alatarım 2020, 19 (2): 75 - 84

Farklı Böğürtlen (*Rubus fruticosus* L.) Çeşitlerinin Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Mikroçoğaltım Olanaklarının Araştırılması

Mustafa Alparslan UMARUSMAN[1] Özhan ŞİMŞEK[2] Belgin BİÇEN[3]
Sedat SERÇE[4] Yıldız AKA KAÇAR[5]

[*1]Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi, Tarım ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümü, Konya
[2]Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kayseri
[3]Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Adana
[4]Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği Böl. Niğde
[5]Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana

Öz

Bu çalışmada, beş farklı böğürtlen çeşidinin (Black Diamond, Black Pearl, Chester, Triple Crown ve New Berry) Plantform biyoreaktör sistemi ve katı besin ortamlarında karşılaştırmalı olarak mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmaları yürütülmüştür. Çeşitlerin katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde, MS temel besin ortamına BA (Benzil Adenin) (0, 1.0, 2.0 mg/L) ve GA_3 (Gibberellik Asit) (0.5 mg/L) bitki büyüme düzenleyicileri uygulanmıştır. Katı kültür köklenme denemeleri için MS besin ortamında NAA (Naftalen Asetik Asit) (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) ve IBA (İndol Bütirik Asit) (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) büyüme düzenleyicileri denenmiştir. Katı kültür denemeleri sonucunda en yüksek mikroçoğaltım değerleri 1 mg/L BA ve en iyi köklenme başarısı 1 mg/L NAA bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları içeren besin ortamlarından elde edilmiştir. Mikroçoğaltım ve köklendirme için belirlenen en iyi besin ortamı içeriği ile Plantform sisteminde çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, Plantform sistemi her beş böğürtlen çeşidi için bitki boyu, çoğalma katsayısı, bitki kalitesi ve köklenme bakımından katı kültür sistemine göre daha iyi sonuç vermiştir. Bu çalışma ile Plantform biyoreaktör sistemi, mikroçoğaltım ve köklendirme açısından katı kültür ortamlarına göre daha etkili bir yöntem olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Plantform, geçici daldırma biyoreaktör sistemi, böğürtlen, *Rubus fruticosus* L., mikroçoğaltım.

Investigation of Micropropagation Opportunities of Different Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) Cultivars with Classical and New Generation Tissue Culture Techniques

Abstract

In this study, micropropagation and rooting studies were carried out in comparative Plantform bioreactor system and solid media with five different blackberry cultivars (Black Diamond, Black Pearl, Chester, Triple Crown and New Berry). Micropropagation of blackberry cultivars were evaluated in solid MS media supplemented with BA (Benzyl Adenine) (0.0, 1.0, 2.0 mg/L) and GA_3 (Gibberellic Acid) (0.5 mg/L). Rooting was evaluated in solid MS media supplemented with NAA (Naphthalene Acetic Acid) (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) and IBA (Indole-3-Butyric Acid) (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L). Based on the solid media, the best results in all five blackberry cultivars were obtained from MS medium containing 1 mg/L BA plant growth regulator concentration for micropropagation and that of from MS medium containing 1 mg/L NAA plant growth regulatory concentration for rooting. Micropropagation and rooting studies were carried out in the Plantform system with the best-defined media content from the solid media. As a result of studies, Plantform system showed better plant growth, multiplication coefficient, plant quality, and rooting than the solid culture system for all five blackberry cultivars. Plantform bioreactor system was evidenced as a more effective method in terms of micropropagation and rooting compared to solid culture media with this study.

Keywords: Plantform. temporary immersion bioreactor systems, blackberry, *Rubus fruticosus* L., micropropagation.

Sorumlu Yazar/Correspondence to: M.A. Umarusman; mustafa.alp.umarusman@gmail.com
Makalenin Türü: Araştırma
Geliş Tarihi/Received: 15.12.2020 Kabul Tarihi/Accepted: 28.12.2020 Category: Research

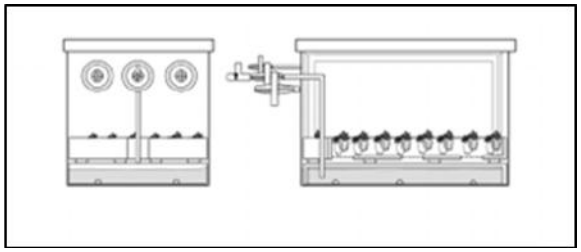
Mustafa Alparslan UMARUSMAN https://orcid.org/0000-0001-5762-7216 Özhan ŞİMŞEK https://orcid.org/0000-0002-1426-466X
Belgin BİÇEN https://orcid.org/0000-0001-8931-4759 Sedat SERÇE https://orcid.org/0000-0003-4584-2028
Yıldız AKA KAÇAR https://orcid.org/0000-0001-5314-795

