



## Micropropagation of Some Citrus Rootstocks with Classical and New Generation Tissue Culture Techniques

Melike Cengiz<sup>1,a,\*</sup>, Yıldız Aka Kaçar<sup>1,2,b</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Cukurova University, 01330 Adana, Turkey

<sup>2</sup>Biotechnology Research and Application Center, Cukurova University, 01330 Adana, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 24/07/2019 Accepted : 22/08/2019</p> <p>Keywords: Bioreactor System BAP NAA Tuzcu 31-31 sour orange C-35 citrange</p>	<p>In this study, micropropagation and rooting of ‘Tuzcu 31-31 sour orange’ and ‘C-35 citrange’ citrus rootstocks were conducted by comparing with Plantform temporary immersion bioreactor system and traditional solid culture. Murashige and Skoog Medium (MS) and Woody Plant Medium (WPM) supplemented with 6-Benzylaminopurine (BAP) (0, 1.0, 2.0 mg L<sup>-1</sup>), Kinetin (KIN) (0, 0.5, 1.0 mg L<sup>-1</sup>) and 2-Isopentenyl adenine (2IP) (0, 1.0, 2.0 mg L<sup>-1</sup>) were used in solid culture experiments. For solid culture rooting experiments, MS, ½ MS and WPM media supplemented with different concentrations of 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg L<sup>-1</sup>) and Indole-3-butyric acid (IBA) (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg L<sup>-1</sup>) were used. In both genotypes, the best micropropagation and rooting results were obtained from MS medium containing 2.0 mg L<sup>-1</sup> BAP and ½ MS nutrient medium containing 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA, respectively. Plantform bioreactor system was studied with the best medium content determined for micropropagation and rooting. As a result of the study, Plantform system gave better results in terms of plant quality in the micropropagation medium for both genotypes. Plantform system in rooting medium was found to be more advantageous than solid culture medium. As a result of the screening with SSR markers, it was determined that there was no somaclonal variation in the plants micropropagated and rooted in Plantform system.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(9): 1469-1478, 2019

## Bazı Turunçgil Anaçlarının Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Mikroçoğaltımı

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 24/07/2019 Kabul : 22/08/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: Biyoreaktör Sistem BAP NAA Tuzcu 31-31 turuncu C-35 sitranji</p>	<p>Çalışmada, ‘Tuzcu 31-31 turuncu’ ve ‘C-35 sitranji’ turunçgil anaçlarının, <i>in vitro</i>’da geleneksel katı kültür ve geçici daldırma prensibine dayanan Plantform biyoreaktör sistemi ile karşılaştırmalı olarak mikroçoğaltım ve köklendirme denemeleri yürütülmüştür. Turunçgil anaçlarının katı kültür mikroçoğaltım denemeleri için, Murashige ve Skoog (MS) ve Woody Plant (WPM) besin ortamları ile bitki büyüme düzenleyicilerden 6-Benzylaminopurine (BAP) (0; 1,0; 2,0 mg L<sup>-1</sup>), Kinetin (KIN) (0; 0,5; 1,0 mg L<sup>-1</sup>) ve 2-Isopentenyl adenine (2IP) (0; 1,0; 2,0 mg L<sup>-1</sup>) farklı konsantrasyonları denenmiştir. Katı kültür köklenme denemeleri için; MS, ½ MS, WPM besin ortamları ile 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L<sup>-1</sup>) ve Indole-3-butyric acid (IBA) (0; 0,5; 1,0; 2,0 mg L<sup>-1</sup>) bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları incelenmiştir. Her iki genotip içinde en iyi mikroçoğaltım sonuçları 2,0 mg L<sup>-1</sup> BAP içeren MS besin ortamından ve en iyi köklenme sonuçları 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA içeren ½ MS besin ortamından elde edilmiştir. Mikroçoğaltım ve köklenme için belirlenen en iyi besin ortamı içeriği ile Plantform biyoreaktör sisteminde çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, her iki genotipte de kardeşlenme ortamında, Plantform sistemi bitki kalitesi bakımından daha iyi sonuç vermiştir. Köklenme ortamında Plantform sistemi, katı kültür besin ortamına göre daha avantajlı bulunmuştur. SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda da, Plantform sisteminde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde, herhangi bir genetik açılımın olmadığı belirlenmiştir.</p>

<sup>a</sup> [melikecengiz011@gmail.com](mailto:melikecengiz011@gmail.com)

<sup>ib</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7887-618X>

<sup>b</sup> [yildizakacakar1@gmail.com](mailto:yildizakacakar1@gmail.com)

<sup>ib</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5314-7952>



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International License

## Giriş

Dünyada yetiştiriciliği yapılan en büyük meyve gruplarından birisi de turunçgillerdir. Anavatanı Güneydoğu Asya olmakla birlikte, turunçgiller ülkemizin de içinde bulunduğu geniş bir coğrafyaya dağılım göstermiştir (Tuzcu, 1998). Turunçgiller (*Citrus* spp.), yetiştiricilikte yaygın olarak aşı ile çoğaltılmaktadır. Bununla birlikte, küçük bitki dokularının kullanılabilirliği doku kültürü teknikleri klonal ve seri üretim için iyi bir araçtır (Gülşen ve Uzun, 2011). Doku kültüründe genellikle geleneksel katı ortam ile çalışılmakta olup, bu yöntem hem pahalı hem de yoğun işgücü gerektirmektedir. Ayrıca bitkilerde kalite üzerine olumsuz etkiler yapabilmektedir.

Biyoreaktörler, ticari mikroçoğaltım endüstrisinde kitlesel bitki üretimi için önemli araçlardır. Biyoreaktörler ya otomatik ya da yarı otomatik olarak tasarlanmış ve bitkilerin kültür ortamından çok miktarda besini kolayca alabildiği araçlardır (Etienne ve Berthouly 2002; Paek ve ark., 2005). Yeni bir sistem geliştirilmesi ile biyoreaktörlerde sıvı kültür sistemlerini kullanarak, daha uygun maliyetli mikroçoğaltımın gerçekleştirilmesi mümkün olmuştur (Welander ve ark., 2017). Geçici daldırma yöntemi, geleneksel yarı-katı ve sıvı besin ortamlarının avantajlı yönlerini kombine eden bir sistemdir. Geçici daldırma sistemlere dayalı biyoreaktörler (GDS), güncel anlamda kullanışlıdır. Biyoreaktörler içinde en yenilerinden biri olan Plantform™'un, mevcut alternatifler ile karşılaştırıldığında, birçok avantaja sahip olduğu belirlenmiştir (Welander ve ark., 2014; Gatti ve ark., 2015). Kullanımı kolay, şeffaf, otoklavlanabilir ve gaz değişimini zamanlayıcı ile kontrol edilebilir hava pompalarıyla en yeni biyoreaktörlerdendir.

Plantform sistemi kapların içerisinde havalanmasını sağlaması ve beraberinde çoğu zaman katı kültürde meydana gelen ve morfogenez olumsuz yönde etkileyen karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve etilen birikmesini önlerken, kültür atmosferinin tamamen yenilenmesini sağlar (Roels ve ark., 2006). Ayrıca daha büyük kültür kabı kullanıldığı için altkültür süresi daha uzundur. Katı besin ortamında kültüre alma işlemi daha özen ve dikkat istemekle birlikte, sıvı besin ortamda bu işlem daha kolay ve çabuk olur ve böylece işgücünden de tasarruf edilir. Hava sirkülasyonu sonucunda oluşan baloncuklar sayesinde hücre bölünmesi teşvik edilir ve bu yolla hem çoğalma katsayısı hem de sürgün kalitesinde artış olur.

Bitki doku kültüründe bazı durumlarda, somaklonal varyasyon olarak adlandırılan, bazı genetik değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu durum, vejetatif çoğaltımda istenmeyen bir durumdur. Plantform geçici daldırma sistemleri ile kültür sürelerinin daha kısa tutulması ve altkültür sayılarının daha az indirilmesi ile bu risk azaltılmaktadır (Biçen ve ark., 2017).

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

## Materyal ve Metot

### Materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak Tuzcu 31-31 turuncu (*Citrus aurantium* L.) ve C-35 sitranjı (*Citrus sinensis* Osb. 'Ruby' x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) olmak üzere iki farklı turunçgil anacı kullanılmıştır.

