



Micropropagation of Spathiphyllum with Temporary Immersion Bioreactor System

Yıldız Aka Kaçar^{1,a,*}, Dicle Dönmez^{2,b}, Belgin Biçen^{2,c}, M. Hakan Erol^{2,d}, Özhan Şimşek^{3,e}, Yeşim Yalçın Mendi^{1,f}

¹Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Çukurova University, 01330 Adana, Turkey

²Biotechnology Research and Application Center, Çukurova University, 01330 Adana, Turkey

³Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Erciyes University, 38280 Kayseri, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Research Article

Received : 06/02/2020

Accepted : 12/03/2020

Keywords:

Plantform

Temporary immersion system

Cultivation

Micropropagation

Bioreactor

Turkey has an advantageous position for the cultivation of ornamental plants for reasons such as favourable conditions, proximity to markets and cheap labour. In addition to classical production methods, biotechnological methods are used to meet the demand of Spathiphyllum, which is an indoor plant. In recent years, it has been started to be used in micropropagation of plants called temporary immersion system as well as classical tissue culture systems. Within the scope of the present study, micropropagation and rooting studies were carried out using classical tissue culture system and Plantform, one of the temporary immersion bioreactor systems, in the commercially important Spathiphyllum 'Chico' genotype. MS medium containing 1 mg L⁻¹ 6-Benzylaminopurine (BAP) was used in micropropagation experiments established in both systems, and Murashige and Skoog (MS) medium containing 1 mg L⁻¹ Indole-3-butyric acid (IBA) was used in rooting experiments. The results of micropropagation and rooting have been found to be successful in both systems. As a result of the screening with Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) markers, it was determined that there were no genetic differences in the plants that were reproduced and rooted.

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(5): 1195-1200, 2020

Spathiphyllum'un Geçici Daldırma Biyoreaktör Sistemi ile Mikroçoğaltımı

MAKALE BİLGİSİ

ÖZ

Araştırma Makalesi

Geliş : 06/02/2020

Kabul : 12/03/2020

Anahtar Kelimeler:

Plantform

Daldırma biyoreaktör sistemi

Yetiştirme

Mikroçoğaltım

Biyoreaktör

Türkiye, süs bitkileri yetiştiriciliği açısından elverişli koşulları, pazar ülkelere yakınlığı ve ucuz işgücüne sahip olması gibi sebeplerle avantajlı bir konuma sahiptir. Bir iç mekân bitkisi olan spathiphyllum talebini karşılamak amacıyla, klasik üretim yöntemlerine ek olarak biyoteknolojik yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Son yıllarda bitkilerin Mikroçoğaltım'ında klasik doku kültürü sistemleri ile beraber, geçici daldırma biyoreaktörler olarak adlandırılan sistemlerin de kullanımına başlanmıştır. Bu çalışma kapsamında, ticari olarak öneme sahip spathiphyllum 'Chico' genotipinde, klasik doku kültürü ve geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinden biri olan Plantform kullanılarak, Mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmaları yürütülmüştür. Her iki sistemde kurulan Mikroçoğaltım denemelerinde 1 mg L⁻¹ 6-Benzilaminopürin (BAP) içeren Murashige ve Skoog (MS) besin ortamı, köklendirme denemelerinde ise 1 mg L⁻¹ İndol-3-bütirik asit (IBA) içeren MS ortamı kullanılmıştır. Mikroçoğaltım ve köklenme sonuçlarının, her iki sistemde de başarılı olduğu tespit edilmiştir. Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm (SRAP) markurları ile yapılan DNA analizleri sonucunda da, çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik açılımın olmadığı belirlenmiştir.