Giriş

Meyve özellikleri yönünden üzümsü meyveler grubunda yer alan böğürtlen dünyada ılıman iklim bölgelerinde, subtropik iklimden ve kutup iklim sınırlarına kadar yayılmıştır. Türkiye böğürtlenin anavatanı sınırları içerisindedir. Böğürtlenlerin Anadolu'nun 1000 m'nin üzerinde hava ve toprak neminin sağlandığı

yerlerde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır. Son yıllarda, zengin antioksidan içeriği nedeniyle böğürtlen meyvelerine olan ilgi artmıştır (Göktaş, 2011). Ülkemizde uzun yıllardan beri doku kültürü çalışmalarıyla çok sayıda bitki türü *in vitro* şartlarda başarıyla üretilmektedir. Bu sistem içerisinde çoğunlukla katılaştırıcı "Agar" kullanılarak katı ortam kültürlerinde eksplantlar kültüre alınmaktadır. Agar ve diğer katılaştırıcı bileşenler doku kültüründe girdi maliyeti en yüksek olan bileşendir. Ayrıca klasik doku kültürü tekniklerinin yoğun işgücü gerektirmesinin yanı sıra üretim maliyetleri de oldukça yüksektir. Klasik katı kültür yöntemlerinde çok sayıda kültür kabına gereksinim duyulmakta ve bu durum iklimlendirme ortamlarının büyütülmesi için yer ihtiyacını zorunlu hale getirmektedir (Umarusman ve Aka Kaçar, 2018). Katı kültür sistemlerinde katı besin ortamına yerleştirilen eksplantların gelişmelerinde sürekliliğin sağlanması için periyodik olarak alt kültüre alınmaları zorunludur. Her bir alt kültür sırasında besin ortamlarında kontaminasyon görülme olasılığı artmaktadır. Katılaştırıcı bileşenlerin kullanıldığı katı besin ortamlarında gerçekleştirilen doku kültürü çalışmaları, sıvı besin ortamında yapılan doku kültür çalışmaları ile kıyaslandığında katı kültür ortamlarında kontaminasyon oluşma riski daha yüksektir (Etienne ve Berthouly, 2002). Katı kültür sistemlerinde karşılaşılan sorunlar sebebiyle son zamanlarda geliştirilen ve bitkinin belirli aralıklarla sıvı yüzeyden uzaklaşmasını mümkün kılan geçici daldırma sistemi biyoreaktörler kullanılmaktadır. Geçici daldırma sistemi biyoreaktörler, ilk olarak Haris ve Mason (1983) tarafından geliştirilmiş olup ilk başarılı bitki rejenerasyon sonuçları *Solanum tuberosum* ve *Coffee arabica*'nın somatik embriyolarından elde edilmiştir (Etienne ve Berthouly, 2006).

Geçici daldırma sistemi biyoreaktörlerde diğer biyoreaktör sistemlerinden farklı olarak eksplantlar ile sıvı besin ortamı arasında zaman zaman geçici temas sağlayabilen bir yüzey geliştirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Plantform geçici daldırma biyoreaktör sistemi (boyutlar 180 × 150 × 150 mm) (Georgiev ve ark., 2014; Aka Kaçar ve ark., 2020)

Hava akımı ile ortam belirli aralıklarla yukarı doğru çıkarak bitkinin ihtiyaç duyduğu besin maddelerine ulaşması sağlanmaktadır. Daldırma işlemi süresince hava akımı ve besin ortamı bitkiye nüfuz ederek materyale zarar vermeden dokulara iletilmektedir. Biyoreaktörlerde kitlesel bitki üretim protokollerinin kurulabilmesi için, katı kültür ve sıvı ortamlarda optimum kültür koşullarının belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Günümüzde doku kültürü çalışmaları sayesinde böğürtlen çeşitlerinin klonal ve kitlesel olarak çoğaltılması mümkündür. Bu çalışmanın amacı, yeni nesil doku kültürü sistemi olan Plantform® geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile klasik doku kültürü tekniklerinin böğürtlen bitkisi için mikroçoğaltım ve köklendirme açısından başarılarının karşılaştırılmasıdır.

Materyal ve Yöntem

Bitkisel Materyal

Çalışmada beş farklı (Black Diamond, Black Pearl, Chester, Triple Crown ve New Berry) böğürtlen çeşidi kullanılmıştır.

Bitkisel Materyalin Sterilizasyonu

Çalışma kapsamında kullanılan böğürtlen çeşitlerine ait sürgün uçları laboratuvara getirildikten sonra, toz ve katı partikülleri uzaklaştırmak amacıyla çeşme suyu altında 10 dk yıkanmıştır. Daha sonra sürgün uçları %70 etil alkol çözeltisinde 3 dk ardından %5 sodyum hipoklorit + 1-2 damla Tween 20 çözeltisinde 10 dk bekletilmiştir. Ardından dezenfektan maddelerin uzaklaştırılması amacıyla, 3 defa steril saf su ile durulanmıştır.

Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemelerinin Kurulması

Katı besin ortamında kültüre alınan böğürtlen çeşitleri; 1-2 mg/L BA ve 0.5 mg/L GA_3 kombinasyonları ile 30 g/L sakkaroz, 7.5 g/L agar içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında kültüre alınmışlardır. Besin ortamının pH'sı 5.5'e ayarlanmıştır. Katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde, mikroçoğaltım ortamlarında her bir tekerrür için 20 bitki kültüre alınmıştır. Kültüre alınan bitkiler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık, 25±2 °C sıcaklık koşullarında gelişmeye bırakılmıştır. Eksplantlar dört haftada bir olmak üzere toplamda 3 kez alt kültüre alınmıştır. Denemede besin ortamının mikroçoğaltıma etkisi belirlenirken her çeşit kendi içinde değerlendirilmiştir.

Katı Kültür Köklendirme Denemelerinin Kurulması

Mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen böğürtlen çeşitlerine ait bitkiler ile katı kültür köklendirme denemesi kurulmuştur. Köklenme denemelerinde, 0.5-1-2 mg/L IBA ve 0.5-1-2 mg/L NAA ile 30 g/L sakkaroz, 7.5 g/L agar içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Katı kültür köklenme denemelerinde kullanılan besin ortamlarının pH'sı 5.5'e ayarlanmıştır. Katı kültür köklendirme denemelerinde, köklendirme ortamlarına her bir tekerrür için 20 bitki kültüre alınmıştır. Köklendirme ortamına alınan eksplantlar 16 saat aydınlık 8 saat karanlık, 25±2°C sıcaklık koşullarında gelişmeye bırakılmıştır. Köklendirme denemesinde besin ortamının köklenmeye etkisi belirlenirken her çeşit kendi içinde değerlendirilmiştir.