### Tohumların Sterilizasyonu

Turunçgil anaçlarına ait tohumlar, çeşme suyu altında yıkanmıştır. Tohumlar steril kabin içerisinde önce %70'lik alkolde 15 dk, ardından, %10'luk sodyumhipoklorit + 1-2 damla Tween 20 çözeltisinde 15 dk bekletilmiştir. Daha sonra 3 kez steril saf su ile durulanmıştır.

### Katı Kültür Mikroçoğaltım ve Köklenme Denemelerinin Kurulması

Anaçlara ait tohumlar *in vitro* koşullarda hormonsuz MS besin ortamında çimlendirildikten sonra, bitkilerin sürgün ucu ve nodları MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve WPM (Lloyd ve McCown, 1980) besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Mikroçoğaltım denemelerinde bitki büyüme düzenleyicilerinden (BBD); BAP (0; 1; 2 mg L<sup>-1</sup>), KIN (0; 0,5; 1 mg L<sup>-1</sup>) ve 2IP (0; 1; 2 mg L<sup>-1</sup>)'in farklı konsantrasyonları denenmiş ve 10 bitki kültüre alınmıştır. Köklenme denemesinde, IBA ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarını (0; 0,5; 1, 2 mg L<sup>-1</sup>) içeren WP/MS ve ½ MS besin ortamları kullanılmıştır. Sekiz hafta sonunda, köklenen bitkiler alıştırma seralarına alınmıştır.

### Plantform Biyoreaktör Sistemi ile Mikroçoğaltım ve Köklenme Denemesinin Kurulması

Katı kültür mikroçoğaltım denemesi sonucunda elde edilen en iyi çoğalmayı sağlayan besin ortamı ile Plantform biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım denemesi kurulmuştur. Plantform biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemesinde, her kültür kabına 500 ml besin ortamı eklenmiş ve 100-150 bitki kültüre alınmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Bitkilerin kültür kaplarına transfer edilmesinden 6-8 hafta sonra, altkültür işlemi gerçekleştirilmiştir. Katı kültür köklendirme denemesinden elde edilen en iyi köklenmeyi sağlayan besin ortamı içeriği ile Plantform biyoreaktör sistemi köklendirme denemesi kurulmuştur. Bitkiler, Plantform sistemine transfer edilmesinden 8 hafta sonra, alıştırma seralarına alınmıştır.

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

Çalışma kapsamında katı kültür ve Plantform biyoreaktör sisteminde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik varyasyon olup olmadığı, başlangıç materyali ile karşılaştırma sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla katı kültür mikroçoğaltım denemesinde 3 altkültür sonunda elde edilen bitkilerden, Plantform biyoreaktör sistemi ile mikroçoğaltım ve köklenme denemeleri sonucunda çoğaltılan bitkilerden ve köklendirilen bitkilerden olmak üzere üç farklı dönemde yaprak örnekleri alınmıştır. Genetik kararlılığın belirlenmesi amacıyla, turunçgiller için geliştirilmiş olan SSR (Simple Sequence Repeats) markırları kullanılmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, kullanılan her genotip için ayrı ayrı olmak üzere başlangıç materyalinden, katı kültür mikroçoğaltım denemesinde elde edilen bitkilerden ve Plantform biyoreaktör sistemi ile mikroçoğaltım denemeleri sonucunda çoğaltılan bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan yaprak örnekleri -196°C'de sıvı azota daldırılıp -80°C'de muhafaza edilmiştir. Genetik kararlılığın belirlenmesi amacıyla SSR markırları kullanılmıştır.

#### SSR Analizleri

DNA izolasyonu için her genotipten alınan bitkisel materyallere ait yapraklar, Tissue-Lyser cihazı (Invitrogen-GT) ile öğütülmüştür. DNA izolasyonu CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromide) yöntemi takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Şimşek ve ark., 2008). Çalışmada PCR (Polymerase Chain Reaction) reaksiyonu için turuncgil genotiplerinde kullanılan ve daha önce polimorfik sonuçlar verdiği bildirilen toplam 21 farklı SSR primeri kullanılmıştır (Aka Kaçar, 2007).

Bitkisel materyallerden izole edilen DNA'lar seyreltilerek sentetik olarak hazırlanmış SSR primerleri ve tüm reaksiyon komponentleri eklenerek "Thermal cycler" içerisine yerleştirilmiştir. PCR reaksiyonu toplam 20 µl (25 ng DNA, 2X PCR master mix, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µmol primer (ileri+geri), 0,8 ünite Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimeraz, 5µl ddH<sub>2</sub>O) olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR amplifikasyonu; ilk denatürasyon aşaması 3 dk 95°C, daha sonra 1 dk 95°C, 1 dk 55°C, 1 dk 72°C (35 döngü) ve 5 dk 72°C son polimerizasyon olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

#### Li-Cor Poliakrilamide Jel Hazırlığı ve Elektroferez Koşulları

PCR ürünlerini görüntülenmek amacıyla, %6,5 poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra aparat, Li-Cor Elektroferez cihazına yerleştirilmiştir. Cihazda çalışma değerleri; 1000 V, 35 mA, 25 W 45°C'de yaklaşık 30 dk ön ısıtma yapılarak, ardından eşit miktarda formamide yükleme solüsyonu eklenmiş ve PCR'da 95°C'de 4 dk denatüre edilerek, örneklerden 1 µl jelle pipet yardımıyla yüklenmiştir. Daha sonra cihaz çalışma şartları olan 1500 V, 35 mA, 50 W 48°C'de 1,5 saat koşurulmuştur.

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

Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı turuncgil anaçlarının katı kültürlerde mikroçoğaltımı ve köklendirilmesi amacıyla kurulan denemelerin tamamı, 3 tekerrürlü olacak şekilde, faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Çalışmada elde edilen yüzde değerlere açı transformasyonu uygulanmış ve veriler ile varyans analizleri gerçekleştirilmiştir. Önemli çıkan ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile belirlenmiştir. Ayrıca her iki genotip için Plantform ve katı kültür sonuçları açısından anlamlı bir farklılık olup olmadığının tespiti, bağımsız t-testi analizi ile gerçekleştirilmiştir. İstatistik analizler JMP programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### Bulgular

Çalışmada Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjının mikroçoğaltımı ve köklendirilmesi olanakları, katı kültür ve plantform sistemlerinde karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. İlk olarak her iki genotipte farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak, her genotip için optimum çoğalma ve köklendirme ortamları tespit edilmiştir. Ardından belirlenen en iyi ortamlarla plantform geçici daldırma biyoreaktör sistemleri ile denemeler kurulmuştur.

#### Tuzcu 31-31 Turuncuna Ait Mikroçoğaltım Bulguları

Tuzcu 31-31 turuncu ile BAP, KIN ve 2IP'nin farklı konsantrasyonlarını içeren MS ve WPM ortamlarında, mikroçoğaltım denemeleri yürütülmüştür. Deneme sonucunda elde edilen bitki boyu (cm) ve kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitki) Çizelge 1'de sunulmuştur.

En yüksek bitki boyunun 3,16 cm ile 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN eklenmiş WPM besin ortamında elde edildiği görülmektedir. Bitki büyüme düzenleyici içermeyen kontrol grubu (2,15 cm) ve KIN'in 0,5 mg L<sup>-1</sup> (2,11 cm) ve 1 mg L<sup>-1</sup> (2,13 cm) konsantrasyonları arasında, istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre, besin ortamı×BBD interaksyonunun, istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin, BBD tipi/konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 1 Tuzcu 31-31 turuncunun katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyuna (cm) kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitki) ait veriler

Table 1 Data on plant height (cm) micropropagation coefficient (micro cuttings/plant) in the solid culture micropropagation experiment of Tuzcu 31-31 sour orange

