

## Doku Kültürüyle Maviyemiş (*Vaccinium corymbosum* cv. Duke) Çoğaltımında Yeni Nesil Biyoreaktör Kullanımı Üzerine Bir Araştırma

Ebru AKYÜZ ÇAĞDAŞ<sup>1\*</sup>, Evrim OKUTAN<sup>2</sup>, Okan SARITOPRAK<sup>3</sup>, Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU<sup>4</sup>, Mehmet POLAT<sup>5</sup>, Hakan AKTAŞ<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Has Biotech Araştırma Geliştirme Tarım Sanayi ve Ticaret A.Ş., Antalya; ORCID:0000-0003-1630-807X

<sup>2</sup>Has Biotech Araştırma Geliştirme Tarım Sanayi ve Ticaret A.Ş., Antalya; ORCID:0009-0000-7996-5371

<sup>3</sup>Has Biotech Araştırma Geliştirme Tarım Sanayi ve Ticaret A.Ş., Antalya; ORCID:0009-0005-8106-8799

<sup>4</sup>Prof. Dr. Ankara Üniversitesi Teknokent, Doqutech Academy Ltd. Şti., Ankara; ORCID:0000-0002-3851-466X

<sup>5</sup>Doç. Dr., Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Isparta; ORCID:0000-0002-2415-4229

<sup>6</sup>Prof. Dr., Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Isparta; ORCID:0000-0001-8280-5758

### ÖZET

*Vaccinium corymbosum*, yaprak dökken çalılarının *Ericaceae* ailesine mensup çiçekli bitki olup yüksek boylu maviyemiş olarak adlandırılmaktadır. Besin değeri ve yüksek antioksidan içeriği sayesinde maviyemişin üretimine ilgi artmıştır. Buna bağlı olarak artan fidan ihtiyacının kontrollü koşullarda, hızlı ve sağlıklı olarak karşılanmasında doku kültürüyle çoğaltımın önemli yeri bulunmaktadır. Bu araştırma; *in vitro* maviyemiş bitkisi çoğaltımının optimizasyonu kapsamında, Duke çeşidinin agar içeren yarı-katı besin ortamında ve TIS biyoreaktör sisteminde (SETIS®) çoğaltım denemeleri üzerine yürütülmüştür. DKW ve WPM temel besin ortamlarına 2 mg.L<sup>-1</sup> Zeatin ve 30 g.L<sup>-1</sup> sükröz ilave edilerek pH 5.0'e ayarlanmıştır. *In vitro* çoğaltılmış sürgünlerden hazırlanan 2 cm'lik iki boğum içeren eksplantları agarlı veya sıvı ortama yerleştirilmiştir. Dört haftalık kültürün sonunda yarı-katı DKW ortamındaki ortalama sürgün proliferasyonu (adet): 13.80; ortalama sürgün boyu (mm): 29.19 iken; TIS DKW ortamında 25.56 adet; 32.79 mm olmuştur. Agarlı WPM ortamındaki değerler sırasıyla 5.28 adet ve 14.80 mm olarak elde edilmiş, TIS WPM ortamında ise 11.00 adet ve 18.97 mm olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonuçları yeni nesil 'geçici daldırma biyoreaktör sisteminin' maviyemişin *in vitro* çoğaltımında, yüksek çoğalma kapasitesi ve sağlıklı sürgünler elde etme açısından agarlı yarı-katı ortamlara göre daha olumlu sonuçlar verdiğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Blueberry, TIS biyoreaktör, sıvı ortam, kitlesele çoğaltım

**Research on the Use of a New Generation of Bioreactors in Propagation of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* cv. Duke) by Tissue Culture**

### ABSTRACT

*Vaccinium corymbosum* is a flowering plant belonging to the Ericaceae family of deciduous shrubs and is called highbush blueberry. Thanks to its nutritional value and high antioxidant content, interest in the production of blueberry has increased. Reproduction with tissue culture has an important place in meeting the growing need for seedlings in a fast and healthy manner under controlled conditions. This research; As part of the optimization of *in vitro* blueberry plant propagation, propagation trials of Duke cultivar on semisolid nutrient medium containing agar and TIS bioreactor system (SETIS®) were established. The pH was adjusted to 5.0 by adding 2 mg.L<sup>-1</sup> Zeatin and 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose to DKW and WPM basic nutrient media. 2 cm explants with 2 nodes prepared from *in vitro* propagated shoots were placed on semi-solid or liquid medium. At the end of four weeks of culture, shoot proliferation on DKW medium with agar (number): 13.80; mean shoot length (mm): 29.19; 25.56 shoots in TIS DKW medium; 32.79 mm. Values in WPM medium with agar were obtained as 5.28 shoots and 14.80 mm, respectively, and 11.00 shoots and 18.97 mm in TIS WPM medium. The results of the study showed that the new generation 'temporary immersion bioreactor system' gave more positive results in *in vitro* propagation of blueberry than semi-solid media with agar in terms of obtaining high growth capacity and healthy shoots.