^a ykacar@cu.edu.tr

^b <https://orcid.org/0000-0001-5314-7952>

^b dicledonmez4@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-7446-9405>

^c bturunc02@yahoo.com

^c <https://orcid.org/0000-0001-8931-4759>

^d mherol@cu.edu.tr

^d <https://orcid.org/0000-0003-2424-5670>

^e ozhan12@gmail.com

^e <https://orcid.org/0000-0001-5552-095X>

^f yesimcan@cu.edu.tr

^f <https://orcid.org/0000-0002-4587-5156>



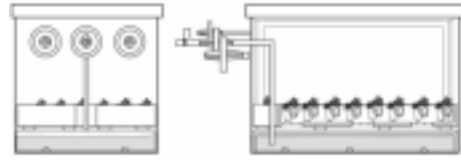
Giriş

Türkiye, süs bitkileri yetiştiriciliğinde uygun iklimsel ve coğrafi koşullara, pazar ülkelerine yakınlığa ve ucuz işgücüne sahip olması gibi nedenlerle önemli avantajlara sahiptir. Aracea familyasına ait bir iç mekân bitkisi olan *Spathiphyllum*'un orijini, Kolombiya ve Venezuela'dır. Doğada 36 türü bulunan *Spathiphyllum* cinsi oldukça kuvvetli büyüyen ve bakımı kolay bir salon bitkisidir. *Spathiphyllum*'un yaprakları yeşil, uzunca oval, uç kısma doğru sivri çiçekleri beyaz, spathe ve spadiksten oluşmuştur. Çiçek başağını saran spadiks beyaz renkte olduğu için "Barış Zambağı" veya yelkene benzerliğinden dolayı "Beyaz Yelken" adlarıyla da anılmaktadır. *Spathiphyllum*'un vejetatif yollarla çoğaltılması zordur. Bu nedenle generatif yollarla çoğaltım talebinin karşılanması gerekmektedir (Hennen ve Hotchkiss, 1995). Tohum üretimi düzensiz olduğu için talebi yeterince karşılamamaktadır. Günümüzde artan *spathiphyllum* talebini karşılamak amacıyla, klasik üretim yöntemlerine ek olarak biyoteknolojik yöntemlerden de yararlanılmaktadır. Bitki ıslahı ve yetiştiriciliği sürecinde, bitkilere birçok farklı biyoteknolojik yöntemler uygulanabilir. Biyoteknolojinin en geniş uygulamalarından biri, bitki doku kültürü alanındadır. Günümüzde bitki doku kültürü uygulamaları, klonal çoğaltım ve Mikroçoğaltım'dan çok daha fazlasını kapsamaktadır. Rutin teknolojiler; somatik embriyogenesis, somatik hibridizasyon, virüs eliminasyonunu, haploid bitki üretimi, sekonder metabolitlerin üretilmesi ve biyoreaktörlerin kitle çoğaltımında uygulanmasını içerecek şekilde genişlemiştir (Dönmez ve ark., 2016). Son dönemlerde *Spathiphyllum* bitkisinin popüleritesindeki artış nedeniyle, piyasada ihtiyaç duyulan talebin karşılanması için üreticiler bitki doku kültürü tekniklerinden yararlanmaktadırlar.

Klasik doku kültürü yöntemlerinde, genellikle agarla katılaştırılmış besin ortamları kullanılmaktadır. Bununla beraber bazı çalışmalarda tam sıvı ortamlarında kullanıldığı bilinmektedir. Ancak gerek katı ortamların, gerekse de tam sıvı ortamların bitki gelişimi üstüne dezavantajları söz konusudur. Katı ortamların katılaştırıcı etkisi sebebi ile zamanla ortamlarda kararın gözlenmektedir. Bu sebeple 4-5 haftada bir altkültür işleminin gerçekleştirilmesi gerektiği bilinmektedir. Bu durum, ortamlarda kontaminasyon oluşma riskini arttırmaktadır. Ayrıca, belirli bir alt kültürden sonra somaklonal varyasyonla da karşılaşılabilir. Tam sıvı ortamlarda ise en çok karşılaşılan problem bitki materyalinin sürekli besin ortamında kalmasından kaynaklanan hiperhidrisiti olayının gözlemlenmesidir. Bu nedenle son zamanlarda geliştirilen ve bitkinin belirli aralıklarla sıvı yüzeyden uzaklaşmasını mümkün kılan, geçici daldırma biyoreaktör sistemleri kullanılmaktadır (Yenice, 2010). Geçici daldırma biyoreaktör teknolojisi (Adelberg ve Simpson, 2002), steril laboratuvar kaplarında (biyoreaktör) sıvı besin ortamlarına aralıklı olarak hızlıca daldırılarak, bitkilerin büyümesini sağlayan bir çoğaltım sistemidir. Sistem basınç altında, hava akımı aracılığıyla yürütülmektedir. İçine geçici daldırmada, kültürler belirlenmiş aralıklarda önceden ayarlanmış bir süre için, ortam içine daldırılır. Bu sistemlerin oldukça kullanışlı olmalarının en önemli sebebi daha kısa sürede, düşük maliyete daha kaliteli bitkilerin üretilebiliyor olmasıdır.