BBD	BBD Konsantrasyon u (mg L <sup>-1</sup> )	MS Besin Ortamı		WPM Besin Ortamı		BBD Ortalaması	
		Bitki boyu	Kardeşlenme katsayısı	Bitki boyu	Kardeşlenme katsayısı	Bitki boyu	Kardeşlenme katsayısı
BAP	1	0,80 <sup>e</sup>	2,3 <sup>bc</sup>	1,1 <sup>de</sup>	2,4 <sup>ab</sup>	0,95 <sup>C</sup>	2,4 <sup>A</sup>
	2	1,0d <sup>e</sup>	3,4 <sup>a</sup>	1,60 <sup>bcd</sup>	2 <sup>bcd</sup>	1,30 <sup>BC</sup>	2,7 <sup>A</sup>
2IP	1	1,20 <sup>cde</sup>	1,8 <sup>bcd</sup>	1,66 <sup>bcd</sup>	0,7 <sup>fg</sup>	1,43 <sup>BC</sup>	1,3 <sup>BC</sup>
	2	1,23 <sup>cde</sup>	1,2 <sup>defg</sup>	1,80 <sup>bc</sup>	0,8 <sup>fg</sup>	1,51 <sup>B</sup>	1,01 <sup>BC</sup>
KIN	0,5	1,33 <sup>cde</sup>	1,2 <sup>defg</sup>	2,90 <sup>a</sup>	0,8 <sup>fg</sup>	2,11 <sup>A</sup>	1,05 <sup>BC</sup>
	1	1,1d <sup>e</sup>	0,4 <sup>g</sup>	3,16 <sup>a</sup>	0,9 <sup>efg</sup>	2,13 <sup>A</sup>	0,66 <sup>C</sup>
Kontrol	0	2,2 <sup>b</sup>	1,4 <sup>def</sup>	2,1 <sup>b</sup>	1,4 <sup>cdef</sup>	2,15 <sup>A</sup>	1,4 <sup>B</sup>
Ortam Ortalaması		1,38 <sup>B</sup>	1,66 <sup>A</sup>	2,05 <sup>A</sup>	1,33 <sup>A</sup>	-	-

Bitki boyu: LSD<sub>Ortam</sub>: 0,24\*\*\*, LSD<sub>BBD</sub>: 0,48\*\*\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: 0,68\*\*\*, Kardeşlenme katsayısı: LSD<sub>Ortam</sub>: Ö.D. LSD<sub>BBD</sub>: 0,67\*\*\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: Ö.D. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001

Çizelge 2 C-35 sitranjı katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyuna (cm) ve kardeşlenme katsayılarına (kardeş/bitki) ait veriler

Table 2 Data on plant height (cm) micropropagation coefficient (micro cuttings/plant) in the solid culture micropropagation experiment of C-35 citrange

BBD	BBD Konsantrasyonu (mg L <sup>-1</sup> )	MS Besin Ortamı		WPM Besin Ortamı		BBD Ortalaması	
		Bitki boyu	Kardeşlenme katsayısı	Bitki boyu	Kardeşlenme katsayısı	Bitki boyu	Kardeşlenme katsayısı
BAP	1	2,13 <sup>d</sup>	8,53 <sup>ab</sup>	2,96 <sup>bcd</sup>	5,56 <sup>bc</sup>	2,55 <sup>BC</sup>	7,05 <sup>B</sup>
	2	2,10 <sup>d</sup>	13,40 <sup>a</sup>	3,46 <sup>abc</sup>	10,80 <sup>ab</sup>	2,78 <sup>BC</sup>	12,10 <sup>A</sup>
2IP	1	2,60 <sup>cd</sup>	1,46 <sup>c</sup>	4,10 <sup>ab</sup>	1,36 <sup>c</sup>	3,35 <sup>AB</sup>	1,41 <sup>C</sup>
	2	3,03 <sup>bcd</sup>	2,23 <sup>c</sup>	4,30 <sup>a</sup>	1,63 <sup>c</sup>	3,66 <sup>A</sup>	1,93 <sup>C</sup>
KIN	0,5	3,36 <sup>abc</sup>	0,80 <sup>c</sup>	4,46 <sup>a</sup>	1,36 <sup>c</sup>	3,91 <sup>A</sup>	1,08 <sup>C</sup>
	1	1,90 <sup>d</sup>	0,83 <sup>c</sup>	4,33 <sup>a</sup>	1,70 <sup>c</sup>	3,11 <sup>ABC</sup>	1,26 <sup>C</sup>
Kontrol	0	2,50 <sup>cd</sup>	0,40 <sup>c</sup>	2,43 <sup>cd</sup>	0,36 <sup>c</sup>	2,46 <sup>C</sup>	0,38 <sup>C</sup>
Ortam Ortalaması		2,51 <sup>B</sup>	3,95 <sup>A</sup>	3,72 <sup>A</sup>	3,25 <sup>A</sup>	-	-

Bitki boyu: LSD<sub>Ortam</sub>: 0,46\*\*\*, LSD<sub>BBD</sub>: 0,86\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: Ö.D., Kardeşlenme katsayısı: LSD<sub>Ortam</sub>: Ö.D. LSD<sub>BBD</sub>: 4,27\*\*\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: Ö.D., \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001

Kardeşlenme katsayısı sonuçları incelendiğinde, araştırmada kullanılan besin ortamlarından MS (1,66 kardeş/bitki) besin ortamının, WPM (1,33 kardeş/bitki) ortamına göre istatistiksel olarak farklı olmamasına rağmen, ortalamasının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. BBD'ler arasında istatistiksel fark bulunması, besin ortamlarının kardeşlenme üzerindeki etkisinin BBD tipi/konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Çalışmada en yüksek kardeşlenme katsayısı 3,4 kardeş/bitki ile 2 mg L<sup>-1</sup> BAP eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Bu oranı 2,4 kardeş/bitki ile 1 mg L<sup>-1</sup> BAP eklenmiş WPM besin ortamı izlemiş, ancak bu iki ortam arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir.

#### C-35 Sitranjına Ait Mikroçoğaltım Bulguları

C-35 sitranjı ile diğer genotipte olduğu gibi BAP, KIN ve 2IP'in farklı konsantrasyonlarını içeren MS ve WPM ortamlarında, mikroçoğaltım denemeleri yürütülmüştür. Deneme sonucunda elde edilen bitki boyu (cm) ve kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitki) Çizelge 2'de sunulmuştur.

C-35 sitranjının katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde, en yüksek bitki boyu 4,46 cm ile 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN içeren WPM besin ortamından elde edilmiştir. Bunu sırasıyla 4,33 cm ile 1 mg L<sup>-1</sup> KIN ve 4,30 cm ile 2 mg L<sup>-1</sup> 2İP eklenmiş WPM besin ortamları izlemiştir. Çalışmada, 0,5 mg L<sup>-1</sup> KIN (4,46 cm) ve 1 mg L<sup>-1</sup> KIN (4,33 cm) eklenmiş WPM besin ortamları ile 2 mg L<sup>-1</sup> 2IP (4,30 cm) eklenmiş WPM besin ortamları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Bitki boyu açısından çalışmada kullanılan besin ortamları değerlendirildiğinde, WPM (3,72 cm) besin ortamı, MS (2,51 cm) besin ortamına göre daha başarılı bulunmuştur.

WPM ve MS besin ortamları ortalamaları arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Besin ortamları arasında istatistiksel olarak önemli farklılık olmamasına rağmen, MS besin ortamındaki kardeşlenme katsayısının (3,95 kardeş/bitki) WPM besin ortamındaki kardeşlenme sayısından (3,25 kardeş/bitki) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada en yüksek kardeşlenme katsayısı 13,4 kardeş/bitki ile 2 mg L<sup>-1</sup> BAP içeren MS besin ortamında elde edilmiştir. Bu oranı, 10,8 kardeş/bitki ile 1 mg L<sup>-1</sup> BAP ilave edilmiş WPM besin ortamı takip etmiştir. C-35 sitranjı katı kültür mikroçoğaltım denemesi kardeşlenme katsayısı parametresi istatistiksel analiz sonuçlarına göre; kontrol ortamı, 0,5 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup> KIN,

1 mg L<sup>-1</sup> ve 2 mg L<sup>-1</sup> 2IP BBD konsantrasyonlarının MS ve WPM besin ortamları ile interaksiyonları arasındaki fark önemsiz olmuş ve en düşük kardeşlenme katsayıları bu interaksiyonlardan elde edilmiştir.

#### Tuzcu 31-31 Turuncuna Ait Köklenme Bulguları

Tuzcu 31-31 turuncu ile NAA ve IBA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren MS, ½ MS ve WPM ortamlarında, köklendirme denemeleri yürütülmüştür. Deneme sonucunda elde edilen kök sayısı (kök/bitki), kök uzunluğu (cm), bitki boyu (cm) ve köklenme oranı (%) Çizelge 3'de sunulmuştur.