**Keywords:** Blueberry, TIS bioreactor, liquid medium, mass propagation

### GİRİŞ

Maviyemiş (*Vaccinium corymbosum*), kuzey yarımkürede yetiştiriciliği yaygınlaşmış olan çok yıllık çalı formundaki üzümsü meyvelerden biridir.

Amerika'da 1900'lü yılların başında kültürü yapılmaya başlanan maviyemiş, İspanya başta olmak üzere Avrupa ülkelerinde de ticari olarak yetiştirilmektedir. Yüksek boylu, alçak boylu ve tavşan gözü olmak üzere 3 farklı maviyemiş tipinin

\*Sorumlu yazar / Corresponding author: ebruakyuz88@gmail.com

yetiştiriciliği yapılmaktadır. İki binli yılların başında Türkiye'ye yurtdışından getirilerek kültürü yapılmaya başlanan maviyemişin ait olduğu *Vaccinium* cinsi içerisindeki bazı türler, başta Karadeniz bölgesi olmak üzere Marmara ve Doğu Anadolu bölgesinin bazı kesimlerinde doğal olarak yayılış göstermektedir. Bu türlerden bazıları; *Vaccinium vitis-idea*, *V.uliginosum* ve *V.arctostaphylos*'dur [1].

Antioksidan aktiviteye sahip polifenoller bakımından zengin olması nedeniyle son yıllarda tüketiciler tarafından sağlığa faydalı bir ürün olarak talebi artmış bulunmaktadır. Dünyada yıllık maviyemiş üretimi 830 bin tona yaklaşmıştır [2]. Türkiye, 2022 yılında 4900 ton maviyemiş üreterek geçen yıllara göre önemli artış sağlamıştır [3].

Maviyemişin çoğaltımı için geleneksel yöntemler zaman alıcıdır ve seri üretimi ciddi şekilde engelleyen mevsimsel büyümeyle sınırlıdır. Mikro çoğaltım, zamandan tasarruf sağlar ve homojen, virüssüz ve sağlıklı bitkilerin üretimi için etkili bir yöntemdir [4].

Yeni nesil doku kültürü sistemi olarak da adlandırılan geçici daldırma sistemi veya biyoreaktör kullanımı, odunsu ve çoğaltılmasında sorunlar olabilen çoğu türün optimal şekilde ve hızla çoğaltımını mümkün kılmaktadır [5]. Bu konuda yapılan çalışmalar henüz yeni ve kısıtlı olsa da biyoreaktörlerin mikro çoğaltımda kullanımının pozitif etkisi görülmektedir. Bu sistemler bitki sürgünlerinin ve fidelerinin *in vitro* kültürleri için en doğal ortamı sağlamaktadır. Son birkaç yılda, geçici daldırma sistemleri, bitkilerin doku kültürüyle çoğaltımı, bitki kaynaklı sekonder metabolitlerin üretimi, protein ekspresyonu ve bitki ıslahında potansiyel çözümler için bir perspektif teknoloji olarak görülmektedir. Günümüzde, benzer veya farklı teknolojik prensipler üzerinde çalışan çeşitli yapılarda geçici daldırma sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler somatik embriyolar ve kök kültürleri dahil olmak üzere çeşitli bitkilerin *in vitro* koşullarda yetiştirilmesinde başarıyla uygulanmıştır [6].

TIS (Temporary Immersion System, Geçici Daldırma Sistemi) teknolojisinin basitçe çalışma prensibi bitki materyallerinin kısa sürelerle sıvı büyütme ortamına daldırma işlemidir. Bu daldırma süreleri bitkinin besin alımı için yeterli olmaktadır. TIS teknolojisi, sıvı kültürlerin avantajlarından yararlanırken, bitkileri yüksek gaz alışverişi ortamları altında yetiştirmektedir. TIS teknolojisinin avantajları; metrekare başına daha fazla bitki üretimi, daha yüksek çoğaltım katsayısı, sıvı ortamın kullanılması sayesinde agar maliyetlerinin azaltılması, daha etkin besin maddesi alımı, azaltılmış işlem uygulamaları ve işçilik, geliştirilmiş bitki kalitesi, zenginleştirilmiş havalandırma ve

otomasyon olarak sayılabilmekte, büyümeyi ve biyokütle üretimini artırma da sonuç olarak önemli fark oluşturmaktadır. Biyoreaktörün kapasitesi bitki türlerine bağlı olmakla beraber biyoreaktör başına 300 ilâ 1200 bitki arasında değişmekte, kültür kabı kapasitesine göre 5000'lere yaklaşabilmektedir [7].

