



Farklı Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) Genotiplerinin Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleriyle Mikroçoğaltımı

Mustafa Alparslan UMARUSMAN^{1,2*} Yıldız AKA KAÇAR¹

¹Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana/Türkiye

²Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi, Tarım ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümü, Konya/Türkiye

*Sorumlu Yazar

E-mail: mustafa.alp.umarusman@gmail.com

Geliş Tarihi: 24 Aralık 2018

Kabul Tarihi: 31 Aralık 2018

Özet

Bu çalışmada, Akdeniz Bölgesinde doğal olarak yayılım gösteren üç farklı keçiboynuzu genotipinin Plantform biyoreaktör sistemi ve katı besin ortamlarında karşılaştırmalı olarak mikroçoğaltım çalışmaları yürütülmüştür. İlk olarak genotiplerin katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde, MS, ½ MS ve WPM besin ortamları ile BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) ve GA₃ (0.1, 0.5 mg/L) bitki büyüme düzenleyicileri uygulanmıştır. En yüksek mikroçoğaltım değerleri, MS ve ½ MS besin ortamlarından ve 0.5 ve 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarından elde edilmiştir. Mikroçoğaltım için belirlenen en iyi besin ortamı içeriği ile Plantform sisteminde çalışılmıştır. Çalışma neticesinde, Plantform sistemi her üç keçiboynuzu genotipi için bitki boyu, çoğalma katsayısı ve bitki kalitesi bakımından katı kültür sistemine göre daha iyi sonuç vermiştir. SSR markırları ile yapılan tarama sonucunda katı kültür ortamı ve Plantform sisteminde çoğaltılan bitkilerde herhangi bir genetik açılımın olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Plantform Geçici Daldırmalı Biyoreaktör Sistem, MS, WPM, Keçiboynuzu, *Ceratonia siliqua* L.

Micropropagation of Different Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Genotypes by Classical and New Generation Tissue Culture Techniques

Abstract

In this study, micropropagation studies were carried out in comparative Plantform bioreactor system and solid media with three different carob genotypes which are growing naturally in the Mediterranean Region. First of all, micropropagation of carob genotypes were evaluated in solid MS, ½ MS and WPM media supplemented with BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) and GA₃ (0.1, 0.5 mg/L) for micropropagation. Based on the solid media, the best results in all three genotypes were obtained from MS and ½ MS medium containing 0.5 and 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ plant growth regulatory concentrations for micropropagation. Micropropagation studies were carried out in the Plantform system with the best-defined media content. As a result of studies, Plantform system showed better plant growth, multiplication coefficient and plant quality than solid culture system in all three genotypes propagation medium. Genetic stability of plants grown in solid culture and Plantform systems was tested by SSR markers.

Keywords: Plantform Temporary Immersion Bioreactor Systems, MS, WPM, Carob, *Ceratonia siliqua* L.

GİRİŞ

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) yeryüzünün en eski bitkilerinden birisidir. İlk olarak M.Ö. 4000 yıllarında Mısır'da ortaya çıktığı tahmin edilmektedir [1]. Türkiye'de Akdeniz Bölgesi başta olmak üzere Ege ve Marmara Bölgelerinde de yetiştiriciliği yapılmaktadır. Anavatanı olan ülkemizde yabancı formda doğal olarak yetişmekle birlikte, ticari çeşitleri de bulunmaktadır. Bu meyve türü ülkemizde, İzmir Urla'dan başlayarak, Hatay'ın Samandağ ilçesine kadar olan 1750 km'lik kıyı şeridinde kadar uzanan geniş bir alanda yayılım göstermektedir. Türkiye'de yetişen çeşitleri etli, susam ve yabancı tipleridir [2]. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü [3] 2017 yılı verilerine göre ülkemiz 2017 yılı itibarıyla 15.000 ton keçiboynuzu üretilmiştir.

Keçiboynuzu meyvelerinin ve tohumlarının farklı kullanım alanları bulunmaktadır. Keçiboynuzu mineral madde açısından zengin bir meyvedir. Potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, sodyum, selenyum, demir ve bakır

keçiboynuzunda bulunmakta olan minerallerdir [4]. Meyveler gıda endüstrisinde doğrudan tüketilmekle birlikte, katkı maddesi olarak insan beslenmesinde kullanılmakta ve diğer endüstri kollarında da değerlendirilmektedir.