Sistem yeni nesil doku kültürü teknolojisidir ve sıvı ortamda bitki dokularının zamanlı daldırılması kültürlerin havalanmasına olanak sağlar. Her ünite -kapalı steril laboratuvar ortamı- basınç altında hava akışını giriş ve çıkışlar ile sağlayan bir biyoreaktördür. Bu özellik, geleneksel doku kültürü ile ilişkili sınırlamalara üstün gelmektedir. Bu çalışma kapsamında son yıllarda yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanan, Platform geçici daldırma biyoreaktör sistemi kullanılmıştır (Şekil 1).

Çalışma kapsamında, iç mekân süs bitkileri arasında önemli bir paya sahip olan *spathiphyllum*'un klonal ve hızlı olarak üretilmesinde, klasik ve geçici daldırma tekniklerinin etkisi birbirleri ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, katı kültür ve Platform biyoreaktör sistemi kullanılarak *spathiphyllum*'un çoğaltılması, köklendirilmesi ve dış koşullara alıştırılması işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, kültür süresince bitkilerde herhangi bir genetik varyasyonun olup olmadığı moleküler analizler ile tespit edilmiştir.



Şekil 1. Platform geçici daldırma biyoreaktör sistemi (boyutlar 180 × 150 × 150 mm) (Georgiev ve ark., 2014).

Figure 1. Platform temporary immersion bioreactor system (sizes 180 × 150 × 150 mm) (Georgiev et al., 2014).

Materyal ve Metot

Bitkisel Materyal

Çalışma kapsamında, bitkisel materyal olarak *spathiphyllum* 'Chico' genotipi kullanılmıştır.

Bitkisel Materyalin Sterilizasyonu

Çalışma kapsamında kullanılan *spathiphyllum* 'Chico' genotipine ait sürgün uçları laboratuvara getirildikten sonra, çeşme suyu altında 10 dk yıkanmıştır. Daha sonra sürgün uçları %15 sodyum hipoklorit + 1-2 damla Tween 20 çözeltisinde 15 dk bekletilmiştir. Ardından sterilant maddelerin uzaklaştırılması amacıyla, 3 defa steril saf su ile yıkanmıştır.

Besin Ortamı

Sterilizasyon sonrası sürgün uçları; 1 mg L⁻¹ BAP, 30 g L⁻¹ sakkaroz, 7,5 g L⁻¹ agar içeren MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamında kültüre alınmışlardır. Besin ortamının pH'sı 5,7'ye ayarlanmıştır. Sürgün uçları, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık, 25°C sıcaklık koşullarında kültüre alınmışlardır. Sürgün uçlarının kültüre alınması sonucu elde edilen bitkiler, mikroçoğaltım denemelerinde kullanılmıştır.

Mikroçoğaltım Denemelerinin Kurulması

Çalışmada kullanılan *spathiphyllum* 'Chico' genotipine ait sürgün uçları, MS besin ortamında katı kültür ve Platform geçici daldırma biyoreaktör sisteminde

kültüre alınmışlardır. Her iki sistemde kurulan Mikroçoğaltım denemelerinde, besin ortamlarının içerisinde 1 mg L⁻¹ BAP ve 30 g L⁻¹ sakkaroz ilave edilmiştir. Katı kültür denemelerinde, besin ortamlarına 7,5 g L⁻¹ agar ilave edilmiştir. Mikroçoğaltım denemelerinde, her iki sistemde kullanılan tüm besin ortamlarının pH'sı 5,7'ye ayarlanmıştır. Bitkicikler, katı kültürde dört haftada bir olmak üzere toplamda 3 kez alt kültüre alınmışlardır. Plantform sistemi için hazırlanan besin ortamlarına, agar ilave edilmemiştir. Plantform biyoreaktör sistemi Mikroçoğaltım denemesinde, her kültür kabına 500 mL besin ortamı eklenmiş ve 100 bitki kültüre alınmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Her iki sistemde bitkicikler, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 25°C sıcaklık büyütme koşullarında kültüre alınmıştır.