Doku kültürü ile kitlesel çoğaltımda biyoreaktör teknolojisi birçok bitkide kullanılmaktadır. Kahve [8], patates [9], muz [10], ananas [11, 12], yüksek boylu maviyemiş [13], çoban üzümü [5], şeker kamışı [14], elma anacı [15], fındık [16], antepfıstığı [17] ve diğer odunsu türler bunlardan bazılarıdır [18, 19].

Bu çalışmanın amacı yeni nesil 'geçici daldırma biyoreaktör sistemi' kapsamında geliştirilen SETİS® biyoreaktörlerinin kullanılmasıyla yüksek boylu maviyemiş çeşidi olan 'Duke'un *in vitro* çoğaltımında, agarlı yarı-katı ortam ve TIS (geçici daldırma sistemi) arasındaki farkın belirlenebilmesi ve aynı zamanda iki farklı temel besin ortamı bileşiminin sürgün çoğaltması ve gelişmesine etkilerinin ortaya konulmasıdır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Materyal olarak ticari olarak satın alınan *Vaccinium corymbosum* 'Duke' çeşidine ait 2 yıllık fidanlar kullanılmıştır. Fidanlar satın alındıktan sonra saksılara dikilmiş, sera koşullarında bakım ve sulamaları yapılmıştır. Taze sürgünler görülmeye başladıktan sonra ilk doku kültürü denemeleri yapılmıştır.

### Metot

Çalışmada iki farklı kültüre alma sistemi kullanılmıştır. Bunlardan ilki *in vitro* ortamda cam kavanozlar içerisinde ve agar içeren yarı-katı ortamlarda yetiştirme; ikincisi ise TIS biyoreaktör içerisinde ve sıvı ortamlarda yapılan yetiştirmedir. Her iki kültür tipi eş zamanlı olarak yürütülmüştür. 2 cm'lik eksplant parçalarının tümü öncelikle agarlı ortam içeren cam kavanozlarda kültüre alınmış, kontamine eksplantlar ve gelişemeyenler elendikten sonra yeniden agarlı ortamlara veya TIS biyoreaktör sistemi (SETİS®) içerisine aktarılarak, 1. alt kültüre alınmışlardır. Alt kültür işlemi iki kez daha yapıldıktan sonra çalışma sonuçlarının belirlenmesinde 3. alt kültüre kadar kayıt altına alınan verilerden yararlanılmıştır.

### Dokuların yüzeysel sterilizasyonu

Serada gelişmekte olan bitkiler üzerinden alınan sürgün parçaları laboratuvara getirilip 15 dakika boyunca akan çeşme suyu altında bekletilmiştir. Daha sonra 4-5 cm'lik parçalara ayrılarak yüzeysel

sterilizasyona tabi tutulmuştur. Sterilizasyon aşamaları şu şekildedir;

- 1) Akan çeşme suyu altında yıkama,
- 2) %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dakika süreyle bekletme,
- 3) Birkaç damla Tween 20 ilave edilmiş %15'lik ticari sodyum hipoklorit (ACE) çözeltisinde 15 dakika bekletme,
- 4) Steril saf su ile 3 defa 5'er dakika durulama.

*Besin ortam bileşimlerinin hazırlanması ve sterilizasyonu*

Çalışmada besin ortamı olarak Driver&Kuniyuki (DKW) [20] ve McCown's Woody Plant (WPM) [21] temel besin ortamları kullanılmıştır. 2 mg.L<sup>-1</sup> Zeatin, 3% (w/v) sükröz ve 6 g.L<sup>-1</sup> agar eklendikten sonra, ortam pH 5.0'a ayarlanmıştır. Besin ortamları otoklavda 1 atmosfer basınç altında 121°C'de 20 dakika süreyle steril edilmiştir. Agar içeren ortamlar cam kavanozlara 40'er mL doldurulduktan sonra otoklavlanmış, geçici daldırma sistemi için hazırlanan sıvı ortamlar ise otoklavlanabilir kapaklı şişelerde sterilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve önceden steril edilmiş SETIS® marka biyoreaktörlere kabin içerisinde aseptik koşullar altında aktarılmıştır. Biyoreaktör kutuları, borular ve filtrelerin sterilizasyonunda 121°C'de 1 atmosfer basınç uygulayan otoklavda 15 dakika süre kullanılmıştır.

*Kültüre alma işlemi*

Sera koşullarında yetiştirilen maviyemiş bitkilerinden alınan sürgünlerden hazırlanan eksplantlar, agarlı ortamlarda kültüre alındıktan 4-6 hafta sonra aksillar sürgünler vermeye başlamıştır. *In vitro* çoğaltılmış sürgünlerden hazırlanan 1,5-2 cm'lik iki boğum içeren eksplantları agar içeren cam kavanozlara veya sıvı ortam bulduran TIS biyoreaktör sistemine yerleştirilmiştir. Kavanozlar içerisine 20'şer iki boğumlu eksplantı, TIS sistemi içerisine ise 500'er adet iki boğum bulduran sürgün parçası yerleştirilmiştir. Her bir SETIS® biyoreaktör içerisine 1000 mL besin ortamı konulmuştur. Kültürler 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyot ve 24°C sıcaklığa ayarlanmış bitki büyütme odalarında inkübasyona bırakılmıştır.

