ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Belgin BİÇEN

MERSİN BİTKİSİNİN (*Myrtus communis* L.) KLASİK VE YENİ NESİL DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE ÇOĞALTILMASI VE KÖKLENDİRİLMESİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ADANA-2017

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MERSİN BİTKİSİNİN (*Myrtus communis* L.) KLASİK VE YENİ NESİL DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE ÇOĞALTILMASI VE KÖKLENDİRİLMESİ

Belgin BİÇEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 21/08/2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

…….	……..	……..
Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR	Prof. Dr. Selim ÇETİNER	Prof. Dr. Sevgi PAYDAŞ KARGI
DANIŞMAN	ÜYE	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: FBA-2015-4865

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

MERSİN BİTKİSİNİN (*Myrtus communis* L.) KLASİK VE YENİ NESİL DOKU KÜLTÜRÜ TEKNİKLERİ İLE ÇOĞALTILMASI VE KÖKLENDİRİLMESİ

Belgin BİÇEN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Yıl: 2017, Sayfa: 55
Jüri : Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Prof. Dr. Sevgi PAYDAŞ KARGI

Mersin (*Myrtus communis* L.) Myrtaceae familyasına ait tıbbi aromatik açıdan önemli olan bir türdür. Mersin yaygın olarak parfüm, baharat ve tıbbi endüstride kullanılmakta, meyvesi taze olarak tüketilmektedir. Ayrıca, Mersin yol kenarlarında süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır. Bitki üreticileri için, bitki doku kültürü teknikleri, bitkilerin çoğaltılmasında önemli bir araçtır. Geçici daldırma sistemi (TIS), bitki türleri için alternatif bir *in vitro* mikroçoğaltım yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. PlantForm olarak adlandırılan geçici daldırma biyoreaktör sistemi son dönemde geliştirilmiştir. Bu çalışmada, yeni bir geçici daldırma biyoreaktör sistemi olan PlantForm ile katı kültür besin ortamı karşılaştırılmıştır. Bu amaçla iki farklı Mersin genotipi kullanılmıştır. Mikroçoğaltım çalışmalarında, PlantForm ve katı kültür sistemleri için 1 mg/L BAP içeren besin ortamları, köklendirmede ise 1 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 karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda PlantForm sisteminde gelişen bitkilerin katı kültürlere göre açık bir şeklide daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. 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 yapılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: BAP, IBA, PlantForm, Biyoreaktör, Geçici Daldırma

ABSTRACT

MSc THESIS

MICROPROPAGATION AND ROOTING OF MYRTLE PLANT (*Myrtus communis* L.) BY CLASSICAL AND NEXT GENERATION PLANT TISSUE CULTURE TECNIQUES

Belgin BİÇEN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTİCULTURE

Supervisor : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
Year: 2017, Pages: 55
Jury : Prof. Dr. Selim ÇETİNER
: Prof. Dr. Sevgi PAYDAŞ KARGI

Myrtle (*Myrtus communis* L.) is one of the important aromatic and medicinal species from the Myrtaceae family. Myrtle is a widely used spice that has many applications in the perfumery, food and pharmaceutical industries. It is also widely used for ornamental purposes such as fencing, road sides and green cutting. Plant tissue culture techniques are significant tool to micropropagate for the plant producer. Temporary immersion systems (TIS) represent an alternative *in vitro* micropropagation mechanism for plant species. A new culture vessel named PlantForm TIS bioreactor has been recently developed. In the present study, we aimed evaluating and comparing of a new type of TIS bioreactors with agar media for different two myrtle. MS medium supplemented with 1 mg l^{-1} BAP were used for multiplication, with 1 IBA mg l^{-1} for rooting. Two different immersion times (4h and 8h) were compared with the solid agar medium. Plantlets growing in PlantForm system were clearly better than solid medium. All data recorded at micropropagation and rooting treatments is much more successful. In conclusion, PlantForm TIS bioreactor presents a valid alternative to classical systems *in vitro* micropropagation and rooting, resulting in a reduction of cost, labour and time for the mass propagation.

Key words: BAP, IBA, PlantForm, Bioreactor, Temporary immersion

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Mersin bitkisi tropik ve subtropik bölgelerde yetişen, Myrtaceae familyasının bir üyesidir. Ülkemizde Akdeniz Bölgesinde doğal olarak yetişen Akdeniz mersini (2n=2x=22) ekonomik olarak önemli türler arasındadır. Mersin bitkisinin meyve ve yaprakları anti-genotoksik, anti-mutajenik, antiseptik, antiinflamatuar amaçlar, internal ve tropikal enfeksiyonların tedavisi için kullanılmaktadır. Ayrıca mersin bitkisinin uçucu yağları ilaç üretiminde kullanılabilir ve yaprakları çay olarak tüketilebilir. Akdeniz sahil kuşağında yangın zararlarından sonra ağaçlandırma amaçlı ve süs bitkisi olarak Avrupa marketlerinde özellikle yeşillik olarak buketlerde kullanımı oldukça yaygındır. Meyvesi ülkemizde yerel pazarlarda talep görmektedir. Tüm bu özelliklerinden dolayı *in vitro* koşullarda performansı incelenmesi gereken önemli bir bitki türüdür. Geçici daldırma yöntemi (Temporary Immersion System =TIS=GDY) geleneksel yarı-katı ve sıvı besi ortamlarının avantajlı yönlerini kombine eden bir sistemdir. Geçici daldırma yöntemi ile ilgili olarak ilk literatürler yaklaşık 30 yıl önce rapor edilmiş ve farklı prototipler geliştirilmiştir. Bunlar arasında "PlantForm" sistemi son yıllarda geliştirilen ve geçici daldırma yöntemi ve kültür kaplarında bağımsız havalandırmaya odaklanılmıştır.

Tez kapsamında, Adana ve yöresinde tercih edilen sarı meyveli seçilmiş elit Mersin genotipi ve Alanya'dan temin edilen koyu renkli, mor meyveli iki adet Mersin genotipinin *in vitro* koşullarda çoğaltımı, köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması amaçlanmıştır. Agar ile katılaştırılmış besi ortamının yanında son yıllarda geliştirilen geçici daldırma yönteminin bitki çoğalma ve köklenmesine etkileri incelenmiştir. Geçici daldırma yöntemi olarak PlantfForm biyoreaktör sistemleri kullanılmıştır. Bu amaçla iki farklı Mersin genotipi kullanılmıştır. Mikroçoğaltım çalışmalarında, PlantForm ve katı kültür sistemleri için 1 mg/L BAP içeren besin ortamları, köklendirmede ise 1 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 karşılaştırılmıştır.

Mikroçoğaltım denemeleri sonucunda, katı kültürde kardeşlenme katsayısı 6.10, PlantForm sisteminde 8 saat daldırma süresinde 14.12, 4 saat daldırma süresinde ise 9.80 olarak belirlenmiştir. Katı kültürde gelişen bitkilerin PlantForm sisteminde gelişen bitkilerden daha kısa olduğu belirlenmiştir. 8 saat daldırma süresi sıklığında gelişen bitkilerin boyları ortalama 8.40 cm, 4 saate ise 9.05 cm olarak belirlenirken, katı kültürde gelişen bitkilerin boylarının ortalama 2.76 cm olduğu saptanmıştır. Köklenme denemeleri sonucunda, PlantForm geçici daldırma sistemlerindeki bitkilerin köklenme oranı %100 olarak tespit edilirken, katı kültürdeki köklenme olaranı %60 olarak belirlenmiştir. En fazla kök uzunluğuna sahip bitkiler ortalama 5.52 cm ile PlantForm 8 saat daldırma süresi sıklığında elde edilmiştir. PlantForm 4 saat daldırma süresi sıklığında gelişen bitkilerin kök uzunluğu ortalamasının 3.85 cm, katı kültürde gelişen bitkilerin kök uzunluğu ortalamasının ise 0.88 cm olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma sonucunda PlantForm sisteminde gelişen bitkilerin katı kültürlere göre açık bir şeklide daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. 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 büyük çoğaltımın yapılabileceği belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin belirlenmesinden sonuçlanmasına kadar her aşamada 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. Selim ÇETİNER ve Sayın Prof. Dr. Sevgi PAYDAŞ KARGI'ye çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında her türlü konuda yardımlarını benden esirgemeyen Dr. Özhan ŞİMŞEK ve Dr. Dicle DÖNMEZ'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında bana yardımcı olan Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanları Tütün Teknik Mühendisi Hakan MANSUR, Fatma KARA, Eda ARSLANKILIÇ'a ve Yüksek Lisans öğrencisi Melike CENGİZ'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR V
İÇINDEKİLER VI
ÇİZELGELER DİZİNİ VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ X
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
3. MATERYAL VE METOD 15
3.1. Materyal 15
3.1.1. Bitkisel Materyal 15
3.2. Yöntem 16
3.2.1. Sürgün Uçlarının Sterilizasyonu 16
3.2.2. Çoğaltma Ortamı ve Koşulları 16
3.2.3. Katı Kültürde Mikroçoğaltım ve Köklendirme Denemesinin Kurulması 17
3.2.4. PlantForm Biyoreaktör Sisteminde Mikroçoğaltım ve Köklendirme Denemesinin Kurulması 18
3.2.5. Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması. 19
3.2.6. Deneme Planı, İstatistik Analizler ve İncelenen Kriterler 20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 23
4.1. Mikroçoğaltım Denemelerine Ait Bulgular 23
4.2. Köklenme Denemelerine Ait Bulgular 30
4.3. Dış Koşullara Alıştırma. 38
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 45

KAYNAKLAR.....47
ÖZGEÇMİŞ.....55

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 3.1. MS besin ortamının içeriği.....17
Çizelge 4.1. Mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda Plantform ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait kardeşlenme katsayıları.....24
Çizelge 4.2. Mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda Plantform ve klasik katı kültüründe çoğaltılan Mersin bitkilerinin bitki boyu (cm) verileri.....25
Çizelge 4.3. Mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda PlantForm ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait yaprak sayısı...26
Çizelge 4.4. Mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda PlantForm ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait yaş ağırlık (g) verileri.....27
Çizelge 4.5. Mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda PlantForm ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait kuru ağırlık (g) verileri.....27
Çizelge 4.6. Köklenme çalışmaları sonucunda PlantForm ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait köklenme oranı (%).....31
Çizelge 4.7. Köklenme çalışmaları sonucunda PlantForm ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait bitki boyu (cm) verileri.....32
Çizelge 4.8. Köklenme çalışmaları sonucunda PlantForm ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait kök uzunluğu (cm) verileri.....33

Çizelge 4.9. Köklenme çalışmaları sonucunda PlantForm ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait kök sayısı verileri..... 34
Çizelge 4.10. Köklenme çalışmaları sonucunda PlantForm ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait yaş ağırlık (g) verileri..... 35
Çizelge 4.11. Köklenme çalışmaları sonucunda PlantForm ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait kuru ağırlık (g) veriler..... 35
Çizelge 4.12. Mikroçoğaltım denemelerine ait veriler..... 37
Çizelge 4.13. Mikroçoğaltım denemelerine ait veriler..... 38

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 3.1. Bitkisel materyal A. Kozan'dan temin edilen sarı meyveli genotip, B. Alanya'dan temin edilen siyah meyveli genotip..... 15

Şekil 3.2. PlantForm biyoreaktör sisteminde kurulan mikroçoğaltım denemesinde kültür kaplarının görüntüsü.....19

Şekil 3.3. Şekil 3.3. Mini plastik tünel altında bitkilerin dış koşullara alıştırılması. A: Bitkilerin plastik tünele alınması. B-C: Plastik tünellerin kademeli olarak açılması..... 20

Şekil 4.1. PlantForm biyoreaktör sisteminde çoğaltılan mersin (G1) bitkilerinin katı kültür ile karşılaştırmalı görüntüsü.....28

Şekil 4.2. PlantForm biyoreaktör sisteminde çoğaltılan mersin (G2) bitkilerinin katı kültür ile karşılaştırmalı görüntüsü.....29

Şekil 4.3. PlantForm biyoreaktör sisteminde köklenen mersin bitkilerinin görüntüsü..... 36

Şekil 4.4. Dış koşullara alıştırılan mersin bitkilerinin genel görüntüsü.....39

1. GİRİŞ

Mersin bitkisi tropik ve subtropik bölgelerde doğal olarak yetişen 100 cins ve 3000 tür içeren Myrtaceae familyasının bir üyesidir (Rezaee ve Kamali, 2014). Myrtaceae familyasının ekonomik olarak önemli türleri arasında *Eucalyptus* spp., *Feijoa sellowiana* (Brg.) ve *Psidium guajava* L. türleri bulunmaktadır (Nobre, 1994).