Köklendirme Denemelerinin Kurulması

Mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkiler ile katı kültür ve Plantform biyoreaktör sistemleri kullanılarak, köklendirme denemesi kurulmuştur. Her iki sistemde köklenme denemelerinde, 1 mg L⁻¹ IBA ve 30 g L⁻¹ sakkaroz içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Katı kültür ve Plantform sistemi köklenme denemelerinde kullanılan tüm besin ortamlarının pH'sı, 5,7'ye ayarlanmıştır. Katı kültür köklendirme denemelerinde, besin ortamlarına 7,5 g L⁻¹ agar ilave edilmiştir. Katı kültür köklendirme denemelerinde, köklendirme ortamlarına 20 bitki aktarılmıştır. Plantform sistemi için hazırlanan besin ortamlarına agar ilave edilmemiştir. Plantform biyoreaktör sistemi köklenme denemesinde, her kültür kabına 500 mL besin ortamı eklenmiş ve 100 bitki konulmuştur. Plantform biyoreaktör sisteminde, daldırma süresi 4 saatte 10 dk ve havalandırma süresi 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Katı kültür ve Plantform sistemi köklenme denemelerinde, bitkiler 8 hafta süresince kültüre alınmıştır. Her iki sistemde bitkicikler, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık, 25°C sıcaklık koşullarında kültüre alınmıştır.

Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması

Her iki sistemde köklenen bitkiler, dış koşullara aktarılmadan önce bitkilerin bulunduğu kültür kapları kademeli olarak açılarak, laboratuvarında ön alıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Katı kültürde bitkiler, su ile agardan tamamen uzaklaştırılmıştır. Her iki sistemden elde edilen köklü bitkiler, serada 1:1 oranda steril torf:perlit karışımı içeren vıyollere aktarılmıştır. Bu aşamada bitki uzunluğu, kök uzunluğu ve kök sayısına ait parametreler incelenmiştir.

Deneme Planı, İstatistik Analizleri ve İncelenen Kriterler

Spathiphyllum 'Chico' genotipinin Mikroçoğaltım'ı ve köklendirilmesi amacıyla kurulan denemelerin tamamı 3 tekerrürlü olacak şekilde, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. *Spathiphyllum*'un *in vitro* koşullarda hızlı ve klonal çoğaltımının amaçlandığı bu projede, klasik doku kültürü sistemi ile Plantform biyoreaktör sisteminin bitki kalitesi, çoğalma katsayısı ve köklenme üzerine etkileri incelenmiştir. Mikroçoğaltım denemelerinde üç altkültür yapılmış olup, altkültürlerin ortalamaları alınmıştır. Katı kültür denemelerinde bitkiler, 4 haftada bir altkültüre

alınmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde ise bitkiler 8 hafta kültüre alınmıştır. Mikroçoğaltım denemeleri sonucunda, 20'şer bitkide; bitki boyu (cm), kardeş sayısı (kardeş/bitki), yaprak sayısı (adet), yaş ağırlık (g) ve kuru ağırlık (g) parametrelerine ait gözlemler alınmıştır. Köklenme denemelerinde, köklendirme ortamında kültüre alma işleminden 8 hafta sonra; bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm), kök sayısı (adet), yaprak sayısı (adet), yaş ağırlık (g) ve kuru ağırlık (g) parametrelerine ait gözlemler alınmıştır. Bitkilerin yaş ağırlıkları hassas terazide tartılarak gram (g) ($\pm 0,1$) olarak belirlenmiştir. Kuru ağırlığı belirlemek için bitkiler, 70°C'de 48 saat etüvde kurutulmuş, ardından hassas terazide tartılmıştır. Çalışmada elde edilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, t testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistik analizler, JMP 8.01 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Doku Kültürü Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Bitkilerde Genetik Kararlılığın Belirlenmesi

Çalışma kapsamında katı kültür ve Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik varyasyon olup olmadığı başlangıç materyali ile karşılaştırma sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; başlangıç (kontrol), katı kültür Mikroçoğaltım denemesi sonrası, plantform Mikroçoğaltım denemesi sonrası, katı kültür köklenme denemesi sonrası, plantform köklenme denemesi sonrası olmak üzere 5 dönemde yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan yaprak örnekleri -196°C'de sıvı azota daldırılıp, -80°C'de muhafaza edilmiştir. Genetik kararlılığın belirlenmesinde, SRAP markırları kullanılmıştır. 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). SRAP analizleri, Li ve Quiros (2001)'e göre yapılmıştır. Çalışmada, 4 adet ileri ve 4 adet geri primerinin farklı kombinasyonları ile oluşturulan, 16 primer çifti kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan primerlere ait bilgiler Çizelge 1'de belirtilmiştir.