Kök sayısı sonuçları incelendiğinde, en başarılı sonuç 3,09 (kök/bitki) ile ½ MS besin ortamından elde edilmiştir. Çalışmada, MS (2,44 adet) ve WPM (2,04 adet) besin ortamları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılık bulunmamıştır. Tuzcu 31-31 turuncunda, katı kültür kök sayısında, en başarılı BBD tipi/konsantrasyonu 2 mg L<sup>-1</sup> NAA (4,62 kök/bitki) olarak tespit edilmiştir. Besin ortamı×BBD tipi/konsantrasyon interaksiyonunda; 2 mg L<sup>-1</sup> NAA içeren ½MS besin ortamı (6,43 kök/bitki), en başarılı bulunmuştur. Kök uzunluğu sonuçlarında en başarılı BBD tipi ve konsantrasyonu 1 mg L<sup>-1</sup> (7,7 cm) ve 2 mg L<sup>-1</sup> (7,63 cm) IBA olarak tespit edilmiştir. Bunu, 0,5 mg L<sup>-1</sup> IBA (7,38 cm) konsantrasyonu takip etmiş, 0,5 mg L<sup>-1</sup> (5,96 cm), 1 mg L<sup>-1</sup> (5,85 cm) ve 2 mg L<sup>-1</sup> (3,21 cm) NAA ise istatistiksel açıdan en düşük BBD tipi/konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi bitki boyu (cm) sonuçları değerlendirildiğinde, besin ortamı, BBD ve besin ortamı×BBD interaksiyonu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Bitki boyu için WPM besin ortamı (2,98 cm) en başarılı ortam, 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA (2,73) en başarılı bitki büyüme düzenleyici ve besin ortamı×BBD interaksiyonunda ise (3,60 cm) 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA içeren WPM besin ortamı en başarılı sonucu vermiştir. Köklenme oranları incelendiğinde ise en başarılı ortam ½ MS (%92) iken, MS (%70) ve WPM (%61) besin ortamları onu takip etmiştir. En başarılı BBD %100 köklenme oranı ile 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA olmuştur. Bunu, 1 mg L<sup>-1</sup> NAA (%87) takip etmiştir. Besin ortamı×BBD interaksiyonuna baktığımızda, 1 mg L<sup>-1</sup> NAA içeren ½ MS besin ortamı, 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA içeren WPM ve MS besin ortamları, 1 mg L<sup>-1</sup> IBA içeren MS ve ½ MS besin ortamları ve 0,5 mg L<sup>-1</sup> IBA ile 2 mg L<sup>-1</sup> IBA içeren ½ MS besin ortamında da %100 köklenme elde edilmiştir.

Çizelge 3 Tuzcu 31-31 turuncunun katı kültür köklendirme denemesinde kök sayısı, kök uzunluğu (cm), bitki boyu (cm) ve köklenme oranına (%) ait veriler

Table 3 Data on number of roots, root length (cm), plant height (cm) and rooting rate (%) in the solid culture rooting experiment of Tuzcu 31-31 sour orange

BBD	BBD Konsantrasyonu (mg L <sup>-1</sup> )	MS Besin Ortamı	WPM Besin Ortamı	½ MS Besin Ortamı	BBD Ortalaması
<b>Kök Sayısı (kök/bitki)</b>					
NAA	0,5	3,4 <sup>de</sup>	3,6 <sup>cd</sup>	3,1 <sup>def</sup>	3,40 <sup>B</sup>
	1	3,6 <sup>cd</sup>	3,1 <sup>def</sup>	5,0 <sup>bc</sup>	3,90 <sup>AB</sup>
	2	5,16 <sup>ab</sup>	2,26 <sup>defg</sup>	6,43 <sup>a</sup>	4,62 <sup>A</sup>
IBA	0,5	1,1 <sup>gh</sup>	1,0 <sup>gh</sup>	1,96 <sup>fgh</sup>	1,35 <sup>C</sup>
	1	1,33 <sup>gh</sup>	1,93 <sup>fgh</sup>	1,73 <sup>fgh</sup>	1,66 <sup>C</sup>
	2	1,66 <sup>gh</sup>	1,33 <sup>gh</sup>	2,06 <sup>efgh</sup>	1,68 <sup>C</sup>
Kontrol	0	0,66 <sup>h</sup>	1,0 <sup>gh</sup>	1,33 <sup>gh</sup>	1,0 <sup>C</sup>
Ortam Ortalaması		2,41 <sup>B</sup>	2,04 <sup>B</sup>	3,09 <sup>A</sup>	-
<b>Kök Uzunluğu (cm)</b>					
NAA	0,5	5,16 <sup>defgh</sup>	6,70 <sup>abcdef</sup>	6,03 <sup>cdefg</sup>	5,96 <sup>BC</sup>
	1	6,26 <sup>bcdef</sup>	6,63 <sup>abcdef</sup>	4,6 <sup>efgh</sup>	5,85 <sup>C</sup>
	2	3,33 <sup>h</sup>	3,66 <sup>gh</sup>	2,6 <sup>h</sup>	3,21 <sup>D</sup>
IBA	0,5	8,80 <sup>ab</sup>	6,06 <sup>cdefg</sup>	7,30 <sup>abcd</sup>	7,38 <sup>AB</sup>
	1	8,86 <sup>a</sup>	6,60 <sup>abcdef</sup>	7,63 <sup>abcd</sup>	7,7 <sup>A</sup>
	2	7,86 <sup>abc</sup>	7,26 <sup>abcd</sup>	7,76 <sup>abc</sup>	7,63 <sup>A</sup>
Kontrol	0	3,66 <sup>gh</sup>	4,23 <sup>fgh</sup>	7,03 <sup>abcde</sup>	4,97 <sup>C</sup>
Ortam Ortalaması		6,28 <sup>A</sup>	5,88 <sup>A</sup>	6,15 <sup>A</sup>	-
<b>Bitki Boyu (cm)</b>					
NAA	0,5	2,86 <sup>abcd</sup>	3,60 <sup>a</sup>	1,73 <sup>efgh</sup>	2,73 <sup>A</sup>
	1	2,86 <sup>abcd</sup>	3,43 <sup>ab</sup>	1,23 <sup>h</sup>	2,51 <sup>AB</sup>
	2	1,50 <sup>gh</sup>	2,36 <sup>cdef</sup>	1,03 <sup>h</sup>	1,63 <sup>C</sup>
IBA	0,5	1,60 <sup>fgh</sup>	2,73 <sup>bcd</sup>	2,16 <sup>defg</sup>	2,16 <sup>B</sup>
	1	2,16 <sup>defg</sup>	2,66 <sup>bcd</sup>	2,46 <sup>cde</sup>	2,43 <sup>AB</sup>
	2	1,83 <sup>efgh</sup>	2,90 <sup>abcd</sup>	1,53 <sup>gh</sup>	2,08 <sup>BC</sup>
Kontrol	0	2,10 <sup>defg</sup>	3,16 <sup>abc</sup>	1,73 <sup>efgh</sup>	2,33 <sup>AB</sup>
Ortam Ortalaması		2,13 <sup>B</sup>	2,98 <sup>A</sup>	1,70 <sup>C</sup>	-
<b>Köklenme Oranı (%)</b>					
NAA	0,5	100(90) <sup>a</sup>	100(90) <sup>a</sup>	100(90) <sup>a</sup>	100 (90) <sup>A</sup>
	1	70(57,78) <sup>c</sup>	91,66(80) <sup>a</sup>	100(90) <sup>a</sup>	87,22 (75,92) <sup>B</sup>
	2	40(38,85) <sup>d</sup>	91,66(80) <sup>a</sup>	70(57,78) <sup>c</sup>	67,22 (58,88) <sup>C</sup>
IBA	0,5	70(57,78) <sup>c</sup>	30(33,21) <sup>de</sup>	100(90) <sup>a</sup>	66,66 (60,33) <sup>C</sup>
	1	100(90) <sup>a</sup>	70(57,78) <sup>c</sup>	100(90) <sup>a</sup>	90 (79,26) <sup>AB</sup>
	2	90(75) <sup>ab</sup>	30(33,0) <sup>de</sup>	100(90) <sup>a</sup>	73,33 (66,00) <sup>C</sup>
Kontrol	0	20(21,93) <sup>e</sup>	20(26,56) <sup>de</sup>	80(63,43) <sup>bc</sup>	40 (37,31) <sup>D</sup>
Ortam Ortalaması		70 (61,62) <sup>B</sup>	61,90(57,22) <sup>C</sup>	92,85(81,60) <sup>A</sup>	-

Kök sayısı: LSD<sub>Ortam</sub>: 0,53\*\*, LSD<sub>BBD</sub>: 0,81\*\*\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: 1,41\*\*, Kök uzunluğu: LSD<sub>Ortam</sub>: Ö.D., LSD<sub>BBD</sub>: 1,47\*\*\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: Ö.D., Bitki boyu: LSD<sub>Ortam</sub>: 0,30\*\*\*, LSD<sub>BBD</sub>: 0,46\*\*\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: 0,80\*, Köklenme oranı: LSD<sub>Ortam</sub>: 6,20\*\*\*, LSD<sub>BBD</sub>: 9,47\*\*\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: 16,40\*\*\*, \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, Parantez içinde verilen değerler açılı transformasyonu ile elde edilmiştir.