ülkemizde Akdeniz Bölgesinde doğal olarak yetişen Akdeniz mersini (2n=2x=22) ekonomik olarak oldukça önemli türler arasındadır (Baytop, 1997). Mersin bitkisinin meyve ve yaprakları anti-genotoksik, anti-mutajenik, antiseptik, antiinflamatuar amaçlar, internal ve tropikal enfeksiyonların tedavisi için kullanılır (Bonjar 2004; Hayder ve ark., 2004). Mersin bitkisinin uçucu yağları ilaç üretiminde kullanılabilir ve yaprakları çay olarak tüketilebilir (Flamini ve ark., 2004; Ogur, 1994).

Mersin bitkisi 0.5 ile 3 m arasında çalı veya küçük bir ağaç olup *M. communis* subsp. *communis* ve *M. communis* subsp. *tarentina* olmak üzere iki alttürü tanımlanmıştır (Picci ve Atzei, 1996). Bu türler monojeniktir ve hermafrodit çiçeklere sahiptir.

Akdeniz Havzasının doğal bitkilerinden olan mersin ülkemizde Adana, Antalya, İçel, Çanakkale, İstanbul, Zonguldak, Sinop, Ordu, Trabzon, İzmir, Samsun, Muğla ve Hatay çevresinde yaygındır (Davis, 1972). Geniş bir ekolojik değişkenlik gösteren mersin bitkisi farklı habitat (yetişme yeri-ortamı) şartlarında gelişebilmektedir. Bitki makiliklerin daima dominant bir üyesi olup, yavaş büyüme özelliğinde uzun ömürlü ve kış aylarında yapraklarını dökmeyen herdem yeşil bir türdür. Yapraklar aromatik bir kokuya sahiptir. Meyveleri üzümsü meyve tipinde ve çoğunlukla siyahımsı mor renkli ya da beyaz olup, sonbaharda (Ekim-Aralık) olgunlaşmaktadır. Olgunlaşan meyvelerin tadı şekerli ve buruktur. Böceklerle tozlanır (Yıldırım, 2012). Meyvelerin üzeri özellikle arıların bitkiyi tanımasını sağlayan (mersin bitkisine özel olmayıp bazı diğer bitkilerde de olabilen) hafif bir

mumsu tabaka ile kaplıdır, bu da meyveye mat bir görünüm verir. Meyve çok tohumludur. Yenilebilen bu meyvelerin hoş, baharatlı bir tadı ve aromatik kokusu vardır (Ogur ve ark., 1994). Meyve; uçucu yağ, tanen, şeker ve organik asitler (sitrik asit ve malik asit) içermektedir (Erlaçin ve Erciyas, 1978). Mersin bitkisi yaprakları az miktarda kafeik, ellajik ve gallik asit gibi fenolik asitler ile kersetin türevleri, fazla miktarda ise kateşin ve mirsetin türevleri içermektedir (Romani ve ark., 1999; Yıldırım, 2012).

M. communis ülkemizde genellikle "Mersin" adıyla bilinmesine karşın özellikle Güney sahillerinde "murt", "hambeles" ve "adi mersin" adlarıyla da bilinmekte ve bazı yerlerde ise yaprağına "bahar" adı verilmektedir (Oğur, 1994; Aydın ve Özcan, 2007; Avcı ve Bayram, 2008; Yıldırım, 2012).

Mersin bitkisi çok farklı amaçlar için kullanılmakta ve bahçe bitkileri içinde gelecek vadeden türler arasında yer almaktadır. Yaprakları ve meyvelerinde bulunan uçucu yağlar kimya ve tıp endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Akdeniz sahil kuşağında yangın zararlarından sonra ağaçlandırma amaçlı ve süs bitkisi olarak Avrupa marketlerinde özellikle de yeşillik olarak buketlerde kullanımı oldukça yaygındır. Meyvesi ülkemizde yerel pazarlarda talep görmektedir. Tüm bu özelliklerinden dolayı *in vitro* koşullarda performansı incelenmesi gereken önemli bir bitki türüdür.

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. Bu yöntem doku kültürü ile çoğaltılan bitkilerin maliyetinin artması yanında, bitkilerde çoğalma katsayısı ve bitki kalitesinde olumsuz etkiler yapabilmektedir. Besin ortamından besin alımında en önemli dezavantaj, sürgünlerin basal kısımlarından besin elementlerinin absorbsiyonudur. Bununla birlikte biyoreaktör gibi sıvı kültür sistemleri katı veya yarı-katı ortamlara önemli bir alternatiftir. Fakat 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 (Temporary Immersion System =TIS=GDY) 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 besi 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 besi 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.

Geçici daldırma yöntemi ile ilgili olarak ilk literatürler yaklaşık 30 yıl önce rapor edilmiş ve farklı prototipler geliştirilmiştir. Bunlar arasında “PlantForm” sistemi son yıllarda geliştirilen ve geçici daldırma yöntemi ve 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 yanısıra, daha ekonomik, hızlı ve kolay bir çoğaltma yöntemi sunar.

Tez kapsamında, Adana ve yöresinde tercih edilen sarı meyveli seçilmiş elit mersin genotipi ve Alanya'dan temin edilen koyu renkli, mor meyveli iki mersin genotipinin *in vitro* koşullarda çoğaltımı, köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması amaçlanmıştır. Agar ile katılaştırılmış besi ortamının yanında son yıllarda geliştirilen geçici daldırma yönteminin bitki çoğalma ve köklenmesine etkileri incelenmiştir. Geçici daldırma yöntemi olarak PlantForm biyoreaktör sistemleri kullanılmıştır. Çalışma sonunda agar ve geçici daldırma sistemleri karşılaştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Mersin bitkisi, *Myrtaceae* familyasından olup, ülkemizde iki cinsle temsil edilmektedir. Tek türe sahip olan *Myrtus communis L.* (mersin) cinsi ülkemizde coğrafik sınırı denize komşu olan hemen hemen bütün illerimizde yayılış göstermektedir (Davis, 1972). Mersin bitkisi, antibakteriyel, antioksidant, hipoglisemik ve antimutajenik etkilere sahiptir (Tunçer, 2014). Akdeniz'de yetişen mersin bitkisi en fazla ekonomik öneme sahip türlerden biridir. Kullanım alanlarının yaygınlaşması ile üretim paralel bir artış göstermektedir. Bununla beraber bu türün üretimi ile ilgili bilgiler oldukça sınırlıdır (Şan ve ark., 2015). Türün doku kültürü ile üretimi konusunda aşağıda detaylandırılan bazı çalışmalar mevcut olmakla beraber konu ile ilgili literatürler hala sınırlı kalmaktadır. Mersin bitkisinin doku kültürü ile ilgili performansına ait ilk literatür Uhring (1983) tarafından bildirilmiş ve çalışmada köklenme ile ilgili zorluklardan bahsedilmiştir.

Khosh-Khui ve ark. (1984) yaptıkları çalışmada; mersinin hızlı klonal çoğaltımını *in vitro* koşullarda gerçekleştirmişlerdir. Optimum sürgün çoğaltımı 0.5 mg/L nikotinik asit, 0.5 mg/L pridoksin HCl, 0.1 mg/L tiamin HCl, 2.0 mg/L glisin, 100 mg/L inositol, 30 g/L sukroz, 1.5 mg/L BA ve 0.1 mg/L NAA içeren ½ MS besin ortamında elde edilmiştir. En iyi köklenme 0.5 mg/L BA ve 0.4 veya 0.6 mg/L NAA içeren yarı güçte MS ortamına transfer edilen sürgünlerde gözlenmiştir.

In vitro koşullarda mersin bitkisinin çoğaltılması amacıyla nod eksplantları %3 sükroz, 10 mg/L askorbik asit içeren standart basal besi ortamında kültüre alınmıştır. Çoğaltma denemelerinde BA (0-2.0 mg/L) uygulamaları ve eksplant yönelimleri test edilmiştir. En yüksek çoğalma oranı yatay olarak yerleştirilmiş 2.0 mg/L BA ve 0.05 mg/L NAA içeren besin ortamında elde edilmiştir (Nobre, 1994).

İspanya'nın doğusunda yetişen mersin bitkisi populasyonunun *in vitro* sürgün çoğaltımı ve köklenmesi üzerine makro elementler ve büyüme düzenleyicilerin etkisi araştırılmıştır. Nodal eksplantlar 4.4, 13.3 ve 22.2 μM BA veya 4.7, 14.0 ve 23.2 mM kinetin içeren MS, Schenk ve Hildebrandt (SH) ve

Heller (H) ortamlarında (tam güç, 1/2, 1/4) kültüre alınmıştır. Optimum çoğalma 4.4 μM BA içeren 1/4 MS ortamında gözlenmiştir. Sürgünlerin köklenmesi 2.5-2.6 μM IBA ve Lloyd ve McCown (WPM) ve Gresshoff ve Doy (GD) makro elementleri eklenerek (tam güç veya 1/2) elde edilmiştir (Parra ve Amo-Marco, 1998).

Grigoriadou ve Leventakis (1999), mersin bitkisini *in vitro* koşullarda 3 μM BAP, 0.3 μM GA3, 0.05 μM NAA, %20 sükroz ve %0.5 agar içeren MS ortamında çoğaltmışlardır. 5.4μM NAA ve 5.0 μM IBA içeren MS ortamında %70 köklenme sağlanmıştır.

Mersin bitkisinin *in vitro* koşullarda köklenmesi üzerine farklı konsantrasyonlarda (0.0, 0.5, 1.0 mg/L) IAA'nın etkisi araştırılmıştır. Köklenme denemelerinde kullanılan 85 sürgünden %56 oranında köklenme elde edilmiştir. En iyi köklenme ortamı %61 ile 1 mg/L IAA içeren besin ortamında gözlenmiştir. En düşük köklenme (%43) 0.5 mg/L IAA içeren besin ortamından elde edilmiştir (Scarpa ve ark., 2000).

Hatzilazarouet ve ark. (2001), *in vitro* kültürlerden elde edilen iki mersin bitkisi klonlarını (Klon A ve Klon B) farklı konsantrasyonlarda (0, 0.5, 1 veya 2 μM) IBA, IAA veya NAA ile desteklenmiş WPM ortamında köklendirilmiştir. Sekiz hafta sonra % köklenme, kök sayısı ve uzunluğu ölçülmüştür. En iyi köklenme Klon A için 0.5 μM IBA (%96 köklenme), Klon B için 1 μM NAA (%100 köklenme) içeren besin ortamında elde edilmiştir.