Geçici daldırma sistemindeki daldırma ve bekleme süreleri; her 8 saatte bir besin ortamı 5 dakika boyunca eksplantlar ile temas edecek ve ardından süzülecek şekilde zamanlayıcı prizler ile ayarlanmıştır. Ayrıca yine 8 saatte bir bitkilerin bulunduğu kültür kabına 3 dakikalık süre boyunca ventilasyonu sağlamak amacıyla hava verilmiştir. Hava sağlayıcısı olarak akvaryum pompaları kullanılmıştır.

*Ölçüm ve değerlendirme*

Maviyemiş'in *in vitro* koşullarda hızlı ve klonal çoğaltımının amaçlandığı bu çalışmada, klasik doku kültürü sistemi ile TIS biyoreaktör sisteminin bitki kalitesi ve çoğalma katsayısı üzerine etkileri iki farklı besin ortam çeşidinde incelenmiştir. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekerrürlü olacak şekilde yürütülmüştür. Mikro çoğaltım denemelerinde üç kez alt kültür yapılmış olup, alt kültürlerdeki bitki ölçümlerinin ortalamaları kullanılmıştır. Her iki uygulamada da bitkiler, 4 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Uygulamalarda 25'er bitkide; sürgün boyu (mm), eksplant başına sürgün sayısı (kardeş/bitki) ölçülerek kayıt altına alınmıştır. Elde edilen veriler ANOVA programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş ve uygulamalar arasındaki farklılıkların rastlantısal olup olmadığı incelenerek Duncan harflendirmesi yapılmıştır.

•*Eksplant başına sürgün (kardeş/bitki) sayısı*: Her eksplantta gelişen aksillar sürgünler sayılmış ve sürgün veren eksplantların ortalaması alınmıştır.

•*Ortalama sürgün boyu*: Her alt kültürden sonra sürgün boyu ölçülmüş (mm), ortalamaları alınmıştır.

4 haftanın ardından aksillar sürgün (kardeş) sayıları, boğum sayımları ve boy ölçümleri yapılmıştır.

## BULGULAR

Agar içeren iki farklı besin ortamı bulduran cam kavanozlarda veya sıvı ortamların kullanıldığı biyoreaktörlerde kültüre aldıktan sonra 3 alt kültür sonrasında her bir sürgün eksplantından 4 hafta içerisinde elde edilen aksillar sürgün sayıları bakımından, sistemler ve besin ortamları arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılıklar belirlenmiştir (Çizelge 1).

DKW ve WPM ortamlarının sıvı ve yarı-katı kullanımlarının yer aldığı çalışmada her ne kadar besin ortamları kendi arasında ve kültür sistemleri de kendi aralarında istatistiksel farklılık göstermiş olsa da besin ortamı × kültür sistemi interaksiyonunun p<0,001 seviyesinde önemli bulunması nedeniyle her iki faktör birlikte değerlendirilerek bir sıralama yapılmasına öncelik verilmiştir. Buna göre *V.corymbosum* 'Duke' çeşidinin mikro çoğaltımında uygun besin ortamı ve kültür sisteminin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, DKW ortamında TIS sisteminden elde edilen aksillar sürgün sayısı ortalaması, 25.56 adet/ eksplant değeri ile ilk sırada yer almıştır. İkinci sırada en yüksek kardeş sürgün sayısı değeri, agar ile yarı-katı olarak hazırlanmış cam kavanozlardaki uygulamalardan alınmıştır (13.80 sürgün/eksplant). WPM ortamının kullanıldığı

TIS sistemi üçüncü sırada yer alırken (11.00 sürgün/eksplant), son sırada ve en düşük kardeş sürgün sayısını veren kombinasyon WPM ortamı × yarı-katı ortam olmuştur (5.28 sürgün/eksplant).

Besin ortamları bileşimleri, kültür sisteminden bağımsız olarak değerlendirildiğinde DKW ortamının, WPM ortamına göre iki kat daha fazla sayıda aksillar sürgün oluşumu sağladığı görülmüştür. Çizelge 1 incelendiğinde, DKW ortamında her iki ortam fazında eksplant başına ortalama 19.68 adet sürgün elde edildiği halde, bu sayı WPM ortamında sadece 8.14 adet olmuştur.