Çizelge 1. SRAP analizlerinde kullanılan ileri ve geri primerleri

Table 1. Forward and reverse primers used in the SRAP analysis

Primer adı	Forward Primer (5'-3')
Em1	TGAGTCCAAACCGGATA
Em2	TGAGTCCAAACCGGAGC
Em3	TGAGTCCAAACCGGAAT
Em4	TGAGTCCAAACCGGACC
me2	GACTGCGTACGAATTTGC
me3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	GACTGCGTACGAATTTGA
me5	GACTGCGTACGAATTAAC

SRAP-PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntülenmiştir. Bu amaçla, %2,5 oranında agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz jel hazırlığında, %0,5 oranında TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) kullanılmıştır. PCR ürünlerinin üzerine 6X yükleme boyası eklendikten sonra, agaroz jele yüklenmiştir. PCR ürünlerinin boyutunun tespit

edilmesi amacıyla jele, DNA örnekleri ile beraber 1 kb DNA ladder yüklenmiştir. Jel, 3,5 saat 110 V elektrik akımı altında koşulmuştur. PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla agaroz jel %0,1 oranında etidyum bromid ile boyanmış ve UVP jel dokümantasyon cihazında görüntülenmiştir.

Bulgular

Çalışmada, spathiphyllum 'Chico' genotipinin Mikroçoğaltım'ı ve köklendirilmesi üzerine Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminin etkisi, katı kültür ile kıyaslanarak belirlenmiştir. Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminde kültür kaplarına 4 saatte bir 10 dk daldırma işlemi ve 4 saatte bir 15 dk havalandırma işlemi uygulanmıştır.

Mikroçoğaltım Denemelerine ait Bulgular

Katı kültür ve plantform biyoreaktör sisteminde Mikroçoğaltım denemeleri yürütülmüştür. Her iki sistemde Mikroçoğaltım denemelerinde, 1 mg L⁻¹ BAP içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Mikroçoğaltım denemelerinde; kardeş sayısı (kardeş/bitki), bitki boyu (cm), yaprak sayısı (adet), yaş ağırlık (g) ve kuru ağırlık (g) parametreleri incelenmiştir (Çizelge 2). Ayrıca bitkilerin genel durumları değerlendirilmiştir. Mikroçoğaltım denemelerinde, katı kültür ve Plantform sisteminin kardeş sayısı üzerine etkileri, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0,001).

Spathiphyllum için etkili Mikroçoğaltım yönteminin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, katı kültür denemelerinde bitkilerden elde edilen kardeş sayısı ortalamaları (8,08), Plantform sisteminden elde edilen kardeş sayısı ortalamalarına (5,05) göre daha fazla olmuştur. Ortalamalar arasındaki bu fark, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0,001). Çalışmada, bitki boyu, yaprak sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık verileri üzerine katı kültür ve Plantform biyoreaktör sisteminin etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Köklenme Denemelerine ait Bulgular

Projede katı kültür ve Plantform biyoreaktör sisteminde, köklenme denemeleri yürütülmüştür. Her iki sistemde köklenme denemelerinde 1 mg L⁻¹ IBA içeren MS besin ortamı kullanılmıştır. Köklenme denemelerinde; bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm), kök sayısı (adet), yaprak sayısı (adet), yaş ağırlık (g) ve kuru ağırlık (g) parametreleri incelenmiştir (Çizelge 3). Ayrıca, bitkilerin genel durumları değerlendirilmiştir.

Köklenme denemelerinde, katı kültür ve plantform sisteminin bitki boyu (cm), kök uzunluğu (cm) ve yaş ağırlık (g) üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunurken (P<0,001); kök sayısı (adet), yaprak sayısı (adet) ve kuru ağırlık (g) üzerine etkileri önemsiz bulunmuştur. Köklenme denemelerinde katı kültürde gelişen bitkilerin bitki boyu (5,42), kök uzunluğu (4,92) ve yaş ağırlık (0,79) ortalamaları, Plantform sisteminde gelişen bitkilerin bitki boyu (2,27), kök uzunluğu (1,87) ve yaş ağırlık (0,33) ortalamalarına göre daha fazla olmuştur. Katı kültür ve Plantform sistemi köklenme denemelerinde, bitkilerin köklenme oranı %100 olarak belirlenmiştir.