Mascarello ve ark. (2009), *in vitro* koşullarda çoğaltılan mersin bitkisinin aklimatizasyon performansı ve klorofil içeriği üzerine ışık yoğunluğu ve bitki büyüme düzenleyicilerin etkisini araştırmışlardır. Üç mersin bitkisi genotipi *in vitro* koşullarda köklenmesi amacıyla 3 fotosentetik foton flux densitesi (PPFD) (25-50-100 μmol m-2 s-1) dozu köklenme ortamında bulunan oksin (IAA ve IBA) ve sitokinin (BA) büyüme düzenleyicileri ile kombine edilmiştir. Köklenme ortamına düşük konsantrasyonda (0.1 mg/L) BA ilave edilmesi köklenme yüzdesini

ve klorofil içeriğini arttırmıştır. Yüksek ışık yoğunluğu klorofil düzeyini düşürmüştür.

Ruffoni ve ark. (2010), yapmış oldukları çalışmada mersin bitkisini 0.5 mg/L BA ve 0.2 mg/L IAA içeren MS tuzu ve vitaminleri ortamında çoğaltmışlardır. Klonlar farklı çoğalma oranı ve köklenme yüzdesi göstermiştir. 0.5 mg/L IAA veya IBA içeren besin ortamında köklenme yüzdesi artmıştır.

Rezaee ve Kamali (2014), yapmış oldukları çalışmada, mersin bitkisini doku kültürü teknikleri ile çoğaltmışlardır. Çalışmada, MS ve WPM besin ortamları ile BA (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 mg/L) ve IBA (0 ve 0.1 mg/L) bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonunda WPM besin ortamı MS besin ortamına göre daha iyi sonuç vermiştir. En iyi sonuç 4 mg/L BA ve 0.1 mg/L IBA içeren WPM besin ortamından elde edilmiştir. Köklenme denemelerinde farklı IBA (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L) konsantrasyonlarını içeren MS ortamları kullanılmıştır. En iyi sonuç 3 mg/L IBA içeren MS ortamında elde edilmiştir.

Mersin bitkisinin ticari öneme sahip “Aşı Mersin” klonu için bir mikroçoğaltım yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda TDZ (0.1, 0.3, 0.5 mg/L), BAP (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) ve NAA'nın (0.01, 0.1 mg/L) sürgün çoğalma ve aktif karbonun köklenme üzerine etkileri araştırılmıştır. En yüksek sürgün sayıları 1. alt kültürde 3.8 adet ile 0.3 mg/l TDZ + 0.1 mg/L NAA içeren MS ortamından elde edilirken, 2. alt kültürde 4.0 adet ile 0.3 mg/l TDZ + 0.01 mg/L NAA içeren MS ortamından elde edilmiştir. Çoğaltma denemeleri sonucunda TDZ içeren besin ortamlarının BAP içeren besin ortamlarına göre daha etkili sonuç verdiği belirlenmiştir. *In vitro* sürgünler IBA (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L), NAA (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L), ve aktif kömür (2.0 mg/L) içeren ½MS ortamında köklendirilmiştir. IBA uygulamalarının NAA uygulamalarına göre köklenmeyi daha fazla uyardığı belirlenmiştir. İçinde 1.0 mg/L IBA + 2.0 g/L aktif kömür bulunan ½MS ortamı en yüksek köklenme oranını (% 80) vermiştir. Köklenmiş

bitkilerin % 86'sı dış koşullara başarılı bir şekilde alıştırılmıştır (Şan ve ark., 2015).

Aka-Kaçar ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada, mersin bitkisin *in vitro* köklenmesi üzerine IBA ve Aktif Karbonun (AK) etkilerini araştırmışlardır. BAP (1 mg/L) içeren MS ortamında başarılı bir şekilde çoğaltılan bitkicikler, AK eklenmiş (0, 0.5, 1.0, 2.0 g/L) IBA'nın farklı konsantrasyonlarında (0, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 mg/L) kültüre alınmıştır. En iyi köklenme; kök sayısı bakımından IBA'nın 1 mg/L ve 4 mg/L konsantrasyonlarını içeren ortamda, kök uzunluğu bakımından ise 2 mg/L IBA ve 0.5 g AK içeren ortamda sağlanmıştır.

Geçici Daldırma Sistemi [Temporary Immersion System" (TIS)] ile ilgili olarak ilk literatürler yaklaşık 30 yıl önce rapor edilmiş ve farklı prototipler geliştirilmiştir. Örneğin; doku kültüründe klonal çoğaltma amaçlı kullanılan RITA (Recipient for Automated Temporary Immersion System) ve BIT (Twin Flasks) gibi farklı tiplerde Geçici Daldırma Sistemleri bulunmaktadır. RITA sistemi ilk kez Alvard ve ark., (1993) tarafından geliştirilmiş ve bazı çalışmalarda kullanılmıştır (Pavlov and Bley, 2006; Zhu et al., 2005). BIC sistemi ise Escalona ve ark., (1999) tarafından geliştirilmiş ve farklı bitki türlerinde kullanılmıştır (Escalona ve ark., 2003; Welander ve ark., 2007). TIS Biyoreaktörler kitle çoğaltımında çilek; (Takayama ve Akita, 1998), süs bitkileri (Dewir ve ark., 2006), *Vaccinium angustifolium* (Debnath, 2009), patates (Piao ve ark., 2003) ve diğer pekçok bitkiye uygulanmıştır. Bununla birlikte; bu süreçte geliştirilen bioreaktörler ya çok küçük ya da çok ağır olmaları veya kullanımları kolay olmayan sistemlerdir (Welander et al., 2007). Son yıllarda biyoreaktörlerde karşılaşılan problemleri aşmak için "**PlantForm"** olarak adlandırılan yeni geçici daldırma sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemde kültürlerin büyümesi için daha büyük iç tabanlar ve kullanımı daha pratik kaplar bulunmaktadır. "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. Kültür kapları 500 ml besi ortamı doldurulabilmekte, daldırma süresi

ve sıklığı ayarlanabilmekte ve gaz değişimi zaman ayarı ile yapılabilmektedir. Ayrıca, bu tür biyoreaktörler, büyük ölçekli üretimde kültür alanını etkin kullanmak için birbirinin üzerine yerleştirilebilmektedir (Welander ve ark. 2014).

Araştırıcılar, kestanede Geçici Daldırma Sistemi ile sıvı kültürde sürgün ucu kültürü protokolü geliştirilmek amacıyla çalışmalar yapmışlar; eksplant tipi, destek materyali, biyoreaktör ve geçici daldırmanın etkisini araştırmışlardır. Çalışmada bitkisel materyal olarak hastalıklara dayanıklı olarak seçilmiş Asya ve Avrupa kestanelerinin 5 doğal ve 5 yapay hibridi kullanılmıştır. Eksplant tipi; sürgün kalitesi ve çoğaltma katsayısı üzerine etki etmiş, bazal eksplantler apikal ve nodal segmentlere göre daha fazla sürgün oluşturmuştur. PlantForm'da kültüre alınan bazal eksplantler 5 haftada köklenme için uzun sürgünler oluşturmuşlar, bununla beraber RITA ve PlantForm biyoreaktör sisteminde kültüre alınan nodal ve apikal eksplantler daha kısa sürgünler oluşturmuşlardır. Kültüre alınan klonların pekçoğu sıvı ortamda yarı-katı ortamdan daha iyi çoğalma performansı göstermiş olduğu belirtilmiştir. Sıvı ortamda gelişen sürgünler IBA içerisine batırıldıktan sonra sera koşullarına başarılı bir şekilde aktarılmıştır (Vidal ve ark, 2015).

Lambardi ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada *Carex oshimensis* 'Evergreen' ve *Chrysanthemum morifolium*, *Ficus carica* ve *Ribes rubrum* bitkilerinde PlantForm biyoreaktör sistemini kullanarak bu bitkilerin *in vitro* performanslarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda PlantForm biyoreaktör kullanılarak geçici daldırma yöntemi ile sürgün kalitesinde, çoğalma katsayısında ve köklenmede artış gözlenmiştir.

Benelli ve ark. (2015), *M. communis* ve *Olea europaea* türlerinde basit ve etkili bir mikroçoğaltma yöntemi için PlantForm biyoreaktörü kullanmışlar ve besin elementleri ile ve bitki büyüme düzenleyicilerin azaltılması, dolayısı ile *in vitro* maliyetlerinin düşürülmesine yönelik bir çalışma yapmışlardır. Ayrıca klasik yöntemle karşılaştırmalı olarak biyoreaktörün bitkilerdeki kütlesel artışını da araştırmışlardır. Sonuç olarak her iki türde biyoreaktöre iyi adapte olmuş bitki kalitesi ve yaşama oranları klasik *in vitro* tekniklere göre daha iyi bulunmuştur.

Yarı-katı besi ortamında yapılan klasik doku kültürü çalışmaları ile biyoreaktör kültürlerinin karşılaştırıldığı araştırmalarda geçici daldırma sisteminde kültüre alınan bitkiciklerin sürgün çoğalma ve gelişmesi daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (Benelli ve ark., 2015).

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 ortamı, BA (0.3 mg/L) içeren MS 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 bitki/eksplant), BA 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.

Enrico ve ark. (2015), yapmış oldukları çalışmada *Quercus robur* türünün klasik doku kültürü teknikleri ve biyoreaktör sistemleri ile çoğaltılmasını araştırmışlardır. Bu tür *in vitro* koşullarda çalışılan ve protokolleri ortaya koyulan bir tür olmasına rağmen *in vitro* performansı ile ilgili hala çok fazla sorun olan bir türdür. *In vitro* koşullarda yetiştirilen bitkiciklerin nodal segmentleri (10X15 mm) 20 g/L sukroz, 6 g /L agar, 0.2 mg/L BA içeren WPM (Woody Plant Medium) ortamında Microbox ve PlantForm biyoreaktör sisteminde kültüre alınmıştır. Taze sürgün ağırlığı ve sürgün çoğalma katsayıları incelenmiştir. TIS sistemi klasik doku kültürü kabında kültüre alınan bitkiciklerden çoğalma katsayısı ve taze sürgün ağırlığı bakımından daha iyi sonuç vermiştir.

Ticari öneme sahip Güney Afrika baklagili *Cyclopia genistoides* fenolik sekonder metabolit eldesi için farklı biyoreaktör tiplerinde [membrane rafts (MR) ve Geçici Daldırma Sistemi (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).

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 BIT® 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.

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.

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.

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 mg/L BA + 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.

Biçen ve ark. (2017), yapmış oldukları çalışmada mersin bitkisinin çoğalma ve köklenmesi üzerine farklı besi ortamlarının (MS, Rugini Olive Medium, Woody Plant Medium: WPM) etkisini araştırmışlardır. Tüm ortamlarda çoğaltma için 1 mg/L BA, köklendirmede ise 1 mg/L IBA kullanılmıştır. Çoğaltmada en iyi performans WPM besi ortamında (5.95 bitki) ikinci olarak da MS besi ortamında (3.40 bitki) sağlanmıştır. Köklenmede en başarılı besi ortamı %60 köklenme ile WPM ardından da %45 köklenme ile Rugini besi ortamında gerçekleşmiştir.