Çizelge 1. TIS sistemi ve yarı-katı ortamların Duke maviyemiş çeşidinde sürgün çoğalması üzerine etkisi

Besin ortamı	Kültür sistemi	Aksillar sürgün sayısı (adet)
DKW	Yarı-katı	13,80±1,12 b
	TIS	25,5±2,35 a
	Ortalama	19,68±6,21 A
WPM	Yarı-katı	5,28±0,98 d
	TIS	11,00±2,53 c
	Ortalama	8,14±3,46 B
Toplam	Yarı-katı	9,54±4,43 B
	TIS	18,28±7,74 A
	Ortalama	13,91±7,66

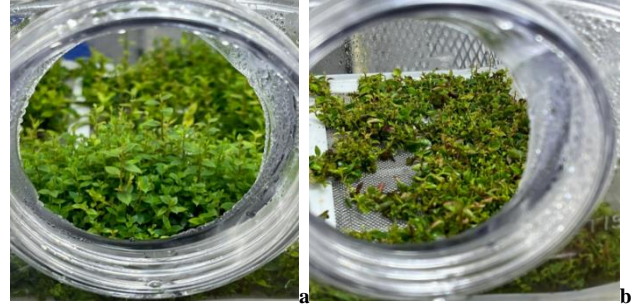
\*p<0,001 düzeyinde, Besin ortamı × Kültür sistemi arasında interaksiyon önemli olup (küçük harfler), ortamlar (büyük harfler) ve sistemler (italik büyük harfler) arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemlidir.



Şekil 1. Agarlı ortamdaki bitkilerin sürgün proliferasyonu aşamasından görüntüler

Besin ortamı fazı esasına dayanan kültür sistemleri arasında da sürgün oluşumu bakımından önemli düzeyde farklılık olduğu ortaya konmuştur. Her iki ortam bir arada değerlendirilerek alınan ortalamalar üzerinden yapılan değerlendirmede, geçici daldırma SETIS® biyoreaktör sisteminde Duke maviyemiş sürgün proliferasyonunun, yarı-katı ortama göre iki kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. DKW ve WPM ortamlarının toplamı olarak biyoreaktör kullanıldığında eksplant (iki adet boğum bulunduran sürgün parçası) başına 18.28 adet aksillar sürgün meydana gelirken, yarı-katı ortam kullanılan cam kavanozlarda eksplant başına 9.54 adet kardeş sürgün oluşmuştur. Şekil 1'de agar içeren yarı-katı

ortam bulunan cam kavanozlarda, Şekil 2'de ise SETIS® biyoreaktör sisteminde sıvı ortamda geçici daldırma kullanılarak elde edilen gelişmeler gösterilmiştir.



Şekil 2. TIS içerisindeki bitkilerin sürgün proliferasyonu aşamasından görüntüler (a: DKW, b: WPM)

Sürgün boyları bakımından yapılan ölçümler değerlendirildiğinde, yapılan ANOVA testi sonucunda besin ortamı × kültür sistemi arasında interaksiyon bulunmadığı (p<0,001), istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturan faktörün besin ortamı bileşimi olduğu sonucu elde edilmiştir (Çizelge 2). Buna göre, DKW ortamında bulunan sürgünlerin daha uzun boya sahip oldukları anlaşılmıştır. Ortalama 30.99 mm sürgün boyu DKW ortamından alınırken, bu değer WPM ortamında 16.89 mm olmuştur. Bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sıvı veya yarı-katı ortamda olmaları ise sürgün uzunluğu bakımından istatistiksel olarak önemli görülmeyecek farklılıklar içermiştir.

Çizelge 2. TIS sistemi ve yarı-katı ortamların Duke maviyemiş çeşidinde sürgün boyları (mm) üzerine etkisi

Besin ortamı	Kültür sistemi	Ortalama sürgün uzunluğu (mm)
DKW	Yarı-katı	29,19±2,16
	TIS	32,79±0,92
	Ortalama	30,99±2,45 a
WPM	Yarı-katı	14,80±1,13
	TIS	18,98±2,02
	Ortalama	16,89±2,66 b
Toplam	Yarı-katı	22,0±7,47
	TIS	25,89±7,15
	Ortalama	23,94±7,53

\*p<0,001 düzeyinde, besin ortamları (küçük harfler) arasındaki farklılık da istatistiksel olarak önemlidir.

## TARTIŞMA

Dünya üzerinde oldukça yaygın olarak yetiştirilen ticari maviyemiş çeşidi Duke eksplantları kullanılarak yapılan mikro çoğaltım çalışmasında, besin ortamı bileşimlerinin etkisi ve besin ortamı fazı esasına dayanan iki farklı kültür sisteminin etkisi incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre sürgün çoğaltımı özelliği üzerine hem besin ortamının içeriği

hem de yapısı yani yarı-katı veya sıvı fazda kullanılması, önemli düzeyde ve birlikte etki yapmıştır. Sürgün boyu bakımından ise besin ortamı içeriğinin önemi daha etkili bulunmuştur.