Gün geçtikçe önemi ve tarımsal üretimdeki payı gittikçe artan keçiboynuzu, bu ivmeye bağlı olarak üretim materyali olan fidan talebini de artırmaktadır. Normal şartlar altında çöğür ya da yoz anaçlar üzerine aşılanarak üretilen keçiboynuzu fidanlarının dikim olgunluğuna gelmesi, anaç bitkinin aşılanma olgunluğuna erişmesi üç yıl, aşılamadan sonraki bir yıllık olgunlaşma süresiyle beraber dört yıllık bir süreyi kapsamaktadır. Bu durum aşılanmış bir keçiboynuzu fidanın üretim maliyetlerini büyük ölçüde artırmaktadır. Buna bağlı olarak üretim yapmak isteyen girişimciler için fidan temin etmede maliyet açısından sorunlar ortaya çıkmaktadır.

Ülkemizde uzun yıllardan beri doku kültürü çalışmalarıyla çok sayıda bitki türü *in vitro* şartlarda başarıyla

üretilmektedir. Bu sistem içerisinde çoğunlukla katılaştırıcı “agar” kullanılarak katı ortam kültürlerinde eksplantlar kültüre alınmaktadır. Agar ve diğer katılaştırıcı bileşenler doku kültüründe girdi maliyeti en yüksek olan bileşendir. Ayrıca klasik doku kültürü tekniklerinin yoğun işgücü gerektirmesinin yanı sıra üretim maliyetleri de oldukça yüksektir. Klasik katı kültür yöntemlerinde çok sayıda kültür kabına gereksinim duyulmakta ve bu durum iklimlendirme ortamlarının büyüülmesini zorunlu hale getirmektedir. Tüm bu zorlayıcı durumlar doku kültürü aracılığıyla üretimin endüstriyel boyutta geliştirilmesine engel olmaktadır [5]. Son yıllarda üretim maliyetlerinin azaltılarak kısa zamanda büyük ölçekte üretimin yapılabileceği üretim tekniklerinin gelişmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Uygun protokollerin kurulması halinde, katı kültürden daha etkili üretim olanakları taşıyan sıvı kültürlerin kullanılması ön plana çıkmaktadır.

Katı kültür sistemlerinde katı besin ortamına yerleştirilen eksplantların gelişmelerinde sürekliliğin sağlanması için periyodik olarak altkültüre alınmaları zorunludur. Her bir altkültür sırasında besin ortamlarında kontaminasyon görülme olasılığı artmaktadır. Katılaştırıcı bileşenlerin kullanıldığı katı besin ortamlarında gerçekleştirilen doku kültürü çalışmaları, sıvı besin ortamında yapılan doku kültür çalışmaları ile kıyaslandığında katı kültür ortamlarında kontaminasyon oluşma riski daha yüksektir [6].

Katı kültür sistemlerinde karşılaşılan sorunlar sebebiyle sıvı kültür ortamları tercih edilerek daha büyük oranda kitlesel üretim yapmak mümkündür. Buna karşın sıvı kültür ortamlarında en çok karşılaşılan problem bitki materyalinin sıvı besin ortamına sürekli temas etmesi sebebiyle eksplantlarda meydana gelen vitrifikasyon (camlaşma) olayıdır. Bu sorun sebebiyle son zamanlarda geliştirilen ve bitkinin belirli aralıklarla sıvı yüzeyden uzaklaşmasını mümkün kılan geçici daldırma sistem biyoreaktörler kullanılmaktadır. Geçici daldırma sistem biyoreaktörler, ilk olarak Haris ve Mason (1983) tarafından geliştirilmiş olup ilk başarılı bitki rejenerasyon sonuçları *Solanum tuberosum* ve *Coffea arabicana*'nin somatik embriyolarından elde edilmiştir [7].