Frómeta ve ark. (2017), Gerbera bitkisini BIT® 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 bioreaktörde kültüre alınmıştır. Besi ortamı olarak; 3 mg/L BA ve 1 mg/L NAA içeren MS besi ortamı kullanılmıştır. Sürgünlerde büyüme ve lignan içeriği (bitkisel-östrojen) LC-DAD

ve LC-DAD-ESI-MS ile değerlendirilmiştir. Test edilen biyoreaktörlerden PlantForm lignan içeriği (546.98 mg/100g kuru ağırlık) ve büyüme bakımından daha iyi sonuçlar vermiştir.

Zhang ve ark. (2017), ***Pinellia ternate*** 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 VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Tez kapsamında bitkisel materyal olarak; biri Çukurova yöresinde fidan üreticileri tarafından tercih edilen ve meyveleri sarı renkli (G1), diğeri ise Antalya ilinin Alanya ilçesinde yöre halkının beğenisini kazanmış koyu renkli mor (G2) olmak üzere iki *M. communis* L. genotipi kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bitkisel materyal **A**. Kozan'dan temin edilen sarı meyveli genotip, **B.** Alanya'dan temin edilen siyah meyveli genotip.

Tez kapsamında genotiplerin *in vitro* koşullarda sürgün ucu kültürü ile mikroçoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Sürgün uçlarının katı kültür kaplarında mikroçoğaltımı sonucunda elde edilen bitkiler ile geçici daldırma PlantForm biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım performansları incelenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sürgün Uçlarının Sterilizasyonu

Tez kapsamında kullanılan bitkisel materyale ait sürgün uçları kültüre alınmadan önce steril edilmiştir. Bu amaçla laboratuvara getirilen sürgün uçları çeşme suyu altında 10 dk yıkanmıştır. Sterilizasyon işleminde sürgün uçları %70'lik etil alkolde 3 dk bekletildikten sonra %20'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 10 dk bekletilmiştir. Ardından sterilant maddelerin uzaklaştırılması amacıyla steril kabin içerisinde 3 defa steril saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Çoğaltma Ortamı ve Koşulları

Tezde kullanılan *M. communis* L. genotiplerine ait sürgün uçlarının katı kültür ve PlantForm sistemlerinde çoğaltımı 1 mg/L BA, 30 g/L sükroz içeren MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamında gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1). Katı kültür ortamına 8 g/L agar ilave edilirken PlantForm kültür ortamına agar ilave edilmemiştir. Her iki sistemde de kültür kaplarına yerleştirilen bitkiler 25±2 ^{o}C'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşullarda kültüre alınmıştır.

Çizelge 3.1. MS besin ortamının 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
Kl	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 Kültürde Mikroçoğaltım ve Köklendirme Denemesinin Kurulması

Bitkisel materyale ait sürgün uçları sterilizasyon işlemi uygulandıktan sonra 1 mg/L BA ve 8 g/L agar içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Katı kültür kapları kullanılarak gerçekleştirilen mikroçoğaltım denemesinde her kültür kabına 50 ml ortam eklenmiş, ortamlar içerisine 10 bitki konulmuş ve 4 haftada bir altkültüre alma işlemi gerçekleştirilmiştir. Katı kültürde 3 defa altkültüre alma işlemi gerçekleştirilmiştir. Katı ortamda çoğaltma sonucunda PlantForm sisteminde kullanılacak yeterli bitkisel materyal elde edilmiştir. Katı kültürlerde mikroçoğaltım denemelerinden sonra elde edilen bitkiler ile köklenme denemeleri

kurulmuştur. Bitkilerin köklendirilmesinde aynı şekilde katı MS besin ortamı hazırlanmış, farklı olarak besin ortamı içerisine 1 mg/L IBA eklenmiştir. Aynı şekilde katı kültürden gelen bitkiler kullanılarak PlantForm sisteminde çoğaltım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. PlantForm Biyoreaktör Sisteminde Mikroçoğaltım ve Köklendirme Denemesinin Kurulması

Mersin bitkisinin katı kültür kaplarında çoğaltımı sonucunda elde edilen bitkicikler kullanılarak PlantForm biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım denemesi 1 mg/L BA içeren MS besin ortamı kullanılarak kurulmuştur. PlantForm biyoreaktör sisteminde kurulan mikroçoğaltım denemesinde besin ortamına agar ilave edilmemiştir. PlantForm biyoreaktör sisteminde her kültür kabına 500 ml besin ortamı eklenmiş ve 100 bitki konulmuştur. Kültür kaplarına 4 saatte bir 10 dk daldırma ve 8 saatte bir 10 dk daldırma uygulanmıştır. Her iki uygulamada kültür kaplarına 4 saatte bir 15 dk havalandırma işlemi uygulanmıştır. Mersin bitkileri PlantForm kültür kaplarında 7 hafta süresince kültüre alınmıştır. PlantForm biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım denemesinde kültür kaplarına ait görüntü Şekil 3.2'de sunulmuştur.



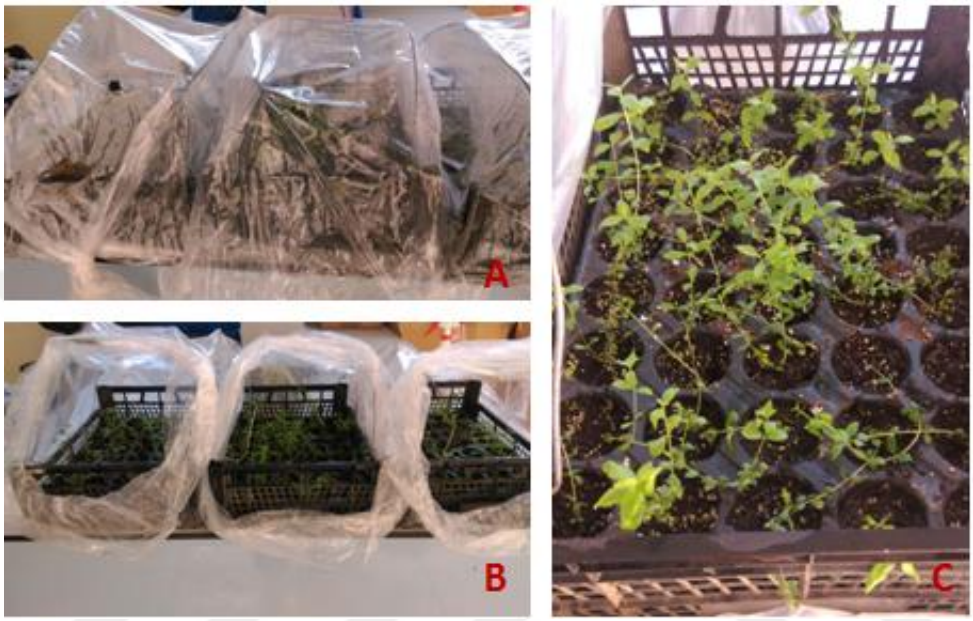
Şekil 3.2. PlantForm biyoreaktör sisteminde kurulan mikroçoğaltım denemesinde kültür kaplarının görüntüsü

Mikroçoğaltım denemelerinden sonra elde edilen bitkiler ile köklenme denemeleri kurulmuştur. Bitkilerin köklendirilmesi çalışmalarında, mikroçoğaltım denemelerinde olduğu gibi 4 ve 8 saat daldırma sıklığı sürelerinden oluşan PlantForm uygulamaları ile katı kültürler kullanılmıştır. Farklı olarak besin ortamı içerisine 1 mg/L IBA eklenmiştir.

3.2.5. Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması

Köklenen bitkiler dış koşullara aktarılmadan önce bitkilerin bulunduğu katı ortamların yer aldığı tüplerin ve biyoreaktör sistemine ait kültür kaplarının kapakları kademeli olarak açılarak laboratuvarda ön alıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bitkiler su ile agardan tamamen uzaklaştırıldıktan sonra serada 1:1 oranda steril torf:perlit karışımı içeren viyollere aktarılmıştır. Bitkiler mini

plastik tünel altında yavaş yavaş dış koşullara alıştırılmıştır (Şekil 3.3). Her iki sistemden gelen bitkicikler ayrı ayrı viyollerde gözlenmiştir.



Şekil 3.3. Mini plastik tünel altında bitkilerin dış koşullara alıştırılması. A: Bitkilerin plastik tünele alınması. B-C: Plastik tünellerin kademeli olarak açılması.

3.2.6. Deneme Planı, İstatistik Analizler ve İncelenen Kriterler

Mersin bitkilerinin mikroçoğaltımı amacıyla kurulan denemelerin tamamı 3 tekerrürlü olacak şekilde, faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Mersin bitkisinin *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 yapılmıştır. Katı kültür denemelerinde bitkiler 4 haftada bir altkültüre alınmıştır. PlantForm biyoreaktör sisteminde ise bitkiler 8 haftada bir altkültüre alınmıştır. Her altkültür sonunda 20'şer bitki incelenmiştir. Her iki sistemde, her altkültür sonunda, bitki başına elde

edilen bitkilerin boyu (cm), kardeşlenme katsayısı (adet), yaprak sayısı (adet), yaş ağırlık (g), kuru ağırlık (g) ve bitkilerin genel görünümlerine ait kriterler incelenmiştir. Köklenme denemelerinde; köklendirme ortamında kültüre alma işleminden 8 hafta sonra köklenme oranı (%), bitki uzunluğu (cm), kök sayısı (adet), kök uzunluğu (cm), yaş ağırlık (g) ve kuru ağırlık (g) 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 5.01 programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında, iki mersin genotipinin *in vitro* koşullarda çoğaltılması ve köklenmesi üzerine katı MS besin ortamının ve PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sisteminin etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Çalışmada, PlantForm ve katı kültürlerden elde edilen köklü bitkiler dış koşullara alıştırılmıştır.

Tez kapsamında, mersin genotiplerinin mikroçoğaltımı ve doku kültüründe bitki kalitesinin arttırılması yanında pek çok avantajı da beraberinde getiren PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sisteminin performansını denemek amacıyla klasik katı kültür sistemi ile PlantForm sisteminin iki farklı daldırma sıklık süresi denenmiştir. Kültür kaplarına 4 saatte bir 10 dk daldırma süresi ve 8 saatte bir 10 dk daldırma süresi uygulanmıştır. Her iki uygulamada kültür kaplarına 4 saatte bir 15 dk havalandırma işlemi uygulanmıştır. Böylece hem iki farklı mersin genotipinin *in vitro* koşullarda verdiği tepkiler incelenmiş, hem de farklı daldırma sıklığı sürelerinin mikroçoğaltım ve köklenme üzerine etkileri araştırılmıştır.