SETIS® biyoreaktör sisteminin yer aldığı geçici daldırma sistemi içerisindeki bitkiler, agarlı ortama göre daha iyi gelişme göstermiş ve daha fazla sayıda kardeş sürgün oluşturmuştur. Besin ortamı bileşimi çalışmada sürgün çoğalması ve uzaması bakımından çok etkili bulunmuş olup, DKW ortamı, WPM ortamına göre iki katından fazla sayılabilecek başarı sağlamıştır.

Clapa vd. [16], *V.corymbosum* ‘Duke’ ve *Coryllus avellana* ‘Tonda di Giggoni’ çeşitlerinin Plantform® biyoreaktörde etkili bir çoğaltım yöntemi geliştirmek istedikleri çalışmalarında kültür kaplarına 300, 400 ve 500 ml besin ortamları eklediklerinde; yüksek proliferasyon oranının maviyemiş için 500 ml besin ortamın içeren biyoreaktörde ( $6.20 \pm 0.81$ ) alındığını bildirmektedir. Ayrıca maviyemiş’te en uzun sürgün boyunun 400 mL sıvı besin ortamı içeren biyoreaktörde ( $4.19 \pm 0.25$  cm) olduğu belirtilmektedir. Besin ortamı olarak WPM temel alınmış  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  Zeatin ile desteklenmiştir. Bizim çalışmamızda WPM temelli  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  Zeatin içeren ortamda da en yüksek sürgün boyunun, istatistiksel olarak önemli bir vurgu olmasa da agarlı ortama kıyasla (14.8 mm) TIS sisteminden elde edildiği (18.98) bulunmuştur. Ayrıca sürgün çoğalması (25.56 sürgün/eksplant) ve sürgün uzaması (32.79 mm) bakımından DKW temel besin ortamı ve  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  Zeatin içeren TIS sisteminin öne çıktığı belirlenmiştir.

Burada sonuçları sunulmamış olmakla birlikte çalışmamızda 2. ve 3. alt kültürlerde sürgün sayısı ve ortalama sürgün boyu özellikle TIS sisteminde giderek daha da yükselmiştir. Benzer sonuç Debnath ve McRae (2001)’nin, turnayemişi (*V.macrocarpon*) ile yaptıkları çalışmada da bildirilmiştir. Bununla birlikte anılan çalışmada sürgün sayısı 1.8’den 2.9 adete çıkarken; sürgün uzunluğu 6.2 cm’den 5.6 cm’ye doğru gerilemiştir [22]. Arencibia vd. [23], TIB olarak adlandırdıkları (Twin-Flasks) sistemde çoğaltılan maviyemiş bitkilerinin (Biloxi, Sharp Blue ve Brillita çeşitleri), geleneksel yaklaşımla doku kültürüne alınanlara göre daha yüksek büyüme ve çoğalma oranı verdiklerini belirlemişlerdir. Dış koşullara alıştırma sırasında da bu sistemden gelen bitkilerin adaptasyon kabiliyetinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Burada bir bölümü sunulan projemizin ilk aşamasında en uygun temel besin ortamı, PGR çeşit ve dozlarının incelendiği aşamada  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  Zeatin kullanımı, en başarılı kültüre alma ve çoğalma etkilerini desteklemiştir. Bu nedenle çalışmamızda

sadece bu büyümeyi düzenleyici kullanılmış ve her iki sistemde de olumlu sonuç vermiştir. Nitekim alçak boylu (Lowbush) maviyemiş (*V.angustifolium* Ait.) ‘Fundy’ çeşidi ve iki yabancı klon kullanılan bir başka çalışmada da yarı-katı jelleşmiş ortamla birleştirilmiş RITA® biyoreaktörlerini kullanarak mikro çoğaltım protokolü geliştirilmiş ve denemede yer alan N6-[2-isopentenyl] adenine ve Zeatin arasından en iyi sonuç Zeatin içeren ortamdan elde edilmiştir [24].