Moleküler Çalışmalara ait Bulgular

Katı kültür ve Plantform biyoreaktör sistemlerinde çoğaltılan ve köklendirilen bitkilerde herhangi bir genetik farklılık olup olmadığı, başlangıç materyali ile karşılaştırılarak gerçekleştirilmiştir. Plantform sisteminin kullanımı ile ilgili başarılı bir protokolün geliştirilebilmesi için Plantform sisteminde çalışılan bitkilerin başlangıç materyali ile genetik olarak farklı olmaması gerekmektedir. Çalışmada kullanılan spathiphyllum'un katı kültür ve Plantform sistemlerinden elde edilen klonlarında genetik açılımın olup olmadığı SRAP markırları ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, toplam 16 SRAP primer kombinasyonu kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan 16 SRAP primer kombinasyonundan, 6 primer kombinasyonu ile amplifikasyon elde edilememiştir. Geriye kalan 10 primer kombinasyonunda, örnekler arasında DNA bant profilleri arasında bir farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 2. Spathiphyllum katı kültür ve Plantform Mikroçoğaltım denemesine ait veriler
Table 2. Data from micropropagation experiments of Spathiphyllum solid culture and Plantform

İncelenen kriterler	Yöntem	
	Katı kültür	Plantform
Kardeş sayısı (kardeş/bitki)	8,08*	5,05*
Bitki boyu (cm)	3,58	3,55
Yaprak sayısı (adet)	27,36	28,50
Yaş ağırlık (g)	1,36	1,89
Kuru ağırlık (g)	0,14	0,31

*P<0,001

Çizelge 3. Spathiphyllum katı kültür ve Plantform köklenme denemesine ait veriler
Table 3. Data from rooting experiments of spathiphyllum solid culture and Plantform

İncelenen kriterler	Yöntem	
	Katı kültür	Plantform
Bitki boyu (cm)	5,42*	2,27*
Kök uzunluğu (cm)	4,92*	1,87*
Kök sayısı (adet)	12,00	11,90
Yaprak sayısı (adet)	6,25	5,00
Yaş ağırlık (g)	0,79*	0,33*
Kuru ağırlık (g)	0,07	0,07

*P<0,001

Tartışma

Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan bitki büyüme düzenleyicinin etkinliği, bitki büyüme düzenleyici tipi ve konsantrasyonuna göre her genotip için farklı olabilmektedir. Dewir ve ark. (2006), *S. canifolium* bitkisinde gerçekleştirdikleri Mikroçoğaltım çalışmalarında, en etkili protokolü belirlemek amacıyla BA ile birlikte IBA ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarını kullanmışlar ve en fazla sürgün sayısını 13,32 mM BA ve 4,9 mM IBA içeren besin ortamında elde etmişlerdir. Aka Kaçar ve ark. (2005), 'Sweet Pablo' Spathiphyllum çeşidinin Mikroçoğaltım'ı için farklı konsantrasyonlarda BA ve PBA bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamı kullanmışlar ve sağlıklı ve güçlü sürgünlerin elde edilmesinde PBA'nın BA'ya göre daha etkili sonuçlar

verdiğini belirtmişlerdir. Geneyikli (2009), üç farklı *Spathiphyllum* çeşidinin (Sweet Dario, Sweet Chico, Sweet Cupido) Mikroçoğaltım'ı üzerine en başarılı bitki büyüme düzenleyicisini belirlemek amacıyla Kin, BA ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarını kullanmış ve her üç çeşit için en etkili Mikroçoğaltım ortamının 1 mg L^{-1} BA içeren ortam olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma kapsamında, çoğaltma ortamında kullanılan 1 mg L^{-1} BA ve köklendirme ortamında kullanılan 1 mg L^{-1} IBA konsantrasyonu, çoğaltma ve köklenme için oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Katı kültür ve Plantform sisteminde, köklenme oranı %100 olarak tespit edilmiştir.