4.1. Mikroçoğaltım Denemelerine Ait Bulgular

Çalışma kapsamında mikroçoğaltım denemelerinde katı kültürlerde ve PlantForm geçici daldırma sistemlerinde gelişim gösteren bitkilerde kardeşlenme katsayısı, bitki boyu, yaprak sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlığa ait veriler alınmıştır. İstatistiksel analizler sonucunda kardeşlenme katsayısına ait veriler değerlendirildiğinde, G2 genotipinin daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Tüm ortamlardan gelen sonuçlara göre G2 genotipinin kardeşlenme katsayısı 11.28 bitki olarak belirlenirken, G1 genotipinin tüm ortamlarda olan ortalama kardeşlenme katsayısı 8.73 bitki olarak belirlenmiştir. Katı kültür ile karşılaştırıldığında, PlantForm sisteminden elde edilen kardeşlenme katsayısı her iki genotip için daha yüksek bulunmuştur. Katı kültürde toplam kardeşlenme katsayısı 6.10 olarak tespit

edilmiş, PlantForm sisteminde denenen iki farklı daldırma süresi karşılaştırıldığında ise 8 saat daldırma süresinde kardeşlenme katsayısının 14.12, 4 saat daldırma süresinde ise 9.80 olduğu belirlenmiştir. Kardeşlenme katsayısı verileri değerlendirildiğinde en başarılı interaksiyonun G2 genotipi X PlantForm 8 saat daldırma süresi (16.85) olduğu tespit edilmiştir. Kardeşlenme katsayısına ait veriler Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. PlantForm ve klasik katı kültürlerde mikroçoğaltım metoduyla çoğaltılan mersin bitkilerinin kardeşlenme katsayıları (adet/bitkicik)

Genotip / Ortam	G1	G2	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	11.40b	16.85a	14.12A
PlantForm 4 saat daldırma süresi	8.55bc	11.05b	9.80B
Katı Kültür	6.25c	5.95c	6.10C
Genotip Ortalaması	8.73B	11.28A	-

$LSD_{Ortam\ X\ Genotip:}$ 3.98*
$LSD_{Genotip:}$ 2.29*
$LSD_{Ortam:}$ 2.81***

Mersin genotiplerinin *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı süresince bitki boyları tespit edilmiştir. Bitki boylarına ait veriler Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Genotipler arasında bitki boyları açısından istatistiki bir farkı tespit edilmemiştir. Bitki boyları açısından ortamlar arasındaki fark incelendiğinde, katı kültürde gelişen bitkilerin PlantForm sisteminde gelişen bitkilerden daha kısa olduğu belirlenmiştir. Sekiz saat daldırma süresi sıklığında gelişen bitkilerin boyları ortalama 8.40 cm, 4 saate ise 9.05 cm olarak belirlenirken, katı kültürde gelişen bitkilerin boylarının ortalama 2.76 cm olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar

değerlendirildiğinde PlantForm geçici daldırma sisteminin bitki boyu üzerine oldukça önemli etki sağladığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. PlantForm ve klasik katı kültürlerde mikroçoğaltım metoduyla çoğaltılan mersin bitkilerinin bitki boyları (cm)

Genotip / Ortam	G1	G2	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	7.95a	8.85a	8.40A
PlantForm 4 saat daldırma süresi	8.80a	9.30a	9.05A
Katı Kültür	3.12b	2.40b	2.76B
Genotip Ortalaması	6.62	6.85	-

$LSD_{Ortam\ x\ Genotip:}$ 1.58*
$LSD_{Genotip:}$ Ö.D
$LSD_{Ortam:}$ 1.11***

Tez çalışması kapsamında *in vitro* koşullarda gelişen mersin bitkilerinin yaprak sayıları da belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen yaprak sayıları Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Yaprak sayılarına ait veriler incelendiğinde, her iki genotip arasında istatistiki bir farkın olmadığı belirlenmiştir. Ortamlar arasındaki fark ise önemli bulunmuştur. Ortalama en fazla yaprak sayısına (68.92) sahip bitkilerin geliştiği ortamın 8 saat daldırma süresi sıklığına sahip PlantForm geçici daldırma sistemi olduğu tespit edilmiştir. Dört saat daldırma süresi sıklığında ortalama yaprak sayısı 53.00 olarak belirlenmiştir. Katı kültürde gelişen bitkilerin yaprak sayılarının boylarının da kısa olması dolayısı ile PlantForm sisteminden oldukça düşük olduğu gözlenmiştir (28.60 yaprak/bitki).

Çizelge 4.3. PlantForm ve klasik katı kültürlerde mikroçoğaltım metoduyla çoğaltılan mersin bitkilerinin yaprak sayıları (adet/bitkicik)

Genotip / Ortam	G1 (yaprak/bitkicik)	G2 (yaprak/bitkicik)	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	66.70ab	71.15a	68.92A
PlantForm 4 saat daldırma süresi	51.85bc	54.15bc	53.00B
Katı Kültür	38.80c	18.41d	28.60C
Genotip Ortalaması	52.45	47.90	

$LSD_{Ortam\ X\ Genotip:}$ 16.80*
$LSD_{Genotip:}$ Ö.D
$LSD_{Ortam:}$ 11.88***

Mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda elde edilen bitkilerin yaş ağırlık ve kuru ağırlıkları da tespit edilmiştir. Bitkilere ait yaş ve kuru ağırlıklar sırasıyla Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'de belirtilmiştir. Yaş ve kuru ağırlıklar değerlendirildiğinde, genotipler arasında istatistiksel açıdan farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir. Kültür kapları bakımından incelendiğinde PlantForm geçici daldırma sistemlerinin katı kültür ortamına göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Yaş ağırlık değerlendirildiğinde, 4 saat daldırma süresi sıklığında yaş ağırlık ortalamasının en yüksek olduğu (1.00), bunu sırasıyla 8 saat daldırma sıklığı (0,65 g) ve katı kültürün (0,19 g) takip ettiği saptanmıştır. Kuru ağırlık değerlendirildiğinde, 4 saat daldırma süresi sıklığında kuru ağırlık ortalamasının en yüksek olduğu (0,27 g), bunu sırasıyla 8 saat daldırma sıklığı (0,13 g) ve katı kültürün (0,03 g) takip ettiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. PlantForm ve klasik katı kültürlerde mikroçoğaltım metoduyla çoğaltılan mersin bitkilerinin yaş ağırlıkları (g)

Genotip / Ortam	G1	G2	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	0.59b	0.72ab	0.65B
PlantForm 4 saat daldırma süresi	1.00a	0.99a	1.00A
Katı Kültür	0.17c	0.22c	0.19C
Genotip Ortalaması	0.58	0.64	-

$LSD_{Ortam\ X\ Genotip:}$ 0.29*
$LSD_{Genotip:}$ Ö.D
$LSD_{Ortam:}$ 0.21***

Çizelge 4.5. PlantForm ve klasik katı kültürlerde mikroçoğaltım metoduyla çoğaltılan mersin bitkilerinin kuru ağırlıkları (g)

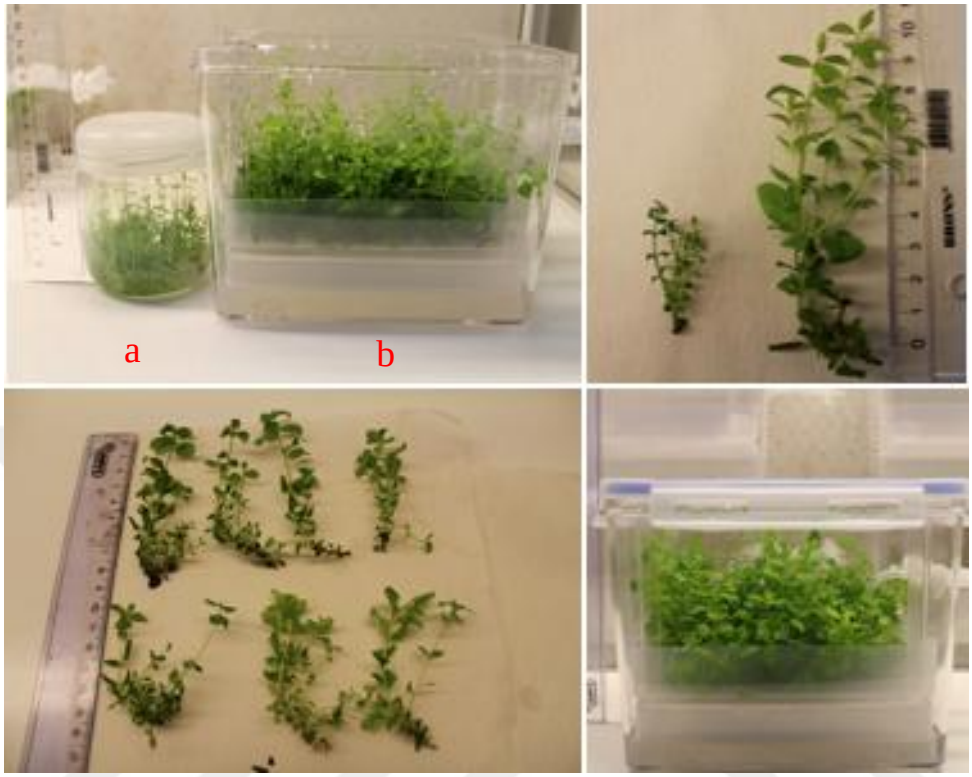
Genotip / Ortam	G1	G2	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	0.11bc	0.16ab	0.13B
PlantForm 4 saat daldırma süresi	0.26a	0.27a	0.27A
Katı Kültür	0.02c	0.03c	0.03C
Genotip Ortalaması	0.13	0.15	-

$LSD_{Ortam\ X\ Genotip:}$ 0.12*
$LSD_{Genotip:}$ Ö.D
$LSD_{Ortam:}$ 0.08***

Mersin bitkilerinin PlantForm kültür kapları içerisindeki genel görünümleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de sunulmuştur. Bitkilerin oldukça sağlıklı bir gelişim gösterdiği ve PlantForm sistemdeki bitkilerin kalitesinin katı kültürdeki bitkilerle karşılaştırıldığında oldukça iyi olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.1. PlantForm biyoreaktör sisteminde (b) çoğaltılan mersin (G1) bitkilerinin katı kültür (a) ile karşılaştırmalı görüntüsü



Şekil 4.2. PlantForm biyoreaktör (b) sisteminde çoğaltılan mersin (G2) bitkilerinin katı kültür (a) ile karşılaştırmalı görüntüsü

Mersin bitkisinin klasik katı kültür ve PlantForm biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım performansları karşılaştırıldığında, PlantForm biyoreaktör sisteminde kültüre alınan bitkilerin daha sağlıklı, bitki boylarının daha uzun, yapraklarının daha büyük ve yaprak sayılarının da daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bitkilerin genel durumu değerlendirildiğinde PlantForm sisteminde gelişen bitkilerin kaliteli ve oldukça sağlıklı olduğu gözlenmiştir.

4.2. Köklenme Denemelerine Ait Bulgular

Bitkilerin başarılı bir şekilde çoğaltılmasının ardından bitkiler klasik katı kültür ve aynı şekilde 2 farklı daldırma süresi sıklığı uygulanacak şekilde PlantForm sistemlerinde köklendirme ortamına transfer edilmişlerdir. Sekiz haftalık kültür süresi sonucunda bitkilerin köklenme oranları hesaplanmıştır. PlantForm sistemlerindeki bitkilerin tamamının köklendiği gözlenmiştir. Fakat klasik katı kültür ortamındaki bitkilerin köklenme oranının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın köklenme bölümlerinde elde edilen bitkilere ait kök sayısı, kök uzunluğu (cm), bitki boyu (cm), yaş ağırlık (g) ve kuru ağırlık (g) verileri alınmıştır.