Geçici daldırma sistem biyoreaktörlerde diğer biyoreaktör sistemlerinden farklı olarak eksplantlar ile sıvı besin ortamı arasında zaman zaman geçici temas sağlayabilen bir yüzey geliştirilmiştir. Hava akımı ile ortam belirli aralıklarla yukarı doğru çıkarak bitkinin ihtiyaç duyduğu besin maddelerine ulaşması sağlanmaktadır. Daldırma işlemi süresince hava akımı ve besin ortamı bitkiye nüfuz ederek materyale zarar vermeden dokulara iletilmektedir. Biyoreaktörlerde kitlesel bitki üretim protokollerinin kurulabilmesi için, katı kültür ve sıvı ortamlarda optimum kültür koşullarının belirlenmesi büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışma kapsamında Adana ve çevresinde doğal olarak yetişen 3 keçiboynuzu genotipinin, klasik katı kültür besin ortamı ve geçici daldırma biyoreaktör sistemleri arasında yer alan Plantform kültür kapları kullanılarak mikroçoğaltım çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla ilk olarak katı kültür besin ortamlarında farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonları kullanılarak her üç genotipinde en başarılı besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları tespit edilmiştir. Ardından belirlenen bu ortam ve bitki büyüme düzenleyici içerikleri ile Plantform sistemleri kullanılarak mikroçoğaltım çalışmaları yürütülmüştür. Mikroçoğaltımı gerçekleştirilen genotiplerde Plantform sistemi ya da diğer faktörlerden kaynaklanabilecek herhangi bir somaklonal varyasyonun tespit edilmesi amacıyla, kültüre alınan ilk bitkilerden ve ara aşamalarda alınan bitki materyallerinden DNA izolasyonu yapılarak SSR markırlarıyla genetik kararlılıkları

karşılaştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bitkisel Materyal

Bu çalışmada Adana ve çevresinde doğal olarak yetişen ve ticari öneme sahip olan, Kıbrıs ve Monoik adlı genotipler, Adana'nın Kozan ilçesinde bulunan ticari bir işletmeden temin edilmiştir. Kıbrıs genotipi, sofralık olarak taze tüketimde, pekmez ve un yapımında ve hayvan yemi rasyonlarında kullanılan, üzerinde sadece dişi çiçek bulunduran, yüksek alkali ve taşlı toprak koşullarında iyi gelişme gösterebilen bir genotiptir. Ticari olarak öneme sahip diğer genotip ise endüstriyel amaç için tercih edilen Monoik genotipidir. Elverişsiz topraklarda güçlü bir kök gelişimi gösterebilen, üzerinde hem dişi hem erkek çiçekleri bulunduran, bahçe plantasyonları için tozlayıcı olarak da kullanılma potansiyeline sahip olan bir genotiptir. Monoik genotipi, meyvelerinde fazla tohum oluşturma yeteneğine sahiptir. Her bir meyve içerisinde 12-17 adet tohum oluşturur. Bu nedenle endüstriyel amaçlı hammadde olarak kullanılan tohumları için tercih edilmektedir. Ayrıca Adana ili içerisinde peyzaj amaçlı kullanılan, düzgün bir habitusa sahip ve üzerinde sadece erkek çiçek bulunduran Adana genotipinin sürgün uçları ve internodları bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

YÖNTEM

Bitkisel Materyalin Temin Edilmesi

Çalışmada kullanılan keçiboynuzu genotiplerinden sürgün uçları ve internodları bahçe makasıyla kesilerek nemlendirilmiş filtre kağıtlarına sarılmış ve laboratuvara getirilmek üzere soğutucuda saklanmıştır. Bitkinin sürgün uçları ve yaprak koltuklarındaki tomurcuklar eksplant olarak kullanılmıştır.

Yüzey Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan sürgün uçları ve internodlar 2 cm uzunluğunda kesilerek çeşme suyu altında 30 dk boyunca yüzeyde bulunan partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla yıkanmıştır. Daha sonra steril kabin içerisinde %70 oranında etil alkol çözeltisinde 3 dk bekletildikten sonra %0.3'lük cıva klorür ($HgCl_2$) çözeltisi içerisinde 10 dk bekletilmiş ve sonrasında %20 oranında sodyum hipoklorit ($NaClO$) içeren solüsyonda 20 dk süre boyunca bekletilerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Eksplantlar köptük gidene kadar steril saf su ile durulanıp steril filtre kağıdında kurulandıktan sonra kültür kaplarına transfer edilmiştir.