### C-35 Sitrancına Ait Köklenme Bulguları

C-35 sitrancında da, diğer turuncgil genotipinde olduğu gibi NAA ve IBA'nın farklı konsantrasyonlarını içeren MS, ½ MS ve WPM ortamlarında köklendirme denemeleri yürütülmüştür. Deneme sonucunda elde edilen kök sayısı, kök uzunluğu (cm), bitki boyu (cm) ve köklenme oranı (%) Çizelge 4'de sunulmuştur.

C-35 sitranjı katı kültür köklendirme denemesi kök sayıları (kök/bitki) incelendiğinde, en başarılı besin ortamının 2,82 adet kök sayısı ile ½ MS besin ortamı olduğu tespit edilmiştir. ½ MS besin ortamını, WPM (2,26 adet) ve MS (1,88 kök/bitki) besin ortamları takip etmiştir. En iyi BBD tipi/konsantrasyonu 2 mg L<sup>-1</sup> (4,67 kök/bitki), 1 mg L<sup>-1</sup> (4,28 kök/bitki) ve 0,5 mg/L (4,08 kök/bitki) NAA olarak belirlenmiştir. Besin ortamı×BBD tipi/konsantrasyon interaksyonuna bakıldığında en başarılı kombinasyon 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA içeren ½ MS besin ortamı (6,60 kök/bitki)

olmuştur. Kök uzunluğu (cm) sonuçlarına göre, ortalaması en yüksek BBD 1 mg L<sup>-1</sup> NAA (1,88 cm), besin ortamı ortalaması en yüksek WPM besin ortamı (1,59 cm) ve besin ortamı×BBD tipi/konsantrasyonu interaksyonunda en yüksek kök uzunluğu 1 mg L<sup>-1</sup> NAA (3,16 cm) içeren WPM besin ortamından elde edilmiştir. Bitki boyu (cm) açısından en başarılı ortam MS (2,75 cm) iken, MS besin ortamını sırasıyla WPM (2,45 cm) ve ½ MS (2,30 cm) besin ortamları izlemiştir. En başarılı BBD tipi/konsantrasyonu, 3,04 cm bitki boyu uzunluğu ile 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA olarak belirlenmiştir.

Besin ortamı×BBD interaksyonunda, bitki boyu açısından en başarılı BBD tipi/konsantrasyonu, 3,5 cm ile 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA içeren MS besin ortamı olmuştur. En kısa bitki boyu, 1,4 cm ile 2 mg L<sup>-1</sup> IBA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Köklenme oranı (%) sonuçlarında en başarılı ortam, ½ MS (%52) ve WPM (%51) olmuştur. MS besin

ortamı, %37 ile en az köklenme oranına sahip olmuştur. En başarılı BBD %73 ile 1 mg L<sup>-1</sup> NAA olarak belirlenmiş, 1 mg L<sup>-1</sup> NAA'yı %54 ile 2 mg L<sup>-1</sup> NAA takip etmiştir. İstatistiksel açıdan en başarısız köklenme oranı, kontrol ortamında (%30) görülmüştür. Besin ortamı×BBD interaksyonuna baktığımızda, 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA içeren ½ MS besin ortamında %100 köklenme elde edilmiştir.

*Plantform Mikroçoğaltım Denemesine Ait Bulgular*  
Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı anaçlarının, katı kültür mikroçoğaltım sonucu ile Plantform sistemi mikroçoğaltım sonucuna ait veriler, Çizelge 5'de sunulmuştur.

Çizelge 4 C-35 sitranjının katı kültür köklendirme denemesinde kök sayısı (kök/bitki), kök uzunluğu (cm), bitki boyu (cm) ve köklenme oranı (%) ait veriler

Table 4 Data on number of roots, root length (cm), plant height (cm) and rooting rate (%) in solid culture rooting experiment of C-35 citrange

BBD	BBD Konsantrasyonu (mg L <sup>-1</sup> )	MS Besin Ortamı	WPM Besin Ortamı	½ MS Besin Ortamı	BBD Ortalaması
Kök Sayısı (kök/bitki)					
NAA	0,5	2,0 <sup>de</sup>	3,66 <sup>cd</sup>	6,60 <sup>a</sup>	4,08 <sup>A</sup>
	1	3,86 <sup>bc</sup>	3,33 <sup>cd</sup>	5,66 <sup>ab</sup>	4,28 <sup>A</sup>
	2	4,66 <sup>bc</sup>	4,86 <sup>abc</sup>	4,5 <sup>bc</sup>	4,67 <sup>A</sup>
IBA	0,5	0,33 <sup>e</sup>	1,0 <sup>e</sup>	0,66 <sup>e</sup>	0,66 <sup>B</sup>
	1	0,66 <sup>e</sup>	1,0 <sup>e</sup>	0,33 <sup>e</sup>	0,66 <sup>B</sup>
	2	1,0 <sup>e</sup>	1,0 <sup>e</sup>	1,0 <sup>e</sup>	1,0 <sup>B</sup>
Kontrol	0	0,66 <sup>e</sup>	1,0 <sup>e</sup>	1,0 <sup>e</sup>	0,88 <sup>B</sup>
Ortam Ortalaması		1,88 <sup>B</sup>	2,26 <sup>AB</sup>	2,82 <sup>A</sup>	-
Kök Uzunluğu (cm)					
NAA	0,5	1,53 <sup>ab</sup>	1,73 <sup>ab</sup>	1,83 <sup>ab</sup>	1,7 <sup>AB</sup>
	1	1,5 <sup>ab</sup>	3,16 <sup>a</sup>	1,0 <sup>b</sup>	1,88 <sup>A</sup>
	2	1,73 <sup>ab</sup>	1,33 <sup>b</sup>	1,8 <sup>ab</sup>	1,62 <sup>ABC</sup>
IBA	0,5	0,33 <sup>b</sup>	1,93 <sup>ab</sup>	1,16 <sup>b</sup>	1,14 <sup>ABC</sup>
	1	0,5 <sup>b</sup>	1,23 <sup>b</sup>	1,0 <sup>b</sup>	0,91 <sup>ABC</sup>
	2	0,4 <sup>b</sup>	0,66 <sup>b</sup>	1,03 <sup>b</sup>	0,7 <sup>C</sup>
Kontrol	0	0,53 <sup>b</sup>	1,06 <sup>b</sup>	1,0 <sup>b</sup>	0,86 <sup>BC</sup>
Ortam Ortalaması		0,93 <sup>B</sup>	1,59 <sup>A</sup>	1,26 <sup>AB</sup>	-
Bitki Boyu (cm)					
NAA	0,5	3,5 <sup>a</sup>	2,90 <sup>abcd</sup>	2,73 <sup>abcde</sup>	3,04 <sup>A</sup>
	1	2,96 <sup>abcd</sup>	3,03 <sup>abcd</sup>	1,66 <sup>fg</sup>	2,55 <sup>ABC</sup>
	2	3,23 <sup>abc</sup>	2,53 <sup>bcdef</sup>	2,3 <sup>cdefg</sup>	2,68 <sup>ABC</sup>
IBA	0,5	3,46 <sup>ab</sup>	2,26 <sup>defg</sup>	2,43 <sup>cdef</sup>	2,72 <sup>AB</sup>
	1	2,1d <sup>efg</sup>	1,86 <sup>efg</sup>	2,46 <sup>cdef</sup>	2,14 <sup>CD</sup>
	2	1,4 <sup>g</sup>	2,36 <sup>cdef</sup>	2,2 <sup>defg</sup>	1,98 <sup>D</sup>
Kontrol	0	2,63 <sup>abcde</sup>	2,23 <sup>defg</sup>	2,33 <sup>cdefg</sup>	2,4 <sup>BCD</sup>
Ortam Ortalaması		2,75 <sup>A</sup>	2,45 <sup>AB</sup>	2,30 <sup>B</sup>	-
Köklenme Oranı (%)					
NAA	0,5	40(38,85) <sup>def</sup>	30(33,21) <sup>efg</sup>	100(90,0) <sup>a</sup>	56,66(54,02) <sup>BC</sup>
	1	80(68,06) <sup>b</sup>	70(57,78) <sup>bcd</sup>	70(57,78) <sup>bcd</sup>	73,33(61,21) <sup>A</sup>
	2	60(51,14) <sup>bcde</sup>	70(62,00) <sup>bc</sup>	60(51,14) <sup>bcde</sup>	63,33(54,76) <sup>AB</sup>
IBA	0,5	10(15,00) <sup>g</sup>	50(45,00) <sup>cdef</sup>	30(33,21) <sup>efg</sup>	30(31,07) <sup>D</sup>
	1	20(26,56) <sup>fg</sup>	60(51,84) <sup>bcde</sup>	10(15,00) <sup>g</sup>	30(31,13) <sup>D</sup>
	2	30(33,00) <sup>efg</sup>	50(45,00) <sup>cdef</sup>	60(51,14) <sup>bcde</sup>	46,66(43,04) <sup>C</sup>
Kontrol	0	20(26,07) <sup>fg</sup>	30(33,00) <sup>efg</sup>	40(39,23) <sup>def</sup>	30(32,76) <sup>D</sup>
Ortam Ortalaması		37,14 (36,95) <sup>B</sup>	51,42(46,83) <sup>A</sup>	52,85(48,21) <sup>A</sup>	-

Kök sayısı: LSD<sub>Ortam</sub>: 0,69\*, LSD<sub>BBD</sub>: 1,05\*\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: 1,82\*, Kök uzunluğu: LSD<sub>Ortam</sub>: Ö.D., LSD<sub>BBD</sub>: Ö.D., LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: Ö.D., Bitki boyu: LSD<sub>Ortam</sub>: 0,35\*, LSD<sub>BBD</sub>: 0,54\*\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: 0,94\*, Köklenme oranı: LSD<sub>Ortam</sub>: 7,87\*\*, LSD<sub>BBD</sub>: 12,03\*\*\*, LSD<sub>Ortam × BBD</sub>: 20,84\*\*, \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001, Parantez içinde verilen değerler açı transformasyonu ile elde edilmiştir.

Çizelge 5 Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı'na ait katı kültür ve Plantform sistemi mikroçoğaltım sonuçlarına ait veriler  
Table 5 Micropropagation results in the solid culture and Plantform system of Tuzcu 31-31 sour orange and C-35 citrange

Özellik	Tuzcu 31-31 turuncu			C-35 sitranjı		
	Katı kültür	Plantform	P değeri	Katı kültür	Plantform	P Değeri
Kardeşlenme katsayısı (kardeş/bitki)	3,4	5,26	0,93	13,4	13,3	0,49
Bitki boyu (cm)	1	6,23	0,99	2,1	2,03	0,45

Çizelge 6 Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı genotiplerine ait katı kültür ve Plantform sistemi köklendirme verileri  
Table 6 Rooting results in the solid culture and Plantform system of Tuzcu 31-31 sour orange and C-35 citrange

Özellik	Tuzcu 31-31 turuncu			C-35 sitranjı		
	Katı kültür	Plantform	P değeri	Katı kültür	Plantform	P Değeri
Kök sayısı (kök/bitki)	3,13	3,46	0,60	6,6	4,03	0,0035
Kök uzunluğu (cm)	6,03	6,40	0,58	1,83	6,26	0,99
Bitki boyu (cm)	1,73	3,16	0,99	2,73	6,50	0,98
Köklenme oranı (%)	91,66 (80,00)	100 (90,00)	0,80	91,66 (80,00)	100 (90,00)	0,78



Şekil 1 Tuzcu 31-31 turuncunun Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkiler  
Figure 1 Plants obtained as a result of micropropagation experiments in the Plantform system of Tuzcu 31-31 sour orange



Şekil 2 C-35 sitranjı Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkiler  
Figure 2. Plants obtained as a result of micropropagation experiments in the Plantform system of C-35 citrange

Tuzcu 31-31 turuncunu bitki boyu (cm) açısından incelediğimizde, katı kültür mikroçoğaltım denemesinde bitki boyu 1 cm iken, Plantform'da 6,23 cm olarak elde edilmiştir. Kardeşlenme katsayısı ise katı kültür mikroçoğaltım denemesinde 3,4 (kardeş/bitki) iken, Plantform mikroçoğaltım denemesinde 5,2 (kardeş/bitki) olarak tespit edilmiştir. Kardeşlenme katsayısı bakımından Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür mikroçoğaltım ve Plantform sistemi mikroçoğaltım denemeleri için istatistiki açıdan fark görülmesine karşın, Plantform sisteminde kardeşlenme katsayısı ortalaması daha yüksek bulunmuş olup, bitki kalitesinin daha iyi olduğu belirlenmiştir.

C-35 sitranjı anacı bitki boyu açısından incelediğinde, katı kültür mikroçoğaltım denemesi bitki boyu 2,1 cm iken, Plantform'da 2 cm olarak tespit edilmiştir. Kardeşlenme katsayısının ise katı kültür mikroçoğaltım denemesinde 13,4 (kardeş/bitki) ve Plantform sistemi mikroçoğaltım denemesinde 13,3 (kardeş/bitki) olduğu belirlenmiştir. C-35 sitranjı katı kültür ve Plantform sistemi mikroçoğaltım denemeleri için bitki boyu ve kardeşlenme katsayısı bakımından elde edilen farklılık, istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur. Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı tuurnçgil anaçlarının Plantform biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemelerine ait görüntüler, Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir.

#### Plantform Köklenme Denemesine Ait Bulgular

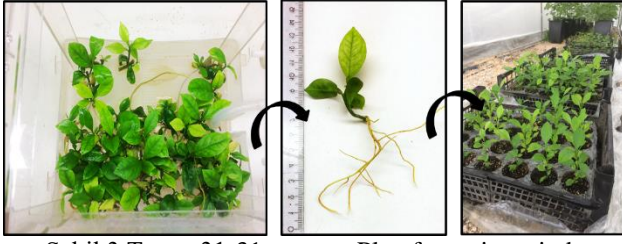
Tuzcu 31-31 turuncu katı kültür köklenme denemesi sonucu ile Plantform sistemi köklenme denemesine ait sonuçlar Çizelge 6'da verilmiştir.

Plantform köklenme denemeleri sonuçları ile katı kültür köklenme denemelerinin sonuçları karşılaştırıldığında, Tuzcu 31-31 turuncu bitki boyu parametresi açısından katı kültür köklenme denemesinde bitki boyu 1,73 cm olarak elde edilirken, Plantform sistemi köklenme denemesinde bitki boyu 3,16 cm olarak bulunmuştur. Kök sayısı kıyaslandığında, katı kültürde

3,13 (kök/bitki) iken, Plantform sisteminde 3,46 (kök/bitki) olarak belirlenmiştir. Kök uzunluğu sonuçlarına bakıldığında, katı kültür köklenme denemesinde 6,03 cm iken, Plantform'da 6,40 cm olarak bulunmuştur. Köklenme oranlarına baktığımızda ise katı kültürde %91,66 iken, Plantform sisteminde %100 olarak elde edilmiştir. Tuzcu 31-31 turuncu için katı kültür köklenme denemeleri ile Plantform sistemi köklenme denemelerini kıyasladığımızda; bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm) ve köklenme yüzdeleri (%) açısından Plantform sisteminde daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Tuzcu 31-31 turuncunun Plantform sisteminde köklenmesine ait görüntü Şekil 3'de verilmiştir.