Köklenme oranı verileri değerlendirildiğinde genotipler arasında istatistiksel bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Ortamlar arasındaki fark ise önemli bulunmuştur. PlantForm geçici daldırma sistemlerindeki bitkilerin köklenme oranı %100 olarak tespit edilirken, katı kültürdeki köklenme oranı %60 olarak belirlenmiştir. Genotipler karşılaştırıldığında, G2'nin köklenme oranının (%93,33) G1'e (%80,00) göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Köklenme oranları Çizelge 4.6’da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. PlantForm ve klasik katı kültürlerde çoğaltılan mersin bitkilerine ait köklenme oranları (%)

Genotip / Ortam	G1	G2	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	100.00 (90.00)a	100.00 (90.00)a	100.00 (90.00)A
PlantForm 4 saat daldırma süresi	100.00 (90.00)a	100.00 (90.00)a	100.00 (90.00)A
Katı Kültür	40.00 (38.85)c	80.00 (63.93)b	60.00 (51.39)B
Genotip Ortalaması	80.00 (72.95)B	93.33 (81.31)A	-

$LSD_{Ortam\ X\ Genotip:}$ 10.30**
$LSD_{Genotip:}$ 5.94**
$LSD_{Ortam:}$ 0.08***

Köklenme ortamlarında bitkiciklerin boy uzunlukları da belirlenmiştir. Genotipler ve ortamlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. PlantForm geçici daldırma sisteminde gelişen bitkiler katı kültür ortamında gelişen bitkilerden daha uzun belirlenmiştir. En uzun bitki boyu 11,00 cm ile 8 saat daldırma süresi sıklığında tespit edilirken bunu sırasıyla 4 saat daldırma süresi sıklığı (10,25 cm) ve katı kültür (6,10 cm) izlemiştir. Genotipler karşılaştırıldığında, en uzun bitki boyunun 10,40 cm ile G1 genotipi olduğu belirlenmiştir. Bitki boylarına ait veriler Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. PlantForm ve klasik katı kültürlerde çoğaltılan mersin bitkilerine ait bitki boyları (cm)

Genotip / Ortam	G1	G2	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	15.10a	6.90cd	11.00A
PlantForm 4 saat daldırma süresi	11.20b	9.30bc	10.25A
Katı Kültür	4.90d	7.30cd	6.10B
Genotip Ortalaması	10.40A	7.83B	-

$LSD_{Ortam\ X\ Genotip:}$ 2.89***
$LSD_{Genotip:}$ 1.67**
$LSD_{Ortam:}$ 2.05***

Bitkilerin köklendirilmesinin ardından gelişen köklerin uzunlukları (cm) belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Kök uzunlukları incelendiğinde katı kültür ve PlantForm sisteminden gelen bitkiler arasındaki farklılığın önemli olduğu tespit edilmiştir. En fazla kök uzunluğuna sahip bitkilerin geliştiği ortamın PlantForm 8 saat daldırma süresi sıklığı (5.52 cm) olduğu belirlenmiştir. PlantForm 4 saat daldırma süresi sıklığında gelişen bitkilerin kök uzunluğu ortalaması 3.85 cm, katı kültürde gelişen bitkilerin kök uzunluğunun ortalamasının 0.88 cm olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.8. PlantForm ve klasik katı kültürlerde çoğaltılan mersin bitkilerine ait kök uzunlukları (cm)

Genotip / Ortam	G1	G2	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	8.10a	2.95bc	5.52A
PlantForm 4 saat daldırma süresi	3.80b	3.90b	3.85B
Katı Kültür	0.00d	1.76c	0.88C
Genotip Ortalaması	3.96A	2.87B	-

$LSD_{Ortam\ X\ Genotip:}$ 1.72***
$LSD_{Genotip:}$ 0.99*
$LSD_{Ortam:}$ 1.21***

Bitkilerin köklendirilmesi çalışmasında incelenen diğer bir kriter ise kök sayısıdır. Bitkilerin kök sayıları ile ilgili veriler Çizelge 4.9'da sunulmuştur. Farklı ortamlar değerlendirildiğinde diğer kriterlerde olduğu gibi katı kültürde gelişen bitkilerin daha düşük seviyede kök sayısına sahip olduğu gözlenmiştir. PlantForm geçici daldırma sistemlerinde ise kök sayılarının 8 saat için 4.55 adet, 4 saat için ise 3.90 adet olduğu ve aradaki 0,65 lik farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.9. PlantForm ve klasik katı kültüründe çoğaltılan mersin bitkilerine ait kök sayısıları (adet)

Genotip / Ortam	G1	G2	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	5.40a	3.70a	4.55A
PlantForm 4 saat daldırma süresi	4.10a	3.70a	3.90A
Katı Kültür	0.90b	1.70b	0.85B
Genotip Ortalaması	3.16	3.03	-

$LSD_{Ortam\ X\ Genotip:}$ 1.94*
$LSD_{Genotip:}$ Ö.D
$LSD_{Ortam:}$ 1.37***

Köklendirme çalışmaları sonucunda bitkilerin yaş ağırlık ve kuru ağırlıkları da tespit edilmiştir. Bitkilere ait yaş ve kuru ağırlıklar sırasıyla Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11'de sunulmuştur. Yaş ve kuru ağırlıklar değerlendirildiğinde, ortamlara ait ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğu, PlantForm geçici daldırma sistemlerinin katı kültür ortamlarına göre daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Yaş ağrılık değerlendirildiğinde, ortamlar arasında en yüksek değerin 1,38 g ile Plantform 4 saat daldırma süresi sıklığı uygulamasında olduğu ve G2 genotipinin 0.89 g ile yaş ağırlığının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Kuru ağırlık incelendiğinde, en fazla kuru ağırlığın 0,21 g ile 4 saat daldırma süresi sıklığında elde edildiği gözlenmiştir. Kuru ağırlık açısından genotipler karşılaştırıldığında, G2 (0,22 g) genotipinde kuru ağırlık G1 (0,05 g)'e göre daha fazla bulunmuştur.

Çizelge 4.10. PlantForm ve klasik katı kültürlerde çoğaltılan mersin bitkilerinin yaş ağırlık değerleri (g)

Genotip / Ortam	G1	G2	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	0.59c	1.13b	0.86A
PlantForm 4 saat daldırma süresi	0.44c	1.38a	0.91A
Katı Kültür	0.15d	0.18d	0.17B
Genotip Ortalaması	0.40B	0.89A	-

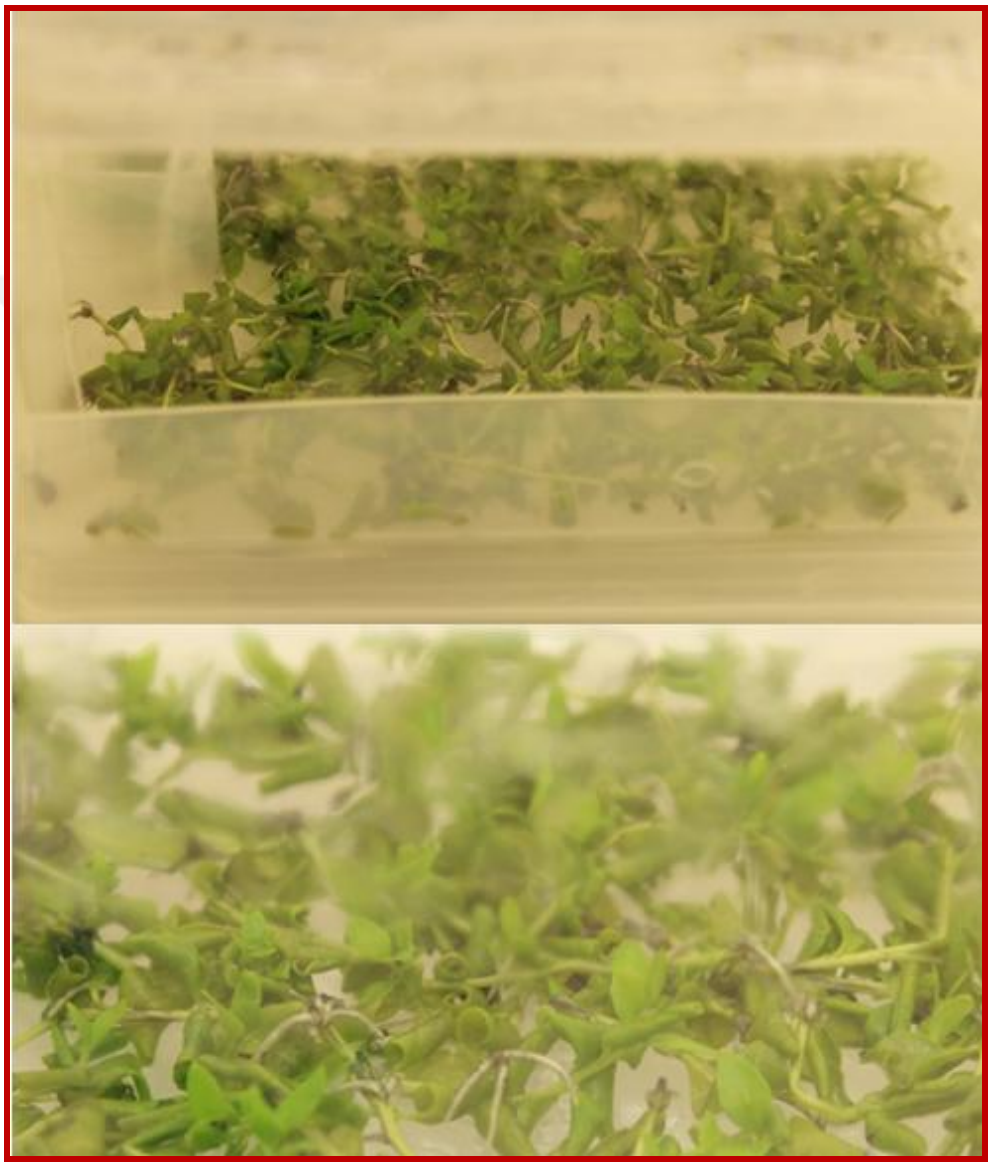
$LSD_{Ortam\ X\ Genotip:}$ 0.20***
$LSD_{Genotip:}$ 0.11***
$LSD_{Ortam:}$ 0.14***

Çizelge 4.11. PlantForm ve klasik katı kültürlerde çoğaltılan mersin bitkilerinin kuru ağırlık değerleri (g)

Genotip / Ortam	G1	G2	Ortam Ortalaması
PlantForm 8 saat daldırma süresi	0.06b	0.28a	0.17A
PlantForm 4 saat daldırma süresi	0.06b	0.36a	0.21A
Katı Kültür	0.01b	0.03b	0.02B
Genotip Ortalaması	0.05B	0.22A	-

$LSD_{Ortam\ X\ Genotip:}$ 0.10**
$LSD_{Genotip:}$ 0.06***
$LSD_{Ortam:}$ 0.07***

PlantForm biyoreaktör sisteminde köklenen mersin bitkilerinin genel görüntüsü Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. PlantForm biyoreaktör sisteminde köklenen mersin bitkilerinin görüntüsü

Çalışma kapsamında, mikroçoğaltım ve köklenme denemelerinde incelenen kriterlere ait tüm veriler aynı tablo içerisinde verilmiştir. Mikroçoğaltım denemelerine ait tüm veriler Çizelge 4.12'de, köklenme denemelerine ait tüm veriler ise Çizelge 4.13'te sunulmuştur.