Katı Kültür Mikroçoğaltım Denemeleri

Genotiplere ait sürgün uçları ve internodlar, *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım denemelerini kurmak amacıyla MS, ½ MS ve WPM besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Mikroçoğaltım denemelerinde bitki büyüme düzenleyicilerinden BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L), GA_3 (0.1, 0.5 mg/L)'nin kombinasyonları uygulanmış ve başlangıç bitkileri için içerisinde 15 ml besi yeri içeren tüplerde eksplantlar kültüre alınmıştır. Besin ortamlarının içerisine 30 g/L sükröz ve 7.5 g/L agar ilave edilmiştir. Ayrıca ortam içerisine kontaminasyon riskine karşı 1mg/L oranda PPM eklenmiştir. Ortamların pH'sı 5.8 olarak ayarlanmıştır. Deneme süresince bitkicikler, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ve 25°C sıcaklık altında iklim odalarında kültüre alınmıştır. Bitkicikler dört haftada bir ve toplamda 3 kez altkültüre alınmıştır.

Plantform Biyoreaktör Sistemi ile Mikroçoğaltım Denemesinin Kurulması

Katı kültür mikroçoğaltım denemesi sonucunda elde edilen optimum besin ortamı referans alınarak Plantform geçici daldırma sisteminde mikroçoğaltım denemesi kurulmuştur. Plantform geçici daldırma sistemi için hazırlanan besin ortamlarına katılaştırıcı agar ilave edilmemiştir. Plantform biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemesi için 500 ml besin ortamı hazırlanmış ve 60 bitki kültüre alınmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Bitkiciklerin kültür kaplarına transfer edilmesinden 6-8 hafta sonra atkültür işlemi 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Deneme Planı, İstatistik Analizleri ve İncelenen Kriterler

Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerinin mikroçoğaltım amacıyla kurulan denemelerin tamamı 3 tekrerrürlü olacak şekilde, faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Çalışmada kullanılan her iki sistemde, her atkültür sonunda, kardeşlenme katsayısı (adet/bitkicik), bitki boyu (cm) ve bitkilerin genel görünümüne ait kriterler incelenmiştir.

Çalışmanın katı kültür mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen veriler ile varyans analizleri gerçekleştirilmiştir. Önemli çıkan ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testi ile belirlenmiştir. Ayrıca her genotip için optimum olarak belirlenen besin ortamı ve bitki büyüme düzenleyici içeriğinde klasik katı kültür ve Plantform sistemleri arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının tespiti bağımsız t-testi analizi ile gerçekleştirilmiştir. İstatistik analizlerde JMP 8.01 programı kullanılmıştır. Tüm istatistik analizler her genotip için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Doku Kültürü Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen Bitkilerde Genetik Kararlılığın Belirlenmesi

Çalışma boyunca gerçekleştirilen katı kültür mikroçoğaltım ve Plantform geçici daldırma biyoreaktör sistemi mikroçoğaltım denemeleri sonucunda elde edilen bitkilerde besin ortamları ve büyüme düzenleyicilerin etkisiyle herhangi bir somaklonal varyasyon olup olmadığı başlangıç materyali ile karşılaştırılmalı olarak test edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, kullanılan her genotip için ayrı ayrı olmak üzere başlangıç materyalinden, katı kültür mikroçoğaltım denemesinde elde edilen bitkiciklerden, ve Plantform biyoreaktör sistemi ile mikroçoğaltım denemeleri sonucunda çoğaltılan bitkiciklerden 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 yöntemi takip edilerek gerçekleştirilmiştir [8]. Çalışmada PCR reaksiyonu için keçi boynuzu genotiplerinde kullanılan ve daha önce polimorfik sonuçlar verdiği bildirilen toplam 9 farklı SSR primeri kullanılmıştır [9] (Çizelge 1).

Çizelge 1. Moleküler testlerde kullanılan SSR primerlerine ait bilgiler

No	Primer	Primer Dizimi (5'-3')	Tekrar Motifi
1	Cesi_21_cott7	F: GGGGAAAACAACCAATATAGTTA R: AGGAGATCGAGCGTATGCAG	(CTTT)7
2	Cesi_187_at15	F: ATACTGGGCGTTCTTTGCTT R: ATTATCTCTTGCTTTGGTCTCT	(AT)15
3	Cesi_1187_at9	F: TTCTCGTCGCCAAACTG R: CTCCTCATCTCTCTCGTTG	(AT)9
4	Cesi_509_ga12	F: GCCACCTCTCCCTTCTCTC R: TTTTGTTCAAATTTGCTGCA	(GA)12
5	Cesi_98_gct6	F: GCCACCACCTTTGAAGGAAGA R: GCTAGAAGCAGGAGCAGGAG	(GCT)6
6	Cesi_15_aaatag4	F: GACGGTGAAGGCAACCT R: GCTCGTTGGGAGTGTA	(AAATAG)4
7	Cesi_976_ta5tg6	F: TCCTGAAGGCTGAAGATGATG R: CAAACCAATGAAGGGCTCTA	(TA)5(TG)6
8	Cesi_74_ta7	F: AACGCAACCTCAGCATCAT R: AAGGCAAGTGGGAGACACAC	(TA)7
9	Cesi_17_tta7	F: AAATGCAACAAGATGACACG R: GAAGAAAGCTCGGCCTCTG	(TTA)7

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 MgCl₂, 2 µmol primer (ileri+geri), 0.8 ünite Taq DNA polimeraz, 5µl ddH₂O) 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 için Poliakrilamid 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 jele pipet yardımıyla yüklenmiştir. Daha sonra cihaz çalışma şartları olan 1500 V, 35 mA, 50 W 48°C'de 1.5 saat koşuturulmuştur.

Moleküler Çalışmaların Sonuçlarının Değerlendirilmesi

SSR markırları ile yapılan moleküler analizler sonucunda başlangıç materyalinin DNA profili ile çalışma boyunca temin edilen katı kültür mikroçoğaltım ve Plantform mikroçoğaltım bitkilerinden elde edilen DNA profilleri ile karşılaştırılmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kıbrıs Genotipine ait Bulgular

Kıbrıs genotipinde katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının bitki boyu üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kıbrıs genotipinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin katı kültürde bitki boyu üzerine etkisi incelendiğinde, en başarılı besin ortamı MS, en başarılı bitki büyüme düzenleyicisi 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ kombinasyonu olarak belirlenmiştir. Kıbrıs genotipinin mikroçoğaltım denemelerinde en yüksek bitki boyu ortalaması, 1.34 cm ile 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Çalışmada 2 mg/L

BA+0.1 mg/L GA₃ (1.26 cm) içeren MS besin ortamında istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunamamıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, besin ortamları ile bitki büyüme düzenleyicileri interaksyonunun mikroçoğaltım üzerinde farklı etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Kıbrıs genotipinde katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Çalışmada en yüksek kardeşlenme sayısı, 3.39 kardeş/bitkicik ile 1.5 mg/L BA+0.5

mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Bu oranı, 2.01 kardeş/bitkicik ile 1.5 mg/L BA+0.1 mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamı takip etmiştir. Bu durum, GA₃ miktarındaki artışın kardeşlenme oranını önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Ayrıca varyans analizi sonuçları göz önüne alındığında Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiş olup, bu sonuçlar besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Kıbrıs genotipinin 4. haftada katı kültürde kardeşlenmesine ait resimler Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. Kıbrıs genotipinin 4. haftada katı kültürde kardeşlenmesi (1.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ içeren MS ortamı)

Monoik Genotipine ait Bulgular

Monoik genotipinde ait katı kültür mikroçoğaltım denemesinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının bitki boyu üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Monoik genotipinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin katı kültürde bitki boyu üzerine etkisi incelendiğinde, en başarılı besin ortamı MS, en başarılı bitki büyüme düzenleyicisi 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ olarak belirlenmiştir. Monoik genotipinin mikroçoğaltım denemelerinde en yüksek bitki boyu ortalaması 0.7 cm ile 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, Monoik genotipi içinde besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır.

Çalışma kapsamında Monoik genotipinin katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Çalışmada en yüksek kardeşlenme sayısı 2.33 ortalama kardeş/bitkicik ile 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş MS besin ortamından elde edilmiştir. Ayrıca varyans analizi sonuçlarına göre Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Yapılan incelemelerde, besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Monoik genotipinin katı kültürde kardeşlenmesine ait görüntü Şekil 2'de sunulmuştur.

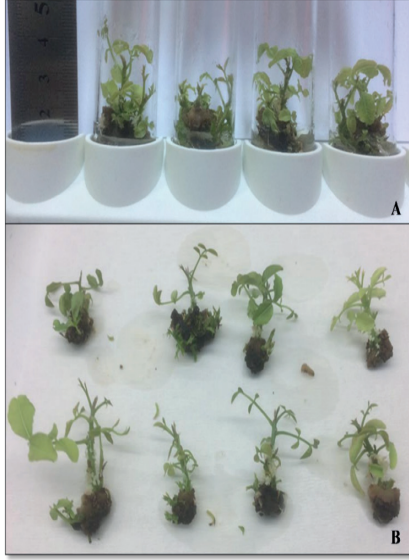


Şekil 2. A: Katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda Monoik genotipine ait elde edilen bitkicikler (2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ içeren MS ortamı) B: Katı kültür mikroçoğaltım çalışmalarını sonucunda elde edilen bitkiciklerin boy ölçüleri.

Adana Genotipine ait Bulgular

Adana genotipinde katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonlarının bitki boyu üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Adana genotipinde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicilerinin katı kültürde bitki boyu üzerine etkisi incelendiğinde, en başarılı besin ortamı ½ MS, en başarılı bitki büyüme düzenleyicisi 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ olarak belirlenmiştir. Adana genotipinin mikroçoğaltım denemelerinde en yüksek bitki boyu ortalaması, 2.16 cm ile 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş ½ MS besin ortamından elde edilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Bu durum, besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Adana genotipinde katı kültürde farklı besin ortamları ve bitki büyüme düzenleyicileri

kombinasyonlarının kardeşlenme katsayısına (kardeş/bitkicik) etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Çalışmada en yüksek kardeşlenme sayısı, 5.88 ortalama kardeş/bitkicik ile 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ eklenmiş ½ MS besin ortamından elde edilmiştir. Ayrıca varyans analizi sonuçlarına göre Ortam*BBD etkileşiminin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneme sonuçları, *in vitro* doku kültüründe besin ortamlarının mikroçoğaltım üzerindeki etkisinin bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştiğini ortaya koymaktadır. Adana genotipinin katı kültürde kardeşlenmesine ait görüntü Şekil 3'te sunulmuştur.



Şekil 3. A: 4 haftalık alt kültür sonucunda elde edilen bitkicikler B: Katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda Adana genotipine ait elde edilen bitkicikler (0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ içeren ½ MS ortamı)

Plantform Mikroçoğaltım Denemesine Ait Bulgular

Katı kültür mikroçoğaltım denemeleri sonucunda Kıbrıs, Monoik ve Adana genotipleri için en iyi kardeşlenme ve bitki gelişimi sağlayan besin ortamları ile Plantform sisteminde mikroçoğaltım denemeleri kurulmuş olup, elde edilen sonuçlar ile katı kültür mikroçoğaltım denemesi karşılaştırılmıştır. Kıbrıs genotipi için 1.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ ihtiva eden MS besin ortamı, Monoik genotipi için 2 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ ihtiva eden MS besin ortamı ve Adana genotipi için 0.5 mg/L BA+0.5 mg/L GA₃ ihtiva eden ½ MS besin ortamları kullanılarak genotipler, Plantform sisteminde sıvı kültüre alınmıştır. Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerinin katı kültür mikroçoğaltım performansı ve Plantform sistemindeki mikroçoğaltım performansı t-testi ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerinin katı kültür mikroçoğaltım performansı ve Plantform sistemindeki mikroçoğaltım performansına ait veriler (t-testi sonuçları)

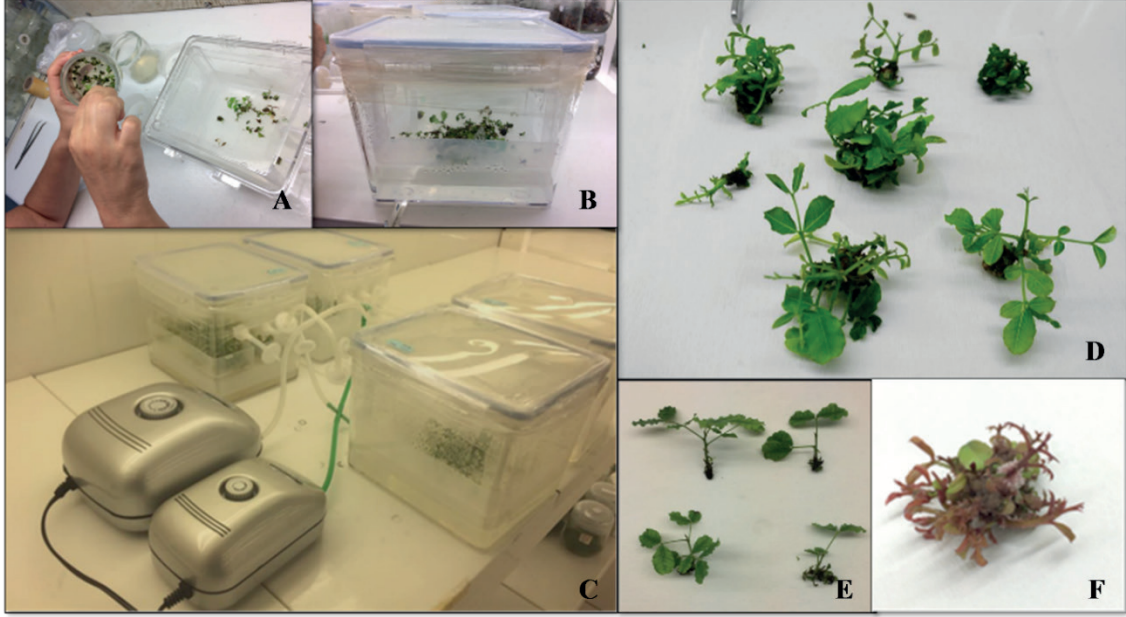
Genotip	Ortam	Kardeş Sayısı (kardeş/bitkicik)	P Değeri	Bitki Boyu (cm)	P Değeri
Kıbrıs	Katı Ortam	3.96	0.02	1.34	0.03
	Plantform	5.77		2.08	
Monoik	Katı Ortam	2.33	0.0093	0.70	0.07
	Plantform	2.88		1.01	
Adana	Katı Ortam	5.88	0.004	2.16	0.76
	Plantform	7.22		1.93	

T-testi sonucunda Kıbrıs genotipinin katı kültür ve Plantform sisteminde mikroçoğaltım deneme sonuçları incelendiğinde, sistemler arasında istatistiksel açıdan farklılık bulunmuştur. Kıbrıs genotipi gelişimini bitki boyu (cm) açısından incelediğimizde, katı kültür denemesinde bitki boyu 1.34 cm iken Plantform'da 2.08 cm olarak elde edilmiştir. Kardeşlenme katsayısı ise katı kültür denemesinde 3.96 (kardeş/bitkicik) iken Plantform sisteminde 5.77 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Kıbrıs genotipi bitki boyu açısından incelediğinde katı kültürde maksimum bitki boyu 1.34 cm iken Plantform'da 2.08 cm olarak tespit edilmiştir.

Monoik genotipinde yürütülen deneme sonucunda ise, kardeşlenme katsayısı istatistiksel açıdan önemli bulunurken, bitki boyu açısından farklılık görülmemiştir. Kardeşlenme katsayısı katı kültürde 2.33 (kardeş/bitkicik) iken Plantform sisteminde 2.88 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Monoik genotipini bitki boyu (cm) açısından incelediğimizde, katı kültürde bitki boyu 0.70 cm iken, Plantform'da 1.01 cm olarak elde edilmiştir. Monoik genotipinin katı kültürde maksimum bitki boyu 1.1 cm iken, Plantform'da 2.4 cm olarak tespit edilmiştir.

Adana genotipinde yürütülen deneme sonucunda, kardeşlenme katsayısı istatistiksel açıdan önemli bulunurken, bitki boyu açısından farklılık görülmemiştir. Kardeşlenme katsayısı katı kültürde 5.88 (kardeş/bitkicik) iken, Plantform'da 7.22 (kardeş/bitkicik) olarak elde edilmiştir. Buna karşın Adana genotipini bitki boyu (cm) açısından incelediğimizde, katı kültürde bitki boyu 2.16 cm iken Plantform'da 1.93 cm olarak elde edilmiştir. Adana genotipinde katı kültürde maksimum bitki boyu 2.7 cm iken Plantform'da 2.8 cm olarak tespit edilmiştir.

Plantform sisteminde her üç genotip için kardeşlenme katsayısı ve bitki boyu ortalamasının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her iki sistemden elde edilen bitkicikler yaprak rengi ve yaprak genişliği açısından incelendiğinde, Plantform sisteminde gelişen bitkicikler katı ortamda gelişen bitkilere göre daha iyi gelişme göstermiştir (Şekil 4).



Şekil 4. A: Eksplantların Plantform kültür kaplarına aktarılması. B: Plantform sisteminde alt kültüre alınmış keçiboynuzu eksplantları C: Plantform biyoreaktör sisteminin genel görüntüsü D: Kıbrıs genotipinin Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen bitkicikleri. E: Monoik genotipinin Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen bitkicikleri. F: Adana genotipinin Plantