bulunmuştur.

Turunçgillerde RITA geçici daldırma biyorektör sistemi kullanılarak somatik embriyogenesis çalışması (Cabasson ve ark, 1997) yürütülmüştür. Çalışmada *Citrus deliciosa* Ten. genotipinde somatik embriyoların gelişimi üzerine RITA geçici daldırma sisteminin etkisi katı ve süspansiyon kültürü ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda, geçici daldırma sisteminin somatik embriyo gelişimini teşvik ettiği ve somatik embriyoların %66'sının kotiledon safhasına ulaştığı belirlenmiştir. Ayrıca somatik embriyolar morfolojik olarak nuseller embriyolarla aynı olmuştur. Bu sonuç, turunçgillerde somatik embriyoların üretimi için geçici daldırma sistemlerinin uygun olduğunu göstermiştir. Turunçgillerde Plantform biyoreaktör sistemi kullanılarak yayınlanmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Tez çalışması kapsamında Plantform biyoreaktör sisteminde turunçgillerin mikroçoğaltımı ve köklendirilmesi ilk kez gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması sonucunda Plantform biyoreaktör sisteminde gelişen bitkilerde camlaşma olmadığı, daha sağlıklı geliştiği, katı kültüre göre bitki boyu (cm), çoğalma katsayısı (kardeş/bitkicik), kök sayısı (kök/bitki), kök uzunluğu (cm) ve köklenme yüzdesinin (%) daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde kültür kaplarına uygulanan daldırma/havalandırma süreleri ve kültüre alınan eksplant sayısı bitki gelişimini etkilemektedir. Bitki türüne bağlı olarak optimum daldırma - havalandırma süreleri ve başlangıç eksplant sayısı farklı olabilmektedir. Gatti ve ark (2015) saplı meşe bitkisinin *in vitro* koşullarda Plantform sisteminde mikroçoğaltımında 8 saatte bir

12 dakika ve 16 saatte bir 8 dakika olmak üzere iki farklı daldırma süresini denemişlerdir. Havalandırma süresi ise 4 saatte bir 15 dakika olarak belirlenmiştir. Çalışmada 8 saatte bir 12 dakikalık daldırma süresinin bitki gelişimi üzerine daha etkili olduğu belirlenmiştir. Sacco ve ark (2015) Plantform biyoreaktör sisteminde kültüre alınan Stevia bitkisi için 3 saatte bir daldırmanın kallus ve camlaşma problemi meydana getirdiğini, bununla birlikte 8 saatte bir daldırmanın daha kaliteli sürgün oluşumu sağladığını belirtmişlerdir. Zhang ve ark (2017) tıbbi bir bitki olan *Pinellia ternate* bitkisinde 9 farklı daldırma döngüsünün bitki çoğalması ve büyümesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonunda, bitki çoğalması ve büyümesi üzerinde en başarılı daldırma döngüsü 12 saatte bir 5 dk olarak belirlenmiştir. En fazla yaş ağırlık kültür kaplarına 60 eksplant konulduğu zaman elde edilmiştir. Kültür kaplarına 80 ve 100 eksplant kültüre alındığı zaman bitkiler zayıf gelişme göstermiştir. Tez çalışmasında kullanılan iki farklı turunçgil genotipi için Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım denemelerinde 150 bitki kültüre alınmıştır. Aka Kaçar ve ark (2018), tarafından turunçgil ve mersin bitkisinde yürütülen çalışmalarda Plantform biyoreaktör sisteminde kültür kaplarına 100, 120 ve 150 bitki konulduğu zaman bitki gelişiminin 60 ve 80 bitki konulan kültür kaplarına göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde daldırma - havalandırma süresi ve kültüre alınan eksplant sayısının her bitki türü için optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bitki doku kültüründe, uzun süre bitki büyüme düzenleyici içeren ortamlarda altkültüre alma durumlarında bitkilerde somaklonal varyasyon olarak adlandırılan bazı genetik değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu durum vejetatif çoğaltımda kesinlikle istenmeyen bir durumdur. Plantform geçici daldırma sistemleri ile kültür sürelerinin daha kısa tutulması ve altkültür sayılarının daha aza indirgenmesi ile bu risk azaltılmaktadır (Biçen ve ark, 2017). Buna karşın Plantform ve diğer geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde kültür süreleri

sonunda bitkilerin somaklonal varyasyona uğrayıp uğramadıklarının kontrolüne yönelik çalışmalar sınırlı kalmıştır. Tez çalışması kapsamında SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda Plantform sisteminde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik açılımın olmadığı moleküler çalışmalarla belirlenmiş olup başlangıç materyali ile herhangi bir fark bulunmamıştır. Bu sonuç Plantform sisteminin turunçgil bitkilerinin çoğaltımında güvenilir bir yöntem olduğunu desteklemektedir.