Plantform Biyoreaktör Sistemi ile Mikroçoğaltım Denemelerinin Kurulması

Mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkiler ile Plantform Biyoreaktör Sistemi mikroçoğaltım denemeleri kurulmuştur. Denemede kullanılan besin ortamlarının içerisine katı ortam mikroçoğaltım denemelerinde en iyi sonuç veren bitki büyüme düzenleyici olarak belirlenen 1 mg/L BA ve 30 g/L sakkaroz ilave edilmiştir. Mikroçoğaltım denemelerinde besin ortamlarının pH'sı 5.5'e ayarlanmıştır. Plantform biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemesinde, sıvı besi yeri içeren her kültür kabına 500 mL besin ortamı eklenmiş ve 50 bitki kültüre alınmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Kültüre alınan eksplantlar 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 25±2 °C sıcaklık büyütme koşullarında kültüre alınmıştır.

Plantform Biyoreaktör Sistemi ile Köklendirme Denemelerinin Kurulması

Mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkiler ile Plantform biyoreaktör sistemleri kullanılarak köklendirme denemesi kurulmuştur. Köklenme denemelerinde kullanılan besin ortamlarının içerisine katı ortam köklendirme denemelerinde en iyi sonuç veren bitki büyüme düzenleyici olarak belirlenen 1 mg/L NAA ve 30 g/L sakkaroz ilave edilmiştir. Plantform sistemi köklenme denemelerinde besin ortamlarının pH'sı 5.5'e ayarlanmıştır. Plantform biyoreaktör sistemi köklenme denemesinde, sıvı besi yeri içeren kültür kabına 500 mL besin ortamı eklenmiş ve 50 bitki konulmuştur. Plantform biyoreaktör sisteminde, daldırma süresi 4 saatte 10 dk ve havalandırma süresi 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Plantform sistemi köklenme denemelerinde, bitkiler 8 hafta süresince kültüre alınmıştır. Kültüre alınan eksplantlar 16 saat aydınlık 8 saat karanlık, 25±2 °C sıcaklık koşullarında gelişmeye bırakılmıştır.

Deneme Planı, İstatistik Analizleri ve İncelenen Kriterler

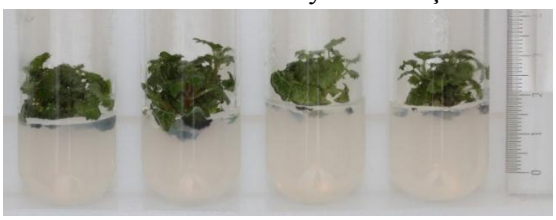
Beş farklı böğürtlen çeşidi ile kurulan denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, mikroçoğaltım ve köklendirilme denemelerinin tamamı 3 tekerrürlü olacak şekilde ve her tekerrürde 20 bitki kültüre alınarak gerçekleştirilmiştir. Katı kültür denemelerinde ortamlar her çeşit için ayrı ayrı kıyaslanmıştır. Yeni nesil doku kültürü sistemi olan Plantform geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile klasik doku kültürü tekniklerinin mikroçoğaltım ve köklendirme açısından karşılaştırmalı olarak ortaya konduğu bu çalışmada, çoğalma katsayısı, bitki boyu, kök uzunluğu ve kök sayısı parametreleri incelenmiştir. Katı kültür ortamı mikroçoğaltım ve köklenme denemelerinde gelişen bitkiler dört haftada bir alt kültüre alınmıştır. Mikroçoğaltım denemelerinde üç alt kültür işlemi uygulanmıştır. Her alt kültürde incelenen parametrelerin ortalamaları alınmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde ise bitkiler 8 hafta

kültüre alınmıştır. Mikroçoğaltım denemeleri sonucunda; bitki boyu (cm) ve kardeş sayısı (kardeş/bitki) parametrelerine ait gözlemler, köklenme denemelerinde ise; bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm) ve kök sayısı (adet), parametrelerine ait gözlemler alınmıştır. Çalışmanın katı kültür mikroçoğaltım ve köklendirme denemelerinde elde edilen veriler ile varyans analizleri gerçekleştirilmiştir. Önemli çıkan ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile belirlenmiştir. Ayrıca böğürtlen çeşitleri için optimum olarak belirlenen besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyici içeriğinde katı kültür ve Plantform sistemleri arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı t-testi analizi ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler, JMP 8.01 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

Mikroçoğaltım Denemelerine Ait Bulgular

Katı kültür (Şekil 2) ve Plantform biyoreaktör sisteminde (Şekil 3) mikroçoğaltım denemeleri yürütülmüştür.



Şekil 2. Katı kültür ortamında mikroçoğaltılan böğürtlenler.



Şekil 3. Platform sisteminde mikroçoğaltılan böğürtlenler.

Katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde kardeşlenme oranı ve bitki boyu parametreleri göz önüne alındığında tüm çeşitler için 1 mg/L BA içeren MS besin ortamı istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Fakat Chester çeşidi kardeşlenme katsayı açısından 2 mg/L BA içeren büyüme ortamında daha yüksek oranda gelişim gösterirken, bitki boyu açısından diğer çeşitlerle benzer sonuç vermiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Katı kültür mikroçoğaltım kardeşlenme ve bitki boyu gelişim oranları.