Geçici daldırma biyoreaktör sistemleri geçtiğimiz on yıl içerisinde, bitki Mikroçoğaltım'ı, bitki kaynaklı sekonder metabolitlerin üretimi, yabancı proteinlerin sentezlenmesi ve bitki iyileştirmede potansiyel çözümler için bir perspektif teknoloji olarak kabul görülmüştür. Günümüzde, benzer veya farklı teknolojik prensipler üzerinde çalışan birkaç geçici daldırma sistemi, somatik embriyolar, Mikroçoğaltım ve kök kültürleri de dahil olmak üzere çeşitli çalışmalarda materyallerin *in vitro* sistemler kullanılarak başarılı bir şekilde gelişebilmesi için uygulanmıştır. Geliştirilen bazı geçici daldırma sistemleri arasında BIB (Biorreator deImersao por Bolhas), RITA (recipienta immersion temporaire automatique), twin-flask sistem, SETIS™ biyoreaktör, Rocker sistemleri ve Plantform sistemi bulunmaktadır (Georgiev ve ark., 2014). Bu sistemler arasında Plantform biyoreaktör sistemi, son yıllarda oldukça yoğun kullanım alanına sahip olmuştur. Farklı araştırmacılar tarafından su mercimeği (Yenice, 2010), yüksük otu, kirpi otu ve ahududu (Welander ve ark., 2014), mersin ve zeytin (Benelli ve ark., 2015), saplı meşe (Gatti ve ark., 2015), süs çimi, kasımpatı, incir ve kırmızı frenk üzümü (Lambardi ve ark., 2015), *Stevia rebaudiana* (Sacco ve ark., 2015), saplı meşe (Enrico ve ark., 2015), Güney Afrika baklagili (Kokotkiewicz ve ark., 2015), vanilya bitkisi (Ramírez-Mosqueda ve Iglesias-Andreu, 2016), orkide (Masnoddin ve ark., 2016), muz (Daungban ve ark., 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), keçiboynuzu (Umarusman, 2018) turuncğil anaçları (Cengiz ve Aka Kaçar, 2019), *Prunus* anaçları (Hasan Ali Dagman, 2019) ve mersin bitkisinde (Aka Kacar ve ark., 2020) Plantform biyoreaktör sistemi kullanılarak çalışılmıştır.

Farklı bitki türlerinin Mikroçoğaltım'ı ve köklendirilmesi çalışmalarında, Plantform biyoreaktör sistemi başarılı sonuçlar vermiştir. Ancak, her bitki türü için başarılı olan sistem farklı olabilmektedir. *Spathiphyllum* 'Chico' çeşidinin Mikroçoğaltım'ı ve köklenmesi üzerine Plantform geçici daldırma biyoreaktör sisteminin etkisinin katı kültür ile karşılaştırıldığı bu çalışmada ise, Mikroçoğaltım denemelerinde, bitki başına düşen kardeş sayısı, katı kültürde daha başarılı bulunmuştur. Köklenme denemelerinde; bitki uzunluğu, kök uzunluğu ve yaş ağırlığın katı kültürde Plantform sistemine göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Ancak elde edilen veriler değerlendirildiğinde, Plantform sisteminin *spathiphyllum*'un Mikroçoğaltım'ı ve köklenmesi için uygun olduğu tespit edilmiştir. Dewir ve ark. (2006) ise, *S. canifolium* bitkisinde, katılaştırılmış ortam ve biyoreaktör kültürleri (sürekli ve geçici daldırma)

arasındaki çalışmaları karşılaştırdıklarında, sürgün çoğaltımı ve gelişmesinde düşük sitokinin konsantrasyonları ile desteklenmiş sürekli daldırma biyoreaktör sistemlerinin daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

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 Mikroçoğaltım'ında 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 çoğaltması ve büyümesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonunda, bitki çoğaltması ve büyümesi üzerinde en başarılı daldırma döngüsü 12 saatte bir 5 dk olarak belirlenmiştir. En fazla yaş ağırlık, kültür kaplarına 60 eksplant konulduğu zaman elde edilmiştir. Kültür kaplarına 80 ve 100 eksplant konulduğu zaman bitkiler zayıf gelişme göstermiştir. Ayrıca, kültür kaplarına 4 saatte 10 dk daldırma ve 4 saatte 15 dk havalandırma süresi uygulandığında bitkilerin daha iyi geliştiği belirlenmiştir. Çalışmada, *Spathiphyllum* Mikroçoğaltım ve köklenme çalışmalarında, Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde Mikroçoğaltım ve köklendirme denemelerinde 100'er bitki kültüre alınmıştır. Bu koşullarda kültüre alınan *spathiphyllum* bitkisinde, Mikroçoğaltım denemelerinde, bitki başına düşen kardeş sayısı, köklendirme denemelerinde ise bitki uzunluğu, kök uzunluğu ve yaş ağırlık parametreleri katı kültürde Plantform geçici daldırma biyoreaktör sistemine göre daha başarılı olmuştur. Bununla beraber Plantform sisteminin sahip olduğu avantajlar değerlendirildiğinde; özellikle kültür kaplarına çok daha fazla sayıda bitki eklenebilmesi, altkültür süresinin uzaması, işçiliğin ve maliyetin azalması gibi faktörler açısından büyük çaplı üretim çalışmalarında Plantform sisteminin kullanılabilirliği ortaya konulmuştur.