# 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında, Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitrancı turunçgil anaçlarının, katı kültürde mikroçoğaltım ve köklendirme denemeleri gerçekleştirilmiş, denemelerin sonuçlarına göre bitkilerin Plantform biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım ve köklendirme performanslarına bakılmıştır. Ayrıca çalışmada hem katı kültür hem de Plantform sisteminden gelen bitkiciklerde genetik kararlılık tespit edilmiştir. Katı kültür mikroçoğaltım denemesinde MS ve WPM besin ortamları olmak üzere iki farklı besin ortamı ve BAP (0, 1.0, 2.0 mg/L), KİN (0, 0.5, 1.0 mg/L) ve 2İP (0, 1.0, 2.0 mg/L) sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyicileri çalışılmıştır. Söz konusu denemede bitki boyu (cm) ve kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitkicik) parametreleri incelenmiştir. Katı kültür mikroçoğaltım sonuçlarına bakıldığında, her iki genotip içinde 2.0 mg/L BAP eklenmiş MS besin ortamı başarılı bulunmuştur. Katı kültür köklenme denemesinde MS, ½ 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) çalışılmıştır. Söz konusu denemede bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm), kök sayısı (kök/bitki), köklenme oranı (%) parametreleri incelenmiştir. Katı kültür köklenme denemesi sonuçları değerlendirildiğinde, her iki genotip içinde 0.5 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamı başarılı bulunmuştur. Katı kültür mikroçoğaltım ve köklenme denemelerinde belirlenen en iyi ortam ve hormon konsantrasyonu ile Plantform sisteminde mikroçoğaltım ve köklenme denemeleri kurulmuş olup katı kültür ile aynı parametreler incelenmiştir.

Katı kültür ve Plantform sistemi mikroçoğaltım sonuçlarına göre, Tuzcu 31-31 turuncu bitki boyu (cm) ve kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitki) Plantform sisteminde daha başarılı bulunmuştur. Çalışmada Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı genotiplerinin katı kültür ve Plantform sistemi köklenme sonuçlarına göre her iki genotiptede bitki boyu (cm), kök sayısı (kök/bitki), kök uzunluğu (cm) ve kardeşlenme katsayısı (%) açısından Plantform daha başarılı bulunmuştur.

Sistemin kullanılabilirliği, işgücü ve zamandan tasarruf sağlaması yönüyle katı kültürlere kıyasla iyi bir potansiyele sahip olmuştur. Tez çalışmasında doku kültürü çalışmaları sonucunda her iki sistemde ve her iki genotipte de köklenen bitkiler başarılı bir şekilde seraya aktarılmış olup gelişmeleri takip edilmiştir. Doku kültürü çalışmaları başarılı bir şekilde tamamlandıktan sonra çalışma planı içerisinde yer alan moleküler çalışmalar yürütülmüştür. Söz konusu genotiplere ait bitkisel materyallerden alınan yaprak örnekleri ile DNA izolasyonu yapılmış olup turunçgiller için tasarlanmış olan 22 adet polimorfik SSR markırları ile moleküler çalışmalar tamamlanmıştır. Başlangıç materyali ile katı kültür ve Plantform sisteminde çalışılan bitkilerden elde edilen sonuçlara göre, her iki genotip içinde herhangi bir genetik farklılık tespit edilmemiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan moleküler çalışmalar ile Plantform sisteminin bu yönüyle de kullanılabilirliği ortaya konulmuştur.

Tez çalışmasında bitkisel materyallere ait parametrelerden bitki boyu (cm), çoğalma katsayısı (kardeş/bitkicik), köklenme oranı (%), kök uzunluğu (cm), bitki kalitesi Plantform biyoreaktör sisteminde oldukça yüksek bulunmuştur. Bu da Plantform sisteminin mikroçoğaltım ve köklenme çalışmaları kalite parametreleri için beklentileri karşılayabilmekte olduğunu göstermektedir. Sistemin başarısını daha iyi ortaya koymak adına yapılacak olan çalışmalarda bizim çalışmamıza ek daha farklı parametrelerde incelenmesi önerilmektedir. Plantform geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, sistemin farklı daldırma ve havalandırma süreleri ile ilgili denemeler mevcuttur. Yapılan çalışmada kullanılan bitkisel materyal için farklı daldırma ve havalandırma süreleri deneyerek bu süreleri optimize edebilecek ek çalışmalar yapılabilir. Ayrıca sistem içerisine konulan bitki sayısı için, tez çalışması öncesi yapılan bazı ön çalışmalarda Plantform kaplarına fazla bitki konulduğunda bitkilerin gelişimine olumlu etki yarattığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle yapılacak olan çalışmalarda Plantform kaplarına daha fazla bitkisel materyal konularak bu durumun etkisi test edilebilir.