Kardeşlenme Katsayısı (kardeş/bitki)					
BBD (mg/L)	**Black Diamond**	**Black Pearl**	**Chester**	**New Berry**	**Triple Crown**
BA 1	**15,7a**	**10,4a**	10,2b	**24,3a**	**12,6a**
BA 1+GA_3 0.5	12,1b	**9,7a**	8,0bc	18,3b	8,6b
BA 2	11,4b	**9,2a**	**13,0a**	16,5b	8,2b
BA 2+GA_3 0.5	10,4b	**7,8a**	6,0c	15,5b	5,8b
Kontrol	1,1c	1,1b	1,0d	1,3c	1,0c
$LSD_{Black\ Diamond}$:0.076**, $LSD_{Black\ Pearl}$:0.037**, $LSD_{Chester}$:0.082*, $LSD_{New\ Berry}$: 0.024***, $LSD_{Triple\ Crown}$:0.420***					
Bitki Boyu (cm)					
BA 1	**2,4a**	**2,2a**	**2,2a**	**2,1a**	**2,4a**
BA 1+GA_3 0.5	1,8bc	1,8b	1,4c	1,7b	1,4c
BA 2	2,0b	1,9b	1,8b	1,6b	1,7b
BA 2+GA_3 0.5	1,7c	1,8b	1,4cd	1,7b	1,8b
Kontrol	1,4d	1,3c	1,2d	0,9c	0,9c
$LSD_{Black\ Diamond}$:0.039**, $LSD_{Black\ Pearl}$:0.057**, $LSD_{Chester}$:0.011*, $LSD_{New\ Berry}$:0.063*, $LSD_{Triple\ Crown}$:0.015**					

Bu sonuçlar doğrultusunda kardeşlenme ve bitki uzunluğu açısından en yüksek değere sahip olan 1 mg/L BA içeren MS besin ortamı ile Plantform biyoreaktör mikroçoğaltım denemesi kurulmuştur. Plantform biyoreaktör mikroçoğaltım denemesi sonrasında, katı kültür ile Plantform biyoreaktör sistemlerinde kültüre alınan eksplantların gelişimleri kardeşlenme katsayısı ve bitki boyu açısından karşılaştırılmıştır. Black Diamond, Chester, Triple Crown ve New Berry çeşitleri kardeşlenme katsayı açısından Plantform biyoreaktör sisteminde katı kültür sistemine göre daha yüksek başarı göstermiştir. Sistemler arasındaki bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Buna karşın Black Pearl çeşidinde kardeşlenme katsayısı açısından sistemler arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. Chester, Triple Crown ve New Berry çeşitleri bitki boyu açısından Plantform biyoreaktör sisteminde katı kültür sistemine göre daha yüksek başarı göstermiştir. Sistemler arasındaki bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Black Diamond ve Black Pearl çeşitleri ise bitki boyu açısından sistemler arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Katı kültür ve Plantform sistemindeki mikroçoğaltım denemelerine ait veriler.

Çeşitler	Sistem	Kardeşlenme Katsayısı (kardeş/bitki)	*P* Değeri	Bitki Boyu (cm)	*P* Değeri
Black Diamond	Katı Kültür	**15.7b**	0.001	**2.4**	0.07
	Plantform	**20.2a**		**2.8**	
Black Pearl	Katı Kültür	**10.4**	0.08	**2.2**	0.04
	Plantform	**11.3**		**3.6**	
Chester	Katı Kültür	**10.2b**	0.005	**2.2b**	0.044
	Plantform	**20.6a**		**3.0a**	
New Berry	Katı Kültür	**24.3b**	0.0043	**2.1b**	0.003
	Plantform	**30.3a**		**2.4a**	
Triple Crown	Katı Kültür	**12.6b**	0.05	**2.4b**	0.05
	Plantform	**19.8a**		**3.2a**	

Köklendirme Denemelerine Ait Bulgular

Katı kültür ve Plantform biyoreaktör sisteminde köklenen bitkiler, dış koşullara aktarılmadan önce bitkilerin bulunduğu kültür kapları kademeli olarak açılarak sera ortamı şartlarına alışmaları için laboratuvarda ön alıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Katı kültürde köklenen bitki kökleri, katılaştırıcı agardan uzaklaştırmak için su ile yıkanmıştır. Her iki sistemden elde edilen köklü bitkiler, sera koşullarında geliştirilmek üzere 1:1 oranda steril torf:perlit karışımı içeren viyollere aktarılmıştır. Bu aşamada bitki uzunluğu, kök uzunluğu ve kök sayısı parametreleri incelenmiştir. Katı kültür sisteminde köklenen bitkilerin %96'sı, Plantform sisteminde köklenen bitkilerin %99'u dış koşullarda hayatta kalmıştır.