Biyoreaktör sisteminin maviyemiş mikro çoğaltımında başarıyla kullanılabileceği, yarı-katı ortamlara göre pek çok avantajlarının bulunduğu bu çalışmayla ortaya konmuştur. Başka bitki türlerinde de benzer bulgular elde edilmiştir. Örneğin Dewir vd. [25], *S.cannifolium* bitkisinde, katılaştırılmış ortam ve biyoreaktör kültürleri (sürekli ve geçici daldırma) arasındaki çalışmaları karşılaştırdıklarında, sürgün çoğaltımı ve gelişmesinde düşük sitokinin konsantrasyonları ile desteklenmiş geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinin daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Özden vd. [26], Edremit yağlık zeytin genotipine ait yaşlı ağaçlardan alınan nodal tomurcukları *in vitro* çoğaltımında mannitol içeren sıvı OM besi ortamında TIS sistemi ile gövdelerde apikal dominansın kırılıp yanal gövdelerin gelişme gösterdiğini ve çoklu gövde oluşumunun gerçekleştiğini göstermiştir. Umarusman vd. [27], beş farklı böğürtlen çeşidinin (Black Diamond, Black Pearl, Chester, Triple Crown ve New Berry) Plantform® biyoreaktör sistemi ve katı besin ortamlarında karşılaştırmalı olarak mikro çoğaltım ve köklendirme üzerine yaptıkları çalışmada; mikro çoğaltım ve köklendirme için belirlenen en iyi besin ortamı içeriği ile TIS sisteminde çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, geçici daldırma sistemi her beş böğürtlen çeşidi için bitki boyu, çoğalma katsayısı, bitki kalitesi ve köklenme bakımından katı kültür sistemine göre daha iyi sonuç vermiştir. Cengiz ve Kaçar [28] ise, ‘Tuzcu 31-31 turuncu’ ve ‘C-35 sitranji’ turuncgil anaçlarının, *in vitro*’da geleneksel katı kültür ve geçici daldırma prensibine dayanan Plantform® biyoreaktör sistemi ile karşılaştırmalı olarak mikro çoğaltım ve köklendirme denemeleri yürütmüştür. Çalışma sonucunda, her iki genotipte de kardeşlenme ortamında, Plantform® sistemi bitki kalitesi bakımından daha iyi sonuç vermiştir.

Literatürden de anlaşılacağı üzere sıvı besin ortamlı biyoreaktör sistemleri yarı-katı besin ortamlı *in vitro* sistemlerine göre hem çoğalma katsayısı hem de bitki boyu açısından daha iyi sonuçlar vermektedir. Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular da literatür ile uyum halindedir. Ayrıca yüksek üretim maliyetleri, geleneksel mikro çoğaltım sistemlerini (agar bazlı) büyük ölçekli üretim için daha kullanışsız hale getirdiğinden, sıvı kültürler ve otomasyon, mikro

çoğaltımın çeşitli aşamalarının bireysel emeğe dayalı olarak yürütülmesi sorununu çözme potansiyeline sahiptir [19]. Biyoreaktör kültürleri ayrıca hava değişimi, fotosentetik foton akışı ve CO<sub>2</sub> içeriği gibi hem fiziksel hem de kimyasal açıdan ortam performansını artırarak *in vitro* mikro çoğaltım sırasında daha verimli bitki gelişimi ve çoğalması sağlamaktadır [29-31]. Agar gerektirmemesi, daha az alanda daha fazla bitki üretimi yapılabilmesi nedeniyle üretim maliyetinden tasarruf sağlamaktadır. Ayrıca sisteme pompa, zamanlayıcı ve elektrik valfinin bağlanması kolay olmasının yanında biyoreaktörler uzun raf ömrü nedeniyle çevreye dost sistemler olarak kabul edilmektedir [32].

## SONUÇ

Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular yeni nesil 'geçici daldırma biyoreaktör sisteminin' maviyemişin *in vitro* çoğaltımında, yüksek çoğalma kapasitesi ve sağlıklı sürgünler elde etme açısından agarlı yarı-katı ortamlara göre daha olumlu sonuçlar verdiğini göstermiştir. Başta yüksek boylu maviyemişler olmak üzere diğer maviyemiş grupları ve üzümü meyve gruplarında bitkilerin hızlı çoğaltılması konusunda araştırmacılara yararlı olacak veriler elde edilmiştir.

Sonuç olarak, yeni nesil 'geçici daldırma biyoreaktör sisteminin' avantajları değerlendirildiğinde; büyük çaplı üretim çalışmalarında bu sistemin kullanılabilirliği ortaya konulmuş ve bu çalışma yüksek boylu maviyemiş bitkisinin TIS (SETIS®) biyoreaktör sisteminde çoğaltılmasının uygun olduğunu kanıtlar nitelikte sınırlı çalışmalardan biri olmuştur. Buna göre maviyemişin hızlı çoğaltımı için TIS biyoreaktör içerisinde 4-8 hafta arası 2 mg.L<sup>-1</sup> Zeatin içeren DKW ortamında sürgünlerin en az 2 boğum içerecek şekilde parçalara ayrılması yöntemiyle çoğaltılması önerilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK TEYDEB 7210364 numaralı projenin bir bölümünden hazırlanmıştır. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

## KAYNAKLAR

1. Doğu Karadeniz Kalkınma Ajansı Faaliyet Raporu, 2015.
2. Anonim, 2021. Blueberry global production and top producing countries. <https://www.tridge.co/intelligences/blueberry/production> (Erişim Tarihi: 20.02.2021).