Çalışmada C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemeleri sonucunda, en başarılı olarak belirlenen 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA içeren ½ MS besin ortamı ile Plantform sisteminde köklenme denemesi kurulmuştur. C-35 sitranjı katı kültür köklenme denemesi sonucu ile Plantform sistemi köklenme denemesine ait sonuçlar, Çizelge 6'da verilmiştir. Plantform köklenme denemeleri sonuçları ile katı kültür köklenme denemelerinin sonuçları karşılaştırıldığında, C-35 sitranjı anacı bitki boyu katı kültür köklenme denemesinde 2,73 cm, Plantform sistemi köklenme denemesinde 6,50 cm olarak tespit edilmiştir. Kök sayısı kıyaslandığında, katı kültürde 6,6 (kök/bitki) iken, Plantform sisteminde 4,03 (kök/bitki) bulunmuştur. Kök uzunluğu sonuçlarına bakıldığında, katı kültür köklenme denemesinde 1,83 cm iken, Plantform'da 6,26 cm olarak bulunmuştur. Köklenme oranları ise katı kültürde %91,66, Plantform sisteminde ise %100 olarak elde edilmiştir. C-35 sitranjı için katı kültür köklenme denemeleri ile Plantform sistemi köklenme denemelerini kıyasladığımızda bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm) ve köklenme yüzdeleri (%) bakımından, Plantform sisteminde daha başarılı, daha sağlıklı ve kaliteli köklenmiş bitkiler elde edilmiştir.





Şekil 3 Tuzcu 31-31 turuncu Plantform sisteminde köklenen bitkiler

Figure 3 Rooted plants of Tuzcu 31-31 sour orange in Plantform system

Katı kültür ve Plantform sistemlerinden elde edilen köklü bitkiler, dış koşullara alıştırmıştır. Çalışmada kullanılan Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı genotiplerinde katı kültür ve Plantform sistemlerinden elde edilen köklü bitkilerin dış koşullarda yaşama oranı, %100 olmuştur. C-35 sitranjı Plantform sisteminde köklenmesine ait görüntü, Şekil 4'de sunulmuştur.

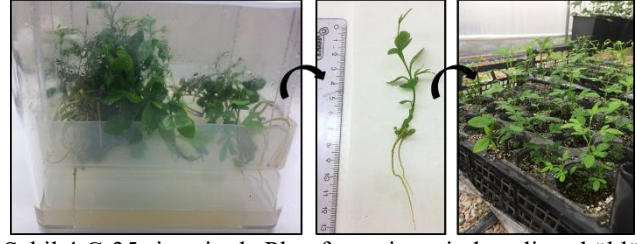
#### Moleküler Çalışmalara Ait Bulgular

Çalışmada katı kültür ve Plantform biyoreaktör sistemlerinde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik farklılık olup olmadığı, başlangıç materyali ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında, Plantform sisteminin kullanımını ile ilgili başarılı bir protokolün geliştirilebilmesi için, Plantform sisteminde çalışılan bitkilerin başlangıç materyali ile genetik olarak farklı olmaması gerekmektedir. Çalışmada kullanılan genotiplerin katı kültür ve Plantform sistemlerinden elde edilen klonlarında genetik açılımın olup olmadığı, SSR markırları ile tespit edilmiştir. SSR analizlerinde kullanılmak üzere Tuzcu 31-31 turuncudan 6 ve C-35 sitranjından 6 olmak üzere, toplam 12 örnek alınmıştır.

PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra, çalışmada kullanılan Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjı turunçgil anaçlarının katı kültür ve Plantform sistemi mikroçoğaltım ve köklendirme denemelerine ait bitkisel materyallerden alınan DNA örnekleri ile SSR analizleri gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bu primerlerin turunçgiller için polimorfik sonuçlar vermesi nedeniyle, bu çalışma sonucunda elde edilen monomorfik DNA bant profilleri, bu bitkilerin genetik olarak sabit olduğunu ispatlamaktadır. Sonuç olarak, 21 SSR primeri kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda, bu bitkilerin genetik olarak başlangıç materyali ile farklı olmadığı belirlenmiştir.

#### Tartışma

*In vitro* bitki doku ve organ kültürleri, genellikle teknolojik zorluklarla karşı karşıyadır. Kontrollü bir ortamda bitki hücrelerinin kültüre alınması istendiğinde, farklılaşan organ kültürlerinin karakteristik büyüme morfolojisi ve fizyolojisi bakımından gelişme sürecinde problem oluşturmaktadır. Bu sıkıntıları gidermek için GDS, on yıl önce geliştirilmiştir. Bu sistemler, bitkilerin *in vitro* kültürü için en doğal ortamı sağlamaktadır. Geçtiğimiz on yıl içerisinde GDS, bitki mikro-yayımları, bitki kaynaklı ikincil metabolitlerin üretimi, yabancı proteinlerin sentezlenmesi ve bitki iyileştirmede potansiyel çözümler için bir perspektif teknoloji olarak kabul



Şekil 4 C-35 sitranjında Plantform sisteminde gelişen köklü bitkiler

Figure 4 Rooted plants of C-35 citrange in Plantform system

edilmiştir. Günümüzde, benzer veya farklı teknolojik prensipler üzerinde çalışan birkaç GDS; somatik embriyolar, mikroçoğaltım ve kök kültürleri de dahil olmak üzere çeşitli çalışmalarda materyallerin *in vitro* sistemler kullanılarak başarılı bir şekilde gelişebilmesi için uygulanmıştır (Georgiev ve ark., 2014). Geliştirilen GDS'ler arasında TIB, RITA, GIB, SETIS biyoreaktör ve Plantform sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemler arasında Plantform biyoreaktör sistemi, son yıllarda oldukça yoğun kullanım alanına sahip olmuş ve farklı araştırmacılar tarafından su mercimeği (Yenice, 2010), yüksük otu, kirpi otu ve ahududu (Welande ve ark., 2014), mersin ve zeytin (Benelli ve ark., 2015), saplı meşe (Gatti ve ark., 2015), süs çimi, kasımpatı, incir ve kırmızı frenk üzümü (Lambardi ve ark., 2015), *Stevia rebaudiana* (Sacco ve ark., 2015), Güney Afrika baklagili (Kokotkiewicz ve ark., 2015), vanilya bitkisi (Ramírez-Mosqueda ve Iglesias-Andreu, 2016), orkide (Masnoddin ve ark., 2016), muz (Daungban ve ark., 2017), bambu (Gutiérrez ve ark., 2016), *Sagittaria sagittifolia* (Meiping ve ark., 2016), mersin bitkisi (Biçen ve ark., 2017), gerbera (Frómota ve ark., 2017), şizandra (Szopa ve ark., 2017) bitkilerinin Plantform biyoreaktör sisteminde gelişimleri incelenmiştir.

Cavallaro ve ark. (2015) keçiyoynuzu bitkisinin *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım etkinliğini artırmak için Plantform biyoreaktör sistemini kullanmışlardır. Çalışmada Plantform biyoreaktör sisteminin etkinliği, agar ile katılaştırılmış klasik doku kültürü yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda, Plantform biyoreaktör sisteminden elde edilen bitkilerin agar kullanılan kültürlerden elde edilen bitkilere göre daha iyi geliştiği, yaş ve kuru ağırlığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada Plantform biyoreaktör sisteminin farklı iki turunçgil anacının mikroçoğaltımı ve köklenmesi üzerine etkinliği, agar ile katılaştırılmış klasik doku kültürü yöntemi ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, Plantform biyoreaktör sisteminde, Tuzcu 31-31 turuncu ve C-35 sitranjının bitkileri daha iyi gelişmiş, bitki boyu (cm) ve kök uzunluğu (cm) daha yüksek bulunmuştur.