Katı kültür ve Plantform biyoreaktör sisteminde köklendirme denemeleri yürütülmüştür. Katı kültür ve Plantform sistemi köklendirme denemelerinde tüm çeşitlere ait eksplantlar %100 oranda köklenmiştir. Ancak uygulamalar arasında kök uzunluğu, kök sayısı ve kalite bakımından farklılıklar tespit edilmiştir. Denemelerde kök sayısı, kök uzunluğu ve bitki boyu parametreleri göz önüne alındığında tüm çeşitler için 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamı istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 3). Bu sonuçlar doğrultusunda kök sayısı, kök uzunluğu ve bitki boyu açısından en yüksek değere sahip olan 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamı ile Plantform biyoreaktör köklendirme denemesi kurulmuştur. Plantform biyoreaktör köklendirme denemesi sonrasında, katı kültür ile Plantform biyoreaktör sistemlerinde kültüre alınan eksplantların gelişimleri kök sayısı, kök uzunluğu ve bitki boyu açısından karşılaştırılmıştır. Deneme sonucunda New Berry çeşidi dışında tüm çeşitler için Plantform biyoreaktör sistemi kök sayısı açısından katı kültüre göre istatistiksel olarak daha yüksek sonuç vermiştir. Chester, New Berry ve Triple Crown çeşitleri Plantform biyoreaktör sisteminde kök uzunluğu açısından katı kültüre göre daha iyi gelişim gösterirken, Black Diamond ve Black Pearl çeşitleri için istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir. Tüm

çeşitler için bitki boyu açısından Plantform biyoreaktör sisteminde katı kültür sistemine göre daha yüksek başarı göstermiştir. Sistemler arasındaki bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4). Ayrıca *in vitro* köklendirme çalışmaları sonrasında, Plantform sisteminde köklenen bitkilerde %100 oranda hayatta kalma başarısı görülerken, katı kültür ortamında köklenen bitkilerde %98 orada hayatta kalma başarısı elde edilmiştir.

Çizelge 3.Katı kültür köklendirme kök sayısı, kök uzunluğu ve bitki boyu gelişim oranları

Kök Sayısı (adet)					
BBD (mg/L)	**Black Diamond**	**Black Pearl**	**Chester**	**New Berry**	**Triple Crown**
IBA 0.5	4.3c	2.6d	4.9b	3.4b	2.8cd
NAA 0.5	4.9b	2.7d	3.8d	3.0b	3.2bc
IBA 1	3.8c	2.9cd	3.9cd	3.0b	3.1bcd
NAA 1	**5.6a**	**5.4a**	**6.3a**	**4.6a**	**4.1a**
IBA 2	4.2c	3.4bc	4.0cd	1.8c	3.3b
NAA 2	1.5d	2.8d	4.5bc	3.1b	3.1bcd
Control	1.9d	3.4b	3.1e	3.1b	2.7d
$LSD_{Black\ Diamond}$:0.048**, $LSD_{Black\ Pearl}$: 0.076**,$LSD_{Chester}$:0.032***,$LSD_{New\ Berry}$: 0.124*,$LSD_{Triple\ Crown}$: 0.30***					
Kök Uzunluğu (cm)					
IBA 0.5	2.7c	2.1b	1.7c	2.1cd	2.6b
NAA 0.5	1.8d	2.0b	2.1b	2.2bc	2.3c
IBA 1	2.3c	2.1b	1.9b	1.8e	2.2c
NAA 1	**4.7a**	**2.8a**	**2.9a**	**3.1a**	**3.1a**
IBA 2	1.0e	2.2b	2.1b	1.5f	2.0d
NAA 2	0.5e	2.1b	2.0b	2.2b	2.3c
Control	3.6b	2.1b	2.0b	2.0de	2.4bc
$LSD_{Black\ Diamond}$: 0.082***,$LSD_{Black\ Pearl}$: 0.025*,$LSD_{Chester}$: 0.048**,$LSD_{New\ Berry}$: 0.036**,$LSD_{Triple\ Crown}$:0.49**					
Bitki Boyu (cm)					
IBA 0.5	1.8d	2.6b	2.2bc	2.3bc	2.6b
NAA 0.5	2.0c	2.4bc	2.0c	2.2cb	2.4bc
IBA 1	3.0ab	3.2ab	2.4bc	2.8b	2.6b
NAA 1	**3.4a**	**3.5a**	**4.2a**	**3.6a**	**3.8a**
IBA 2	2.2bc	2.1c	2.4bc	1.8d	2.2cb
NAA 2	2.8b	3.1ab	2.8b	2.4bc	2.3bc
Control	1.4d	2.0c	2.0c	2.1c	1.7d
$LSD_{Black\ Diamond}$:0.46***, $LSD_{Black\ Pearl}$:0.86**, $LSD_{Chester}$:0.28***, $LSD_{New\ Berry}$:0.77***, $LSD_{Triple\ Crown}$:0.94**					

Çizelge 4. Katı kültür ve Plantform sistemindeki köklendirme denemelerine ait veriler

Çeşitler	**Sistem**	**Kök Sayısı (adet)**	**P Değeri**	**Kök Uzunluğu (cm)**	**P Değeri**	**Bitki Boyu (cm)**	**P Değeri**	**Köklenme Oranı (%)**
Black Diamond	Katı Kültür	**5.6b**		**4.7b**		**3.4b**		100
	Plantform	**10.6a**	0.0093	**5.2a**	0.09	**10.6a**	0,0015	100
Black Pearl	Katı Kültür	**5.4b**		**2.8b**		**3.5b**		100
	Plantform	**10.9a**	0.005	**3.6a**	0.06	**9.8a**	0,0023	100
Chester	Katı Kültür	**6.3b**		**2.9b**		**4.2b**		100
	Plantform	**12.7a**	0.0041	**4.2a**	0.032	**11.3a**	0,002	100
New Berry	Katı Kültür	**4.6**		**3.1b**		**3.6b**		100
	Plantform	**5.8**	0.09	**4.4a**	0.0036	**5.6a**	0,0016	100
Triple Crown	Katı Kültür	**4.1b**		**3.1b**		**3.8b**		100
	Plantform	**11.0a**	0.0022	**4.6a**	0.002	**11.4a**	0,003	100