Bu çalışma sonrasında önceki çalışmalarda da görüldüğü üzere Plantform sistemi ile daha farklı geçici daldırmalı sistemler kıyaslanabilir Plantform biyoreaktör sisteminin performansı değerlendirilebilir.

## KAYNAKLAR


Aka Kaçar, Y., 2001. Türkiye'de Yetiştirilen Önemli Kiraz (*Prunus avium* L.) ve Vişne (*Prunus cerasus* L.) Çeşit ve Tiplerinin DNA Parmakizi Yöntemi ile Sınıflandırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kod No: 640, Adana (Yayınlanmamış).

Aka Kaçar, Y., 2007. Türkiye Turunçgil Gen Kaynaklarının Moleküler Karakterizasyonu ve SSR Markırlarının Geliştirilmesi, TÜBİTAK Projesi, TOGTAG–3241 Proje Sonuç Raporu.

Aka Kaçar, Y., 2015. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Ders Notu (Yayınlanmamış).

Alvard, D., Cote, F., and Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation effects of temporary immersion of explants. Plant Cell Tissue Organ Cult., 32(1):55–60.

Barkley, N. A., Roose, M. L., Krueger, R. R., & Federici, C. T., 2006. Assessing Genetic Diversity and Population Structure in a Citrus Germplasm Collection Utilizing Simple Sequence Repeat Markers (SSRs). Theoretical and applied genetics, 112(8):1519-1531.

Benelli, C., Fernanda, C. M., and 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.

Bhagat, A., Pati, P. K., Virk, G. S., & Nagpal, A., 2012. An efficient micropropagation protocol for Citrus jambhiri Lush. and assessment of clonal fidelity employing anatomical studies and RAPD markers. *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 48(5):512-520.

Biçen, B., 2008. Bazi Turunçgil Anaçlarinda Farklı Eksplant Kaynağı ve Besin Ortamlarının Somatik Embriyogenesis Üzerine Etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).

Biçen, B., 2017. Mersin Bitkisinin (*Myrtus Communis* L.) Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Çoğaltılması ve Köklendirilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yükseklisans Tezi (Yayınlanmamış).

Biçen, B., Dönmez, D., Simsek, O., and Aka Kacar, Y. (2017). Effects of Different Media on Micropropagation and Rooting of Myrtle (*Myrtus communis* L.) in *In Vitro* Conditions. European Biotechnology Congress, 25-27 May 2017, Dubrovnik.

Büyükünal, 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). İmprovement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 50(1):33-37.

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.

Cuenca, J., Froelicher, Y., Aleza, P., Juárez, J., Navarro, L., & Ollitrault, P., 2011. Multilocus Half-Tetrad Analysis and Centromere Mapping in Citrus Evidence of SDR Mechanism for 2n Megagametophyte Production and Partial Chiasma İnterference in Mandarin cv. 'Fortune'. Heredity, 107(5):462-470.

Çukurova Üniversitesi Subtropik Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezi http://subtropik.cu.edu.tr/Tr/detay.aspx?pageId=1647, http://subtropik.cu.edu.tr/Tr/detay.aspx?pageId=1649.

Daungban, S., Pumısutapon, 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.

Davies, F. S., and Albrigo, L. G. (1994). Citrus.

Davies, F. S., and Albrigo, L. G., 1994. Rootstocks. Athern, J., Rees. A.(Eds.), Citrus. CAB International, Wallingford, UK, 254p.

Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B., 1983. A Plant DNA Mini Preparation: Version 11. Plant Molecular Biology Reporter, 1:19-21.

Escalona, M., Lorenzo, J.C., González, B., Daquinta, M., González, J.L., and Desjardins, Y. (1999). Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Rep., 18:743–748.

Escalona, M., Samson, G., Borroto, C., and Desjardins, Y. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 39(6):651–656.

Etienne, H., and Berthouly, M., 2002. Temporary İmmersion Systems in Plant Micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69(3):215-231.

FAO, 2018. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC

Frómeta, O. M., Morgado, M. M. E., Da Silva, J. A. T., Morgado, D. T. P., and 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.

Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. Engineering in life sciences, 14(6):607-621.

Gutiérrez, L.G., López-Franco, R., and Morales-Pınzón, T. (2016). Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) Using A Temporary Immersion System RITA®. African Journal of Biotechnology, 15(28):1503-1510.

Gülşen, O., Uzun, A., 2011. Turunçgil Araştırmalarında Biyoteknoloji Çalışmaları. Anadolu Tarım Bilim. Derg., 26(1):68-76.