Çizelge 4.12. Mikroçoğaltım denemelerine ait veriler

Genotip	İncelenen kriterler	PlantForm 8 saat daldırma süresi sıklığı	PlantForm 4 saat daldırma süresi sıklığı	Katı kültür
G1	Kardeşlenme katsayısı (adet)	11.40	8.55	6.25
	Bitki boyu (cm)	7.95	8.80	3.12
	Yaprak sayısı (adet)	66.70	51.85	38.80
	Yaş ağırlık (g)	0.59	1.00	0.17
	Kuru ağırlık (g)	0.11	0.26	0.02
G2	Kardeşlenme katsayısı (adet)	16.85	11.05	5.95
	Bitki boyu (cm)	8.85	9.30	2.40
	Yaprak sayısı (adet)	71.15	54.15	18.41
	Yaş ağırlık (g)	0.72	0.99	0.22
	Kuru ağırlık (g)	0.16	0.27	0.03

Çizelge 4.13. Köklenme denemelerine ait veriler

Genotip	İncelenen kriterler	PlantForm 8 saat daldırma süresi sıklığı	PlantForm 4 saat daldırma süresi sıklığı	Katı kültür
G1	Köklenme oranı (%)	100.00	100.00	40.00
	Bitki boyu (cm)	15.10	11.20	4.90
	Kök uzunluğu (cm)	8.10	3.80	0.00
	Kök sayısı (adet)	5.40	4.10	0.90
	Yaş ağırlık (g)	0.59	0.44	0.15
	Kuru ağırlık (g)	0.06	0.06	0.01
G2	Köklenme oranı (%)	100.00	100.00	80.00
	Bitki boyu (cm)	6.90	9.30	7.30
	Kök uzunluğu (cm)	2.95	3.90	1.76
	Kök sayısı (adet)	3.70	3.70	1.70
	Yaş ağırlık (g)	1.13	1.38	0.18
	Kuru ağırlık (g)	0.28	0.36	0.03

4.3. Dış Koşullara Alıştırma

Tez kapsamında her 3 uygulamada köklenen bitkiler dış koşullara adapte edilmiştir. Dış koşullara aktarılan bitkilerin yaşama oranları incelendiğinde her 3 uygulamada da yaşama oranının oldukça yüksek olduğu ancak PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sisteminde gelişme gösteren bitkilerin pazara sunulma ya da toprağa transfer edilme sürecinin daha kısa olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmaları sonucunda elde edilen ve dış koşullara alıştırılan mersin bitkilerinin genel görüntüsü Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Dış koşullara alıştırılan mersin bitkilerinin genel görüntüsü

Mersin bitkisinin katı kültür kaplarında ve PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım performansları karşılaştırıldığında, PlantForm biyoreaktör sisteminde kültüre alınan bitkilerin daha sağlıklı, bitki boylarının daha uzun (Çizelge 4.2.) ve yapraklarının daha büyük olduğu ve bitki başına düşen kardeş sayısının (Çizelge 4.1.) daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Mersin bitkisinde PlantForm biyoreaktörü kullanılarak yürütülen bir mikroçoğaltım çalışmasında, geçici daldırma sisteminde kültüre alınan mersin bitkilerinin yarı-katı besin ortamında yapılan klasik doku kültürü çalışmalarına göre daha yüksek çoğalma ve daha iyi bitki gelişiminin gözlendiği belirtilmiştir (Benelli ve ark., 2015). İlgili çalışmada kullanılan mersin genotipinin tez kapsamında kullandığımız mersin genotipinden farklı olduğu bilinmektedir. Bitki doku kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden birisi genotiptir. Daha önce yürütülmüş bu çalışma ve tez çalışmasında elde ettiğimiz bulgular PlantForm geçici daldırma sisteminin farklı mersin genotipleri üzerinde olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Ayrıca tez çalışmasında iki farklı mersin genotipi kullanılmıştır. G1 olarak adlandırılan genotip Adana/Kozan, G2 olarak adlandırılan genotip ise Antalya/Alanya bölgelerinden temin edilmiştir. Bu genotiplerin meyve özellikleri karşılaştırıldığında önemli farklılıkların olduğu bilinmektedir. Çalışmada her iki genotip başarılı şekilde çoğaltılmış ve katı kültür sistemlerine göre daha iyi bir sonuç elde edilmiştir. Böylece geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin farklı mersin genotiplerinde başarılı sonuçlar verebileceği gözlenmiştir.

Mersin bitkisinin *in vitro* çoğaltımı ile ilgili birçok çalışma yürütülmüştür. Ancak bu çalışmaların neredeyse tamamı klasik doku kültürü yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şan ve ark. (2015), Mersin bitkisinin *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada, farklı bitki büyüme düzenleyicileri (TDZ, BAP ve NAA) kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, uygulamalar arasında en yüksek kardeşlenme katsayısının 4 olduğunu tespit etmişlerdir. Tez kapsamında yürüttüğümüz çalışmalarda ise, kardeşlenme

katsayısının klasik doku kültürü koşullarında yaklaşık 6 olduğu tespit edilmiştir. PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda ise kardeşlenme katsayısının ortalama 14'ün üstüne çıktığı gözlenmiştir. Sonuç olarak PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sisteminin mersin bitkisinin kardeşlenmesi üzerine olumlu etki gösterdiği ortaya konulmuştur. Nobre (1994), Mersin bitkisinin *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımını gerçekleştirmiştir. Bu amaçla, besin ortamı olarak tez çalışmasında da kullandığımız MS bazal ortamını kullanmıştır. Besin ortamı içerisine BA, NAA ve GA_3 bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarını eklemiş ve mikroçoğaltım çalışmalarını yürütmüştür. Çalışma sonucunda, kardeşlenme katsayısının BA konsantrasyonun yükselmesine bağlı olarak arttığını ve kardeşlenme katsayısının kullanılan besin ortamlarına göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Genotipe bağlı olarak farklı oranlarda kardeşlenme katsayısının elde edilmesi bitki doku kültürü çalışmalarında beklenen bir sonuçtur. Mikroçoğaltım çalışmaları sonucunda, yüksek oranda kardeşlenme katsayısının elde edilmesi istenen bir sonuç olmakla beraber tek başına yeterli değildir. Bitkilerin yüksek oranda çoğalmasında ek olarak sağlıklı bir gelişim gösterebilmeleri oldukça önemli bir kriterdir. Tez kapsamında mersin bitkilerinin mikroçoğaltımı sürecinde bitki uzunlukları da dikkate alınmıştır. Klasik doku kültürü yönteminde mersin bitkilerinin boyları yaklaşık olarak 2-3 cm arasında değişirken, PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sisteminde çoğalan mersin bitkilerinin boylarının yaklaşık olarak 7-10 cm arasında değiştiği belirlenmiştir. Sonuç olarak klasik doku kültürü yöntemlerinde çok yüksek oranda kardeşlenme katsayısı elde etmek tek başına başarıyı getirmemektedir. *In vitro* koşullarda çoğaltılan bitkilerin sağlıklı ve kaliteli olmaları da önemli bir kriterdir. Tez kapsamında yapılan gözlemlerde, PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sisteminin bitki kalitesi üzerine oldukça olumlu etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

Literatür özeti incelendiğinde PlantForm geçici daldırma sistemleri kullanılarak farklı bitkilerde mikroçoğaltım çalışmaları yürütülmüştür. PlantForm biyoreaktör sistemi kullanılarak yürütülen ilk çalışmalar *Carex oshimensis* 'Evergreen', *Chrysanthemum morifolium*, *Ficus carica* ve *Ribes rubrum* bitkilerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda geçici daldırma sisteminin sürgün kalitesine, çoğalma katsayısına ve köklenme oranına olumlu katkılar sağladığı bildirilmiştir (Lambardi ve ark., 2015).

PlantForm geçici daldırma sistemi dışında bugüne kadar farklı marka ve modellerde geçici daldırma sistemleri de geliştirilmiştir. Ramírez-Mosqueda ve Iglesias-Andreu (2016), yaptıkları çalışmada, *Vanilla planifolia* bitkisinin *in vitro* koşullarda çoğaltılmasında ve köklendirilmesinde farklı geçiçi daldırma sistemlerinin etkinliğini araştırmışlardır. Araştırmada, BIT®, BIG ve RITA® sistemlerini kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, gerek sürgün oluşumu gerek kök oluşumu açışından en başarılı geçici daldırma sisteminin BIT® olduğu bildirilmiştir.

Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde başarıyı etkileyen önemli faktörlerden biri de daldırma süresidir. Çalışmada kullanılan genotipe göre optimum daldırma süresinin belirlenmesi önemli bir konudur. Tez kapsamında 4 saat ve 8 saatte bir 10 dk olmak üzere iki farklı daldırma döngüsü denenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 4 saat ve 8 saat arasında genel bir farklılık tespit edilmemiştir. Gutiérrez ve ark (2016), *Guadua angustifolia* bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltımı için RITA® geçici daldırma biyoreaktör sistemini kullanmışlardır. Çalışmalarında 6 ve 8 saatte bir 2 dk olmak üzere iki farklı daldırma sıklığı denemişlerdir. Çalışma sonuçlarını incelediklerinde ise, en iyi çoğalma katsayısının 6 saatte bir 2 dk daldırma süresinde olduğunu gözlemlemişlerdir. Tez kapsamında Mersin bitkilerinin çoğalma katsayıları incelendiğinde, 8 saat daldırma sıklığının daha olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Farklı bir çalışmada *Stevia rebaudiana* türü için etkin mikroçoğaltım protokolü geliştirmek amacıyla RITA ve PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sistemleri agarla katılaştırılmış ortam ile

karşılaştırılmıştır. PlantForm biyoreaktör sisteminde 3 saatte bir daldırma kallus ve camlaşma sorunu oluşturduğu, 8 saatte bir daldırmanın bizim çalışmamızda olduğu gibi daha kaliteli sürgün oluşumu sağladığı bildirilmiştir (Sacco ve ark., 2015).

Tez kapsamında, geçici daldırma sisteminde kültüre alınan bitkilerin köklenme oranının %100 olduğu ve klasik doku kültürü koşullarında köklendirilen bitkilere göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Şan ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada IBA ve NAA'nın farklı konsantrasyonları mersin bitkilerinin köklendirilmesi için kullanılmış ve en yüksek köklenme oranının %80 olduğu belirtilmiştir. Scarpa ve ark. (2010), mersin bitkisinin *in vitro* koşullarda köklenmesi üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla IAA'nın farklı konsantrasyonları denenmiştir. Çalışma sonucunda en yüksek köklenme oranının %61 ile 1 mg/L IAA içeren besin ortamında gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Tez çalışmasında, PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sisteminde yürütülen köklenme denemeleri sonucunda tüm bitkilerin başarılı bir şekilde köklenmesi bu sistemin köklenme üzerine de oldukça başarılı etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur. Mersin bitkilerinin köklendirilmesi üzerinde yürütülen diğer bir çalışmada ise IBA ve aktif karbonun farklı konsantrasyonları denenmiş ve bitkilerin köklenme performansları araştırılmıştır. Aktif karbon içermeyen, IBA 1 ve IBA 2 mg/L içeren ortamlarda köklenmenin en yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir (Aka Kaçar ve ark., 2017). Tez çalışmasında da benzer şekilde kullanılan bitki büyüme düzenleyicisi 1 mg/L IBA olup farklı olarak PlantForm sistemlerindeki bitkilerin tamamı köklenmiş ve bitki kalitelerinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bitki doku kültürü çalışmalarında farklı besin ortamları kullanılabilmektedir. Tez çalışmasında MS ortamı kullanılmış ve PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sistemleri ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Mersin bitkisinin köklendirilmesi amacıyla yürütülen başka bir çalışma da farklı ortamlar denenmiştir. Biçen ve ark. (2017), mersin bitkisinin çoğalma ve köklenmesi üzerine farklı besi ortamlarının (MS, Rugini Olive Medium, (Woody Plant Medium: WPM) etkisini araştırmışlar ve köklenmede en başarılı besi ortamının

%60 köklenme ile WPM ardından da %45 köklenme ile Rugini besi ortamında olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışmasında ise MS ortamı içeren PlantForm sistemlerinde köklenme oranının %100 olduğu belirlenerek, bu sistemin önemli ve olumlu etkisi olduğu kesin olarak doğrulanmıştır.