Tartışma

Bitki doku kültürü çalışmalarında pek çok kültür bitkisi başarıyla çoğaltılabilmektedir. Klonal çoğaltım tekniklerinin başında gelen mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmalarında bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşidi ve konsantrasyonu, kullanılan besin ortamı, karbonhidrat kaynağı ve yoğunluğu gibi birçok faktör çoğalma ve köklenme başarısını etkilemektedir. Bu faktörlerin yanı sıra genetik yapının da etkisi vardır. Bu bağlamda böğürtlen mikroçoğaltım çalışmalarında farklı protokoller geliştirmek adına araştırmalar bulunmaktadır. Borodulina ve ark. (2019), böğürtlen klonal mikroçoğaltımı için BAP, IBA ve GA_3 içeren ve bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen ortamlarda eksplantları kültüre almışlardır. Çalışma neticesinde, 2 mg/L IBA içeren ½ kuvvette MS besin ortamında eksplantların %96 oranında köklendiğini, bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen ortamda köklenmenin görüldüğünü fakat gelişen köklerin morfolojik olarak zayıf ve kılcal kök oluşturmadığını belirtmişlerdir. Yaptığımız bu çalışmada ise 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamında hem katı kültürde hem de Plantform sisteminde eksplantların tamamında kök oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca Plantform sisteminde kültüre alınan eksplantlar, kök sayısı, kök uzunluğu ve bitki boyu açısından katı kültüre oranla önemli derecede başarılı bulunmuştur. Buna ek olarak, Plantform sisteminde köklenen bitkilerin dış koşullarda %100 oranda hayatta kalma başarısı Plantform sisteminin katı kültür sistemine göre oldukça başarılı olduğunun göstergesidir. Kefayeti ve ark. (2019), Chester böğürtlen çeşidinin *in vitro* çoğaltılması amacıyla yaptıkları çalışmada, böğürtlen sürgünlerini kullanarak bir mikroçoğaltım protokolü hazırlamışlardır. Yaptıkları çalışmada, BAP, NAA, IBA ve GA_3 kombinasyonu içeren Woody Plant Medium (WPM) besin ortamında eksplantları mikroçoğaltım ve köklendirme için kültüre almışlardır. Çalışma sonuçlarına göre, en yüksek kardeşlenme oranı 2,0 mg/L BAP + 0,2 mg/L IBA (9.66) ortamından elde etmişlerdir. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada kullandığımız çeşitlerden biri olan Chester çeşidine ait mikroçoğaltım verilerini incelediğimizde, hem katı kültür ortamında (10.2) hem de Plantform sisteminde (20.4 adet sürgün/eksplant) daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Buna ek olarak, beş farklı çeşit kullanarak yapılan bu çalışmada, genetik yapının mikroçoğaltım başarısını etkilediği söylenebilir. New Berry çeşidine ait kardeşlenme katsayıları göz önüne alındığında, katı kültür ortamında 24.3, Plantform sisteminde ise 30.3 oranda kardeşlenme başarısı sağlanmıştır. Çalışmada yer verilen diğer çeşitlerin mikroçoğaltım verilerinde de farklılıklar görülmüştür. Bu veriler doğrultusunda, genetik farklılık söz konusu olduğunda bile Plantform sistemi böğürtlen mikroçoğaltımında katı kültür ortamına göre çok daha başarılı olmaktadır.

Fathy ve ark. (2018), WPM, B5 ve MS besin ortamlarının böğürtlen için rejenerasyon başarını kıyasladıkları çalışmalarında, kardeşlenme oranı (1.83) ve bitki boyu (3.1 cm) bakımından MS besin ortamının WPM ve B5 ortamına göre oldukça başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında, 0.6 mg/L BA içeren MS besin ortamında birinci alt kültürde 3.4 oranda kardeşlenme elde ettiklerini belirtmişlerdir. Aynı ortam ve büyüme düzenleyici içeriğinin %100 oradan dış koşullarda hayatta kalma başarısı sağladığını bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise, mikroçoğaltım için ortaya koyulan bu protokol 1 mg/L BA içeren MS besin ortamının 10.4-24.3 oranları arasında kardeşlenme başarısı sağladığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, hazırlanan içeriğin böğürtlen mikroçoğaltımı için uygulanabilir bir protokol olduğunun göstergesidir. Kereša ve ark. (2019), Reuben böğürtlen çeşidinin mikroçoğaltımı ve köklendirilmesi için BAP, meta-Topolin ve IAA kombinasyonları ile farklı karbonhidrat kaynakları içeren besin ortamlarında eksplantları kültüre almışlardır. Çalışma sonunda, en yüksek kardeşlenme oranı (2.6) 1 mg/L BAP içeren ortamdan elde edilirken, en yüksek bitki boyu 0.3 mg/L meta-Topolin ve aynı orandaki BAP ortamından elde etmişlerdir. Köklendirmede ise en yüksek köklenme başarısı %61 oranla hormonsuz ortamdan elde edildiğini belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise, kardeşlenme katsayısı (24.3) ve bitki boyu (2.4 cm) parametreleri göz önüne alındığında 1 mg/L BA içeren MS besin ortamı mikroçoğaltım için en yüksek sonucu verirken, kök sayısı (6.3), kök uzunluğu (4.7 cm) ve bitki boyu (4.2 cm) parametleri incelendiğinde 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamı köklendirme başarısı açısından en etkili ortam içeriği olarak tespit edilmiştir.

Katı ortam ve Plantform sisteminde kültüre alınan tüm eksplantlarda %100 oranda köklenme başarısı görülmüştür. Bu sonuçlar, ortaya koyduğumuz köklendirme protokolünün böğürtlen köklendirilmesi için uygulanabilir bir ortam olduğunun göstergesidir.