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.

Kobayashı, S., and Uchımıya, H., 1989. Expression and İntegration of a Foreign Gene in Orange (*Citrus Sinensis Osb*.) Protoplasts by Direct DNA Transfer. 遺伝学雑誌, 64(2):91-97.

Kokotkiewicz, A., Bucinski, A., and 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., Correira Da Silva, D. P., and 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.

Luro, F. L., Costantino, G., Terol, J., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., Tallon, M., Ollitrault, P., & Morillon, R., 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (Citrus clementina Hort ex Tan) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. BMC genomics, 9(1):287.

Masnoddin, M., Repin, R., and 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., and Shaolong, W. (2016). Optimization of *Sagittaria sagittifolia* Rapid Propagation in Temporary Immersion Bioreactors System. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 29(11):2704-2708.

Murashıge, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol Plant, 15:473-497.

Lloyd, G., and McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Int Plant Prop Soc Proc 30:421–427.

Onay, A., ve ark., 2012. Batman University International Participated Science and Culture Symposium. Batman, TURKEY

Pérez-Tornero, O., Tallon, C.I., and Porras, I., 2010. An Efficient Protocol for Micropropagation of Lemon (*Citrus Limon*) from Mature Nodal Segments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 100(3):263-271.

Ramírez-Mosqueda, M.A., and 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.

Sacco, E., Mascarello, C., Pamato, M., Musso, V., and Ruffoni, B. (2015). Evaluation of Temporary Immersion System for *in vitro* Propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Acta Horticulturae, 1083:327-333.

Saunt, J., 2000. Citrus Varieties of the World. Sinclair Int. Limited, Norwich, England.

Sharma, S., Prakash, A., & Ajinath, T. E. L. E., 2009. *İn vitro* propagation of Citrus rootstocks. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj Napoca, 37(1):84-88.

Singh, S., Ray, B. K., Bhattacharyya, S., & Deka, P. C., 1994. *İn vitro* propagation of Citrus reticulata Blanco and Citrus limon Burm. f. HortScience, 29(3):214-216.

Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Luczkiewicz, M., and Ekiert, H. (2017). *Schisandralignans* Production Regulated by Different Bioreactor Type. Journal of Biotechnology, 247:11-17.

Şen, İ., 2010. Bazi Turunçgil Anaçlarında Eksplant Kaynaği ve Büyüme Düzenleyicilerin Embriyogenik Kallus Eldesi Üzerine Etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).

Tallón, C. I., Porras, I., & Pérez-Tornero, O., 2013. High efficiency *in vitro* organogenesis from mature tissue explants of *Citrus macrophylla* and *C. aurantium*. *İn vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 49(2):145-155.

TÜİK, 2018. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001

Welander, M., Zhu, L. H., and Li, X. Y., 2007. Factors Influencing Conventional and Semi-Automated Micropropagation. Propag. Ornamental Plants, 7:103-111.

Welander, M., Persson, J., Asp, H., and Zhu, L. H., 2014. Evaluation of a New Vessel System Based on Temporary İmmersion System for Micropropagation. Scientia Horticulturae, 179:227-232.

Welander, M., Sayegh, A., Hagwall, F., Kuznetsova, T., and Holefors, A. (2017). Technical improvement of a new bioreactor for large scale micropropagation of several Vaccinium cultivars. ISHS 2017. XI International Vaccinium Symposium Ed.: J.W. Olmstead Acta Horticulturae, 1180(53):387-392.

İnceoğlu, Ü., 2013. Bazı Turunçgil Anaçlarında *In Vıtro'*da Kökten Bitki Rejenerasyonunun Optimizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).

Yenice, Z., 2010. Geçici Daldırma Sistem Biyoreraktörlerle Su Mercimeği (*Lemna minor* L.) Bitkisinin *in vitro* Çoğaltımı. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).

Yeşiloğlu, T., 1982. Doğu Akdeniz Bölgesinde Selekte Edilen Turunç Klonlarının Morfolojik Özellikleri. Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim dalı. Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).

Yildirim, A., Kandemir, N., 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodlar Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, 334-336 s, Konya.

Zhang, B., Hu, Y., Jia, M., Jin, L., Xu, D., and Chen, J. 2017. Micropropagation of *Pinellia ternata* (Thunb.) Berit. Plantlets Using Temporary Immersion Bioreactors. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 11(1):59-65.

Zhu, L. H., Li, X.Y., and Welander, M. 2005. Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. Plant Cell Tissue Organ Cult., 81(3):313-318.

## ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana’da, lise öğrenimini ise Tarsus Mustafa Kemal Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nde başladığı lisans eğitimini 2014 yılında tamamladı. Yüksek lisans eğitimini Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda yapmaktadır.