3. Anonim, 2022. TÜİK (2022). Maviyemiş üretim değerleri. [tuikweb.tuik.gov.tr](http://tuikweb.tuik.gov.tr) (Erişim Tarihi: 04.09.2023).
4. Meiners, J., Schwab, M., Szankowski, I. 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89, 169-176.
5. 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* doi:10.15666/aeer/1801\_16111620. 18(1):1611-1620.
6. Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences* 14(6):607-621.
7. <https://setis-systems.be/about/tis-technology> (Erişim Tarihi: 04.09.2023)
8. Albarran, J., Bertrand, B., Lartaud, M., Etienne, H. 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81(1):27-36.
9. Piao, X.C., Chakrabarty, D., Hahn, E.J., Paek, K.Y. 2003. A simple method for mass production of potato micro tubers using a bioreactor system. *Current Science* 84(8):1129-1132.
10. Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M.J., Sandoval, J., Debergh, P. 2005. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82:57-66.
11. Scherer, R.F., Garcia, A.C., de Freitas Fraga, H.P., Dal Vesco, L.L., Steinmacher, D.A., Guerra, M.P. 2013. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae* 151:38-45.
12. Escalona, M., Samson, G., Borroto, C., Desjardins, Y. 2003. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micro propagated pineapple plantlets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39:651-656.
13. Ross, S., Castillo, A. 2009. Propagación masal de *Vaccinium corymbosum* en bioreactores. *Agrociencia Uruguay* 13(2):1-8.
14. Lorenzo, J.C., González, B.L., Escalona, M., Teisson, C., Borroto, C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion

- system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54(3):197-200.
15. Chakrabarty, D., Hahn, E.J., Yoon, Y.J., Paek, K.Y. 2003. Micropropagation of apple rootstock M.9 EMLA using bioreactor. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78(5):605-609.
  16. Clapa, D., Harta, M., Borsai, O., Pamfil, D. 2019. Micropropagation of *Vaccinium corymbosum* L. and *Corylus avellana* L. using a temporary immersion bioreactor system. *Agricultura* (3-4): 111-112.
  17. Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y., Çiftçi, Y.O. 2014. Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 117, 65-76.
  18. Ibaraki, Y. 2001. Automation in somatic embryo production. *Progress in Biotechnology* 18:365-374.
  19. Paek, K.Y., Chakrabarty, D., Hahn, E.J. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp:95-116.
  20. Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience* 19(4):507-509.
  21. Lloyd, G., McCown, B. 1981. Commercially-feasible micro-propagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators Society* 30:421-427.
  22. Debnath, S.C., K.B. McRae, 2001. An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:243-249.
  23. Arencibia, A.D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B., Bravo, C., Garcia-Gonzales, R. 2013. An approach for micropropagation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plants mediated by temporary immersion bioreactors (TIBs). *American Journal of Plant Sciences*, 4(5), Article ID:32135. doi:10.4236/ajps.2013.45126.
  24. Debnath, S.C. 2009. A scale-up system for lowbush blueberry micropropagation using a bioreactor. *HortScience* 44(7):1962-1966.
  25. Dewir, Y.H., Chakrabarty, D., Hahn, E.J., Paek, K.Y. 2006. A simple method for mass propagation of *Spathiphyllum cannifolium* using an airlift bioreactor. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 42:291-297.
  26. Özden, Y., Özüdoğru, E.A., Ergun, K., Akdemir, H., 2010. Zeytin (*Olea europaea*) bitkisinin geçici daldırma biyoreaktör sistemleri (TIS) ile *in vitro* sürgün çoğaltımının iyileştirilmesi. *Zeytin Bilimi* 1(1):1-6.
  27. Umarusman, M.A., Şimşek, Ö., Biçen, B., Serçe, S., Kaçar, Y.A. 2020. Farklı böğürtlen (*Rubus fruticosus* L.) çeşitlerinin klasik ve yeni nesil doku kültürü teknikleri ile mikro çoğaltım olanaklarının araştırılması. *Alatarım* 19(2):75-84.
  28. Cengiz, M., Kaçar, Y.A. 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.
  29. Lyam, P.T., Musa, M., Jamaledine, Z., Okere, U.A., Odofin, W.T. 2012. Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) potential in meeting crop production demand in Nigeria. *Journal of Biology and Life Sciences* 3(1):66-86.
  30. Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Rohsius, C., Ndoumou, D.O., Lieberei, R. 2008. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Reports* 27:667-676.
  31. Liu, L., Li, S., Yu, K., Tang, H., Liu, H., Dan, M., Lu, M. 2010. Rapid propagation of virus-free sugarcane plantlets via temporary immersion bioreactor system. *Agricultural Science & Technology-Hunan* 11(5):148-190.
  32. Welander, M., Sayegh, A., Hagwall, F., Kuznetsova, T., Holfors, A. 2016. Technical improvement of a new bioreactor for large scale micropropagation of several *Vaccinium* cultivars. In 11. International *Vaccinium* Symposium 1180, 387-392.