Plantform biyoreaktör sistemi kullanılan besin ortamı, bitki büyüme düzenleyici içeriği, aydınlatma ve havalandırma periyotları gibi etkenler kültüre alınan bitkinin rejenerasyonu için farklılık göstermektedir. Arencibia ve ark. (2013), bir *Rubus* türündeki üç ahududu çeşidi için Plantfom geçici daldırma sisteminde mikroçaoğaltım çalışmaları yürütmüştür. Yapılan çalışmada bitki gelişimini teşvik etmek amacıyla sisteme CO_2 gübrelemesi yaparak, 15 ve 30 g/L sakkaroz içeren besin ortamlarında eksplantları kültüre almışlardır. Deneme sonuçlarına göre, CO_2 gübrelemesi yapılan ve 15 g/L sakkaroz içeren ortamda kültüre alınan bitkiler, bitki boyu, yaprak sayısı ve dış koşullara adaptasyon parametreleri açısından daha başarılı bulunmuştur. Ayrıca kültüre alınan bitkilerde klorofil oranında da artış gözlendiğini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada görüldüğü gibi, Plantform biyoreaktör sistemlerine CO_2 gübrelemesi yaparak ve farklı karbonhidrat kaynakları veya konsantrasyonları kullanarak rejenerasyon başarısını artırmak mümkün olabilmektedir.

Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde daldırma sürelerindeki farklılıklar, türe göre değişmekle birlikte, vitrifikasyon oluşumunu azaltmada etkili olabilmektedir. Bu bağlamda tıbbi bir bitki olan *Stevia rebaudiana* ile yapılan bir çalışmada Sacco ve ark. (2015), Plantform sisteminde rejenerasyon için farklı daldırma sürelerinde eksplantları kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda, 3 saatte bir daldırma süresinin kallus ve vitrifikasyon problemi meydana getirdiğini, 8 saatte bir daldırma süresinin ise daha kaliteli sürgün oluşumu sağladığını bildirmişlerdir. *Pinellia ternate* bitkisi ile yapılan bir çalışmada Zhang ve ark. (2017) Plantform biyoreaktör sisteminde 9 farklı daldırma döngüsünün mikroçoğaltım üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, 12 saatte bir 5 dakika daldırma süresinin kardeşlenme ve gelişimi açısından en başarılı döngü olduğunu belirtmişlerdir.

Geçici Daldırma Sistemleri, kültür bitkilerinin mikroçoğaltımı, sekonder metabolitlerin üretimi ve organogenesis çalışmalarında ortaya çıkan sorunların çözümü için klasik doku kültürü tekniklerine alternatif bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Bugün, benzer veya farklı teknolojik prensiplere dayanan çeşitli geçici daldırma sistemleri, bitkilerde doku ve organ kültürü çalışmalarında başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Geliştirilen geçici daldırma sistemleri arasında TIB, RITA, BIB, SETIS biyoreaktör ve Plantform sistemleri bulunmaktadır (Georgiev ve ark., 2014). Son yıllarda geliştirilen bu sistemler arasında Plantform biyoreaktör sistemi oldukça yoğun kullanım alanına sahip olmuş ve birçok araştırmacı tarafından farklı türdeki bitkiler için kullanılmıştır. Türkiye'de *Ceratonia siliqua* (Umarusman ve Aka Kaçar, 2018), turunçgil anaçları (Cengiz ve Aka Kaçar, 2019), *Prunus* anaçları (Hasan Ali Dagman, 2019), *Myrtus communis* (Aka Kaçar ve ark., 2020), *Spathiphyllum* (Aka Kaçar ve ark., 2020), *Pteridophyta* (Uğur ve Yalçın Mendi, 2020) ve dünyanın farklı yerlerinde bulunan doku kültürü laboratuvarlarında *Rubus idaeus* (Welander ve ark., 2014), *Myrtus communis* ve *Olea europaea* (Benelli ve ark., 2015), *Quercus robur* (Gatti ve ark., 2015), *Stevia rebaudiana* (Sacco ve ark., 2015), *Phalaenopsis* (Masnoddin ve ark., 2016), *Musa spp.* (Daungban ve ark., 2017), *Guadua angustifolia* (Gutiérrez ve ark., 2016), *Gerbera jamesonii* (Frómeta ve ark., 2017) gibi pek çok tür için Plantform biyoreaktör sistemi başarıyla kullanılmıştır. Plantform biyoreaktör sistemi ile yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, sistemin kullanılabilirliği, kapladığı alanın az olmasının yanında çok daha fazla sayıda eksplantın kültüre alınabilmesi, işçiliğin ve maliyetin daha az olması sebebiyle klasik katı kültür sistemine alternatif olabilecek başarılı bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sonuç