Bitki doku kültürü laboratuvarlarında maliyet oldukça önemli bir konudur. PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sistemleri ile katı kültür ortamlarının maliyetleri karşılaştırıldığında, PlantForm biyoreaktör sistemlerinin daha avantajlı olduğu tespit edilmiştir. PlantForm biyoreaktör sistemleri ve katı kültürde kullanılan besin içerikleri ve sabit giderler aynıdır. PlantForm biyoreaktör sistemlerinde agar kullanılmamakta ve bir işçinin birim zamanda yaptığı iş miktarının daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Agar kullanımı ve işçilik maliyetleri değerlendirildiğinde, PlantForm biyoreaktör sistemlerinin katı kültüre göre %50 daha az maliyetli olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez kapsamında, iki mersin genotipinin *in vitro* koşullarda çoğaltılması ve köklenmesi üzerine geleneksel katı MS besin ortamının ve geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinden biri olan PlantForm'un etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sisteminde 4 ve 8 saat olmak üzere iki farklı daldırma süresi sıklığı da uygulanmıştır. Tez sonuçları incelendiğinde iki farklı mersin genotipinin mikroçoğaltım ve köklendirme performanslarında önemli bir farkın bulunmadığı tespit edilmiştir. Katı kültür ve PlantForm sistemi karşılaştırıldığında ise mikroçoğaltım ve köklendirme açısından her iki genotipte PlantForm sisteminin daha başarılı olduğu belirlenmiştir. İncelenen tüm kriterlerde PlantForm sisteminin katı kültür sistemine göre daha yüksek değerlere sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bitki kalitesinin de PlantForm sisteminde katı kültürlerde gelişen bitkilere göre çok daha yüksek olduğu saptanmıştır. PlantForm geçici daldırma sisteminde daldırma süresi sıklığı bitki gelişimine etki eden önemli faktörlerden birisidir. Tez çalışmasında 4 ve 8 saat daldırma süresi sıklığı denenmiştir. Sonuç olarak 8 saat daldırma süresi sıklığının 4 saate göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada biri Kozan/Adana, diğeri de Alanya/Antalya yörelerinden temin edilmiş iki farklı mersin genotipi kullanılmıştır. Mersin genotiplerinin meyve özellikleri incelendiğinde önemli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada iki mersin genotipinin de PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sisteminde başarılı sonuçlar vermesi, bu sisteminin diğer mersin genotiplerinin de optimize edilebileceği olgusunu güçlendirmektedir. PlantForm geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak katı kültürlere göre daha kısa sürede, daha kaliteli ve sayı olarak çok daha fazla bitkinin elde edilmesi özel sektör için doku kültürü ile üretimi yapılan diğer bitki türleri içinde önemli bir potansiyeldir.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile mersin bitkisinin *in vitro* koşullarda çoğaltılması ve köklendirilmesi için TIS ve agar içeren ortamların

karşılaştırılmasına dayanarak yüksek pozitif etkiler belirlenmiştir. Çalışma sonunda, TIS'in geniş çaplı mikroçoğaltım uygulamaları için iyi bir potansiyel olduğu belirlenmiştir.

PlantForm geçici daldırma sistemi ile ilgili çalışmalar tez içerisinde de belirtildiği gibi oldukça yeni ve kısıtlı kalmıştır. Bu tez çalışmasından çıkan olumlu sonuçlar incelendiğinde farklı mersin genotipleri ile çoğaltımı zor olan birçok bahçe bitkisi türünün bu yöntemle başarılı bir şekilde çoğaltılabileceği öngörülmektedir. Bitki doku kültüründe bazı durumlarda 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. Ancak bu tez çalışmasının devamında bu durumun doğrulanması için PlantForm geçici daldırma sisteminden gelen bitkiler ile örneklemenin yapıldığı ilk bitkilerin DNA seviyesinde karşılaştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Aka Kaçar, Y., Biçen, B., Şimşek, Ö., and Dal, B., 2015. *In Vitro* Rooting of Micropropagated Shoots from *Myrtus communis* Linn: Influence of Activated Charcoal and Indole-3-butyric Acid (IBA). 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, Sanremo, Italy. Abstract Book.

Alvard, D., Cote, F., and Teisson, C. 1993. Comparison of Methods of Liquid Medium Culture for Banana Micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 32;55–60.

Avcı, A.B., ve Bayram, E., 2008. Mersin Bitkisi (*Myrtus communis* L.)'nde Farklı Hasat Zamanlarının Uçucu Yağ Oranlarına Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12(3);178-181.

Aydın, C., and Özcan, M.M., 2007. Determination of Nutritional and Physical Properties of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Fruits Growing Wild in Turkey. Journal of Food Engineering, 79;453-458.

Baytop, T., 1997. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. Türk Dil Kurumu Yayınları, No: 578, Ankara, Turkey.

Benelli, C., Fernanda, C.M., and De Carlo, A., 2015. 'Plant Form', A Temporary Immersion System, for *In Vitro* Propagation of *M. communis* and *Olea europaea*. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, Sanremo, Italy. Abstract Book.

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

Bonjar, G.H.S., 2004. Antibacterial Screening of Plants Used in Iranian Folkloric Medicine. Fitoterapia, 75;231–235.

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.

Davis, P.H., 1972. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 4, Edinburgh, Edinburgh.

Debnath, S. C., 2009. Development of ISSR Markers for Genetic Diversity Studies in *Vaccinium angustifolium*. Nordic Journal of Botany, 27(2);141-148.

Dewir, Y. H., Chakrabarty, D., Hahn, E. J., and Paek, K. Y., 2006. A Simple Method for Mass Propagation of *Spathiphyllum cannifolium* Using An Airlift Bioreactor. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 42(3);291-297.

Erlaçin, S., ve Erciyas, E., 1978. *Myrtus Communis* L. (Mersin Bitkisi) Yapraklarının Tanen Yönünden İncelenmesi, DOĞA II, 75-79.

Escalona, M., Lorenzo, J.C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., and Borroto, C. G., 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) Micropropagation in Temporary İmmersion 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;651-656.

Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Maccioni, S., and Baldini, R., 2004. Phytochemical Typologies in Some Populations of *Myrtus communis* L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy). Food Chemistry, 85;599-604.

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.

Grigoriadou, K., and Leventakis, N., 1999. Preliminary Study On Large Scale *In Vitro* Propagation of *Myrtus communis* L. ISHS Acta Horticulturae 541: IV International Symposium on New Floricultural Crops.

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.

Hatzilazarou, S., Grammatikos, H., Economou, A.S., Rifaki, N., and Ralli, P., 2001. Rootıng *In Vitro* and Acclimatization of *Myrtus communis* Microcuttings. I. International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants.

Hayder, N., Abdelwahed, A., Kilani, S., Ben, A.R., Mahmoud, A., Ghedira, K., and Chekir Ghedira, L., 2004. Anti-Genotoxic and Free-Radical Scavenging Activities of Extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. Mutation Research, 564;89- 95.

Khosh-Khui, M., Shekafandeh, A., and Azarakhsh, H., 1984. Micropropagation of Myrtle (*Myrtus communis* L.). Scient Horticultur, 22;139-146.

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., Bujazha, D., Baileiro, F., Correira Da Silva, D.P., and Özüdoğru E.A., 2015.Improvement of Shoot Proliferation by Liquid Culture in Temporary Immersion. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, Sanremo, Italy. Abstract Book.

Mascarello, C., Melis, R., Mantovani, E., and Ruffoni, B., 2009. Evaluation of The Role of Light İntensity and Hormonal Treatments During *In vitro* Rooting of Myrtus Micropropagated Plantlets Related to Acclimatization Performances. Acta Horticulturae, 379-386.

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.

Nobre, J., 1994. *In vitro* Shoot Proliferation of *Myrtus communis* L. from Field-Grown Plants. Scientia Horticulturae, 58(3);253–258.

Oğur, R., 1994. A Review About Myrtle (*Myrtus communis* L.). Çevre Dergisi, 10;21-25 (article in Turkish with an abstract in English).

Parra, R., and Amo-Marco, J.B., 1998. Secondary Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Myrtle (*Myrtus communis* L.). Plant Cell Rep, 18;325-330.

Pavlov, A., and Bley, T., 2006. Betalains Biosynthesis by *Beta vulgaris* L. Hairy Root Culture in A Temporary İmmersion Cultivation System. Process Biochemistry, 41(4);848-852.

Piao, X. C., Chakrabarty, D., Hahn, E. J., and Paek, K. Y., 2003. A Simple Method for Mass Production of Potato Microtubers Using A Bioreactor System. Current Science, 1129-1132.

Picci, V., and Atzei, A.D., 1996. Ricerche su Specie di Interesse Medicinale ed Aromatico della Sardegna. Ricerche Morfo-Sistematiche e Biologiche su Finocchio, Liquirizia, Mirto, Rosmarino e Zafferano. Rivista Italiana EPPOS, 7(19);21-86.

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.

Rezaee, A., and Kamali, K., 2014. A New Commercial Protocol for Micropropagation of Myrtus tree. Adv. Biores, 5(4);73-79.

Romani, A., Pinelli, P., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., and Tattini, M., 1999. Identification and Quantitation of Polyphenols in Leaves of *Myrtus communis* L. Chromatographia, 49(1-2);17-20.

Ruffoni, B., Mascarello, C., and Savona, M., 2010. *In Vitro* Propagation of Ornamental Myrtus (*Myrtus communis*). Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants Methods in Molecular Biology, 589;257-269.

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.

Scarpa, G.M., Milia, M., and Satta, M., 2000. The Influence of Growth Regulators on Proliferation and Rooting of *In Vitro* Propagated Myrtle. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62;175-179.

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

Şan, B., Karakurt, Y., and Dönmez, F., 2015. Effects of Thidiazuron and Activated Charcoal on *In Vitro* Shoot Proliferation and Rooting of Myrtle (*Myrtus communis* L.). Journal of Agricultural Sciences. 21;177-183.

Takayama, S., and Akita, M., 1998. Bioreactor Techniques for Large-Scale Culture of Plant Propagules. Advances in horticultural science, 93-100.

Tunçer, P., 2014. Mersin Bitkisinin (*Myrtus communis* L.*)* Broiler Rasyonlarında Kullanım İmkanlarının Araştırılması, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 96s.

Uhring, J., 1983. *In vitro* Propagation of Sedum and Myrtus Cultivars. HortScience, 18(4);453–454. University Press.

Vidal, N., Blanco, B., and Cuenca, B., 2015. A temporary Immersion System for Micropropagation of Axillary Shoots of Hybrid Chestnut. Plant Tissue and Organ Culture, 123(2);229-243.

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

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

Yıldırım, H., 2012. Adana ve Mersin Ekolojik Koşullarında Yetişen Mersin Bitkisi (*Myrtus communis* L.)'nde Bazı Bitkisel ve Pomolojik Özellikler ile Yaprak Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

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. Optimisation of Growing Conditions for The Apple Rootstock M26 Grown in RITA Containers Using Temporary İmmersion Principle. In Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation (pp. 253-261), Springer Netherlands.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında İstanbul'da doğdu. Orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 1997 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nde başladığı lisans eğitimini 2001 yılında tamamladı. Yüksek lisans eğitimini Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda 2007 yılında tamamladı. Evli ve iki çocuk sahibidir. Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde görev yapmaktadır.