Sonuç

Çalışma sonuçlarına dayalı olarak geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinden biri olan Plantform sisteminin kullanılabilirliği, işgücü ve zamandan tasarruf sağlaması yönüyle klasik katı kültürle göre iyi bir potansiyele sahip olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmada klasik katı kültür ve Plantform sisteminde çoğaltılan ve köklendirilen bitkiler, başarıyla dış koşullara aktarılmıştır. SRAP markılarıyla yürütülen DNA analizlerine dayalı olarak başlangıç materyali ile katı kültür ve Plantform sisteminde çalışılan bitkilerde herhangi bir genetik varyasyon tespit

edilmemiştir. Sonuç olarak, Plantform sisteminin avantajları değerlendirildiğinde; büyük çaplı üretim çalışmalarında Plantform sisteminin kullanılabilirliği ortaya konulmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: FBA-2018-9851).

Kaynaklar

Adelberg JW, Simpson EP. 2002. Intermittent Immersion Vessel Apparatus and Process for Plant Propagation. Internl. S/N: PCT/US01/06586.

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, Mazmanoğlu M, Mendi YY, Serce S, Cetiner S. 2005. The Effect of Cytokinin Type and Concentration on Multiplication Rate of Spathiphyllum (fam. Araceae). Asian Journal of Plant Science, 4(4):401-404.

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, San Remo, Italy, 19-24 April 2015.

Biçen B, Dönmez D, Şimşek Ö, 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.

Cengiz M, Kaçar YA. 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, 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.

Dewir YH, Chakrabarty D, Hahn, EJ, Paek KY. 2006. A Simple Method for Mass Propagation of *Spathiphyllum cannifolium* Using An Airlift Bioreactor. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 42:291-297.

Dönmez D, Şimşek Ö, Kaçar YA. 2016. Genetic Engineering Techniques in Fruit Science. International Journal of Environmental and Agriculture Research, 2(12):115-128.

Enrico G, Ozudogru A, Lambardi M, Sgarbi E. 2015. Comparison Between A Conventional Culture System and Plant for Bioreactor in *Quercus robur* Micropropagation. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, San Remo, Italy, 19-24 April 2015.

Frómata 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 (PCTOC), 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, San Remo, Italy, 19-24 April 2015.

Geneyikli E. 2009. Barış Zambağı'nın (*Spathiphyllum*) Bazı Çeşitlerinde Mikroçoğaltım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Adana.

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.

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.

Hennen GR, Hotchkiss SE. 1995. Spathiphyllum: Success For Every Market. Growertalks, 599:31-36.

Kokotkiewicz A, Bucinski A, Luczkiewicz M. 2015. Xanthone, Benzophenone and Bioflavonoid Accumulation in *Cyclopia genistoides* (L.) Vent (honeybush) Shoot Cultures Grown on Membrane Rafts and in A Temporary Immersion System. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 120(1):373-378.

Lambardi M, Roncasaglia R, Bujasha D, Baileiro F, Correia Da Silva DP, Ozudogru EA. 2015. Improvement of shoot proliferation by liquid culture in temporary immersion. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, San Remo, Italy, 19-24 April 2015.

Li G, Quiros CF. 2001. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP), A New Marker System Based on A Simple PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in Brassica. TAG Theoretical and Applied Genetics, 103(2):455-461.

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. Physiologist Plant, 15:473-497.

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.

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, Karaat FE, Serçe S, Kaçar, YA. 2008. Bazı Meyve Türlerinde DNA İzolasyon Yöntemlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması. Derim, 25(1):59-69.

Umarusman MA. 2018. Adana ve Çevresinde Doğal Olarak Yetişen Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) Genotiplerinin Klasik ve Yeni Doku Kültürü Teknikleriyle Mikroçoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, s. 72.

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.

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.