Turunçgillerde RITA geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılarak, somatik embriyogenesis çalışması (Cabasson ve ark., 1997) yürütülmüştür. Çalışmada, *Citrus deliciosa* Ten. genotipinde somatik embriyoların gelişimi üzerine, RITA geçici daldırma sisteminin etkisi katı ve süspansiyon kültürü ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda, geçici daldırma sisteminin somatik embriyo gelişimini teşvik ettiği ve somatik embriyoların %66'sının kotiledon safhasına ulaştığı belirlenmiştir. Ayrıca somatik embriyolar, morfolojik olarak nuseller embriyolarla aynı



olmuştur. Bu sonuç, turunçgillerde somatik embriyoların üretimi için geçici daldırma sistemlerinin uygun olduğunu göstermiştir. Turunçgillerde Plantform biyoreaktör sistemi kullanılarak yayınlanmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışma kapsamında Plantform biyoreaktör sisteminde turunçgillerin mikroçoğaltımı ve köklendirilmesi, ilk kez gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, Plantform biyoreaktör sisteminde gelişen bitkilerde camlaşma olmadığı, daha sağlıklı geliştiği, katı kültüre göre bitki boyu (cm), çoğalma katsayısı (kardeş/bitki), kök sayısı (kök/bitki), kök uzunluğu (cm) ve köklenme yüzdesinin (%) daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde, kültür kaplarına uygulanan daldırma/havalandırma süreleri ve kültüre alınan eksplant sayısı, bitki gelişimini etkilemektedir. Bitki türüne bağlı olarak optimum daldırma-havalandırma süreleri ve başlangıç eksplant sayısı farklı olabilmektedir. Gatti ve ark. (2015) saplı meşe bitkisinin *in vitro* koşullarda Plantform sisteminde mikroçoğaltımında, 8 saatte bir 12 dakika ve 16 saatte bir 8 dakika olmak üzere, iki farklı daldırma süresini denemişlerdir. Havalandırma süresi ise 4 saatte bir 15 dakika olarak belirlenmiştir. Çalışmada, 8 saatte bir 12 dakikalık daldırma süresinin, bitki gelişimi üzerine daha etkili olduğu belirlenmiştir. Sacco ve ark. (2015) Plantform biyoreaktör sisteminde kültüre alınan Stevia bitkisi için 3 saatte bir daldırmanın kallus ve camlaşma problemi meydana getirdiğini, bununla birlikte 8 saatte bir daldırmanın daha kaliteli sürgün oluşumu sağladığını belirtmişlerdir. Zhang ve ark. (2017) tıbbi bir bitki olan *Pinellia ternate* bitkisinde, 9 farklı daldırma döngüsünün bitki çoğalması ve büyümesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonunda, bitki çoğalması ve büyümesi üzerinde en başarılı daldırma döngüsü 12 saatte bir 5 dk olarak belirlenmiştir. En fazla yaş ağırlık, kültür kaplarına 60 eksplant konulduğu zaman elde edilmiştir. Kültür kaplarında 80 ve 100 eksplant kültüre alındığı zaman, bitkiler zayıf gelişme göstermiştir. Çalışmada kullanılan iki farklı turunçgil genotipi için Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım denemelerinde, 150 bitki kültüre alınmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde daldırma-havalandırma süresi ve kültüre alınan eksplant sayısının, her bitki türü için optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Bitki doku kültüründe, uzun süre bitki büyüme düzenleyici içeren ortamlarda altkültüre alma durumlarında, bitkilerde somaklonal varyasyon olarak adlandırılan bazı genetik değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu durum, vejetatif çoğaltımda kesinlikle istenmeyen bir durumdur. Plantform geçici daldırma sistemleri ile kültür sürelerinin daha kısa tutulması ve altkültür sayılarının daha aza indirilmesi ile bu risk azaltılmaktadır (Biçen ve ark., 2017). Buna karşın Plantform ve diğer geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde, kültür süreleri sonunda bitkilerin somaklonal varyasyona uğrayıp uğramadıklarının kontrolüne yönelik çalışmalar sınırlı kalmıştır. Çalışma kapsamında SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda Plantform sisteminde, çoğaltılan ve köklendirilen

bitkilerde herhangi bir genetik açılımın olmadığı moleküler çalışmalarla belirlenmiş olup, başlangıç materyali ile herhangi bir fark bulunmamıştır. Bu sonuç, Plantform sisteminin turunçgil bitkilerinin çoğaltımında güvenilir bir yöntem olduğunu desteklemektedir.

## Sonuç

Çalışma sonuçlarına dayalı olarak Plantform sisteminin kullanılabilirliği, işgücü ve zamandan tasarruf sağlaması yönüyle katı kültürlerle kıyasla iyi bir potansiyele sahip olmuştur. Çalışma kapsamında doku kültürü çalışmaları sonucunda her iki sistemde ve her iki genotipte de köklenen bitkiler başarılı bir şekilde seraya aktarılmış olup, gelişmeleri takip edilmiştir. Başlangıç materyali ile katı kültür ve Plantform sisteminde çalışılan bitkilerden elde edilen sonuçlara göre, her iki genotip içinde herhangi bir genetik farklılık tespit edilmemiştir. Çalışma kapsamında yapılan moleküler çalışmalar ile Plantform sisteminin bu yönüyle de kullanılabilirliği ortaya konulmuştur.

## Teşekkür

Projeyi maddi açıdan destekleyen Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No. 2016/FYL/6482) teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Aka Kaçar Y. 2007. Türkiye Turunçgil Gen Kaynaklarının Moleküler Karakterizasyonu ve SSR Markırlarının Geliştirilmesi. TÜBİTAK Projesi, TOGTAG-3241 Proje Sonuç Raporu.
- Benelli C, Fernanda CM, 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. 19-24 April 2015, Sanremo, Italy.
- Biçen B, Dönmez D, Simsek O, Aka Kaçar Y. 2017. Effects of Different Media on Micropropagation and Rooting of Myrtle (*Myrtus communis* L.) in *In Vitro* Conditions. European Biotechnology Congress, 25-27 May 2017, Dubrovnik, Croatia.
- Cabasson C, Alvard D, Dambier D, Ollitrault P, Teisson C. 1997. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50(1):33-37.
- Cavallaro V, Scalisi C, Saita A, Malvuccio A, La Rosa S, Pellegrino A, Barbera AC. 2015. Improving *in vitro* mass proliferation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) from seedling apices by temporary immersion systems. VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, 1155:221-226.
- Daungban S, Pumisitapon 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 Immersion 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.
- Frómota OM, Morgado MME, Da Silva JAT, Morgado DTP, Gradaille MAD. 2017. *In Vitro* Propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in A Temporary Immersion Bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(3):543-551.

- Gatti E, Ozudogru A, Lambardi M, Sgarbi E. 2015. Comparison between a conventional culture system and Plantform bioreactor in *Quercus robur* micropropagation. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, 19-24 April 2015, Sanremo, Italy.
- Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6):607-621.
- Gutiérrez LG, 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.
- Gülşen O, Uzun A. 2011. Turunçgil Araştırmalarında Biyoteknoloji Çalışmaları. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(1):68-76.
- Kokotkiewicz A, Bucinski A, Luczkiewicz M. 2015. Xanthone, Benzophenone and Bioflavonoid Accumulation in *Cyclopia genistoides* (L.) Vent (honeybush) Shoot Cultures Grown on Membrane Rafts and in A Temporary Immersion System. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(1):373-378.
- Lambardi M, Roncasaglia R, Bujasha D, Baileiro F, Correia Da Silva DP, Ozudogru EA. 2015. Improvement of shoot proliferation by liquid culture in temporary immersion. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, 19-24 April 2015, Sanremo, Italy.
- Lloyd G, McCown B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.*, 30:421-427.
- Masnoddin M, Repin R, Aziz ZA. 2016. Micropropagation of an Endangered Borneo Orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* Callus Using Temporary Immersion Bioreactor System. *Thai Agricultural Research Journal*, 34(2):161-171.
- Meiping G, Zhicheng L, Chi Z, Wen J, Fanglian H, Liu Y, Shaolong W. 2016. Optimization of *Sagittaria sagittifolia* Rapid Propagation in Temporary Immersion Bioreactors System. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 29(11):2704-2708.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-497.
- Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 81:287-300.
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG. 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.
- Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodriguez R, Debergh P. 2006. The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 84:155-163.
- 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.
- Szopa A, Kokotkiewicz A, Luczkiewicz M, Ekiert H. 2017. *Schisandralignans* Production Regulated by Different Bioreactor Type. *Journal of Biotechnology*, 247:11-17.
- Şimşek Ö, Kanat F, Serçe S, Kaçar YA. 2008. Bazı Meyve Türlerinde DNA İzolasyon Yöntemlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması. *Derim*, 25(1):59-69.
- Tuzcu Ö. 1998. Turunçgiller Lisans Ders Notları. Ç.Ü.Z.F. Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana, (Yayınlanmamış).
- Welander M, Persson J, Asp H, Zhu LH. 2014. Evaluation of a New Vessel System Based on Temporary Immersion System for Micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 179:227-232.
- Welander M, Sayegh A, Hagwall F, Kuznetsova T, Holfors A. 2017. Technical improvement of a new bioreactor for large scale micropropagation of several *Vaccinium* cultivars. *Acta Horticulturae*, 1180(53):387-392.
- Yenice Z. 2010. Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktörlerle Su Mercimeği (*Lemna minor* L.) Bitkisinin *in vitro* Çoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara (Yayınlanmamış).
- 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.