Yapılan bu çalışmada beş farklı böğürtlen çeşidi ile böğürtlen *in vitro* mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmaları için farklı bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları uygulanarak ideal bir protokol ortaya konmuştur. Optimum mikroçoğaltım ve köklendirme içeriğinin belirlenmesi sonrasında katı kültür ve yeni nesil doku kültürü tekniklerinden biri olan geçici

daldırma Plantform biyoreaktör sistemlerinin mikroçoğaltım ve köklendirme üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda Plantform sisteminin bitki gelişimi üzerinde çok daha yüksek oranda başarı sağladığı görülmüştür. Plantform biyoreaktör sistemi, sistemin ilk kurulumunda özel olarak geliştirilen kültür kapları, daldırma ve havalandırma sistemi ve bu sistemi periyodik olarak düzenleyen ekipmanlar açısından belirli maliyet gerektiriyor olsa da kitlesel üretime olanak sağlaması ve katı kültür sisteminde katılaştırıcı olarak kullanılan ve yüksek maliyete sahip olan agarın Plantform sisteminde kullanılmaması dolayısıyla maliyet açısından önemli bir avantaja sahiptir. Ayrıca Plantform sisteminde daldırma ve havalandırma düzeneğinin elektrik enerjine bağlı olması sebebiyle elektrik kesilme olasılığına karşı jeneratör sisteminin bulundurulması bu olası aksamaların önüne geçmek adına kullanılabilir. Gerçekleştirilen bu çalışma ile Plantform sistemin kullanılabilirliği, iş gücü ve zamandan tasarruf açısından da klasik katı kültür sistemine göre daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, Plantform biyoreaktör sisteminin büyük çaplı kitlesel üretimde başarılı bir şekilde uygulanabilir bir sistem olduğu ortaya konmuştur.

Kaynaklar

Aka Kaçar, Y., Biçen, B., Şimşek, Ö., Dönmez, D., Erol, M., 2020. Evaluation and comparison of a new type of temporary immersion system (TIS) bioreactors for myrtle (*Myrtus communis* L.). *Applied Ecology and Environmental Research,* 18(1):1611-1620.

Aka Kaçar, Y., Dönmez, D., Biçen, B., Erol, M.H., Şimsek, Ö., Yalçın Mendi, Y., 2020. Micropropagation of *Spathiphyllum* with temporary immersion bioreactor system. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 8*(5), 1195-1200.

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

Benelli, C., Fernanda, C.M., De Carlo, A., 2015. Plant Form, a temporary immersion system, for *in vitro* propagation of *Myrtus communis* and *Olea europaea*. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, San Remo, Italy, 19-24 April 2015.

Borodulina, I.D., Plaksina, T.V., Panasenko, V.N., Sokolova, G.G., 2019. Optimization of blackberry clonal micropropagation. *Ukrainian Journal of Ecology, 9*(3), 339-345.

Cengiz, M., Aka Kaçar, Y., 2019. Micropropagation of some citrus rootstocks with classical and new generation tissue culture techniques. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(9):1469-1478.

Daungban, S., Pumisutapon, P., Topoonyanont, N., 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 ımmersion bioreactor system. *Thai Journal of Science and Technology*, 6(1):89-99.

Etienne, H., Berthouly, M., 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,69.3: 215-231.

Etienne, H., Berthouly, M., 2006. Bioreactors in coffee micropropagation. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18.1: 45-54.

Fathy, H.M., Abou El-Leel, O.F., Amin, M.A., 2018. Micropropagation and biomass production of *Rubus fruticosus* L. (Blackberry) plant. *Middle East Journal of Applied Sciences, 8*(4), 1215-1228.

Frómeta, O.M., Morgado, M.M.E., Da Silva, J.A.T., Morgado, D.T.P., Gradaille, M.A.D., 2017.*In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129(3):543-551.

Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T., 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, *14*(6), 607-621.

Göktaş, A., 2011. Ahududu ve Böğürtlen Yetiştiriciliği. Meyvecilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü Yayınları, Yayın, No. 38.

Gutiérrez, L.G., López-Franco, R., Morales-Pinzón, T., 2016. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (*Poaceae*) using a temporary immersion system RITA®. *African Journal of Biotechnology*, 15(28):1503-1510.

Hasan Ali Dagman, F., 2019. Bazı meyve anaçlarının klasik doku kültürü ve yeni nesil geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile mikroçoğaltımı. (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Harris, R.E., Mason, E.B., 1983. Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. *Canadian Journal of Plant Science*, *63*(1), 311-316.

Kefayeti, S., Kafkas, E., Ercisli, S., 2019. Micropropagation of 'Chester thornless' blackberry cultivar using axillary bud explants. *Notulae Botanicae HortiAgrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 162-168.

Kereša, S., Habuš Jerčić, I., Batelja Lodeta, K., Barić, M., Pecina, M., Bošnjak Mihovilović, A., Zec, M., 2019. Influences of different types of sugar and cytokinin on micropropagation of blackberry cultivar 'Reuben'. *Glasnik Zaštite Bilja*, *42*(3), 14-21.

Masnoddin, M., Repin, R., Aziz, Z.A., 2016. Micropropagation of an endangered Borneo Orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* callus using temporary immersion bioreactor system. *Thai Agricultural Research Journal*, 34(2):161-171.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, *15*(3), 473-497.

Sacco, E., Mascarello, C., Pamato, M., Musso, V., Ruffoni, B., 2015. Evaluation of temporary immersion system for *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Acta Horticulturae*, 1083:327-333.

Uğur, S., Yalçın Mendi, Y., 2020. Türkiye'de doğal yayılış gösteren bazı eğrelti türlerinde gametofit evreden sporofit evreye geçiş sürecinin yeni nesil biyoreaktör sistemi ile araştırılması. *Alatarım*, 19(1), 42-48.

Umarusman, M.A., Aka Kaçar, Y., 2018. Farklı keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) genotiplerinin klasik ve yeni nesil doku kültürü teknikleriyle mikroçoğaltımı. *International Journal of Agricultural and Natural Sciences*, *11*(2), 37-44.

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

Zhang, B., Hu, Y., Jia, M., Jin, L., Xu, D., Chen, J., 2017. Micropropagation of *Pinellia ternata* (Thunb.) Berit. plantlets using temporary immersion bioreactors. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 11(1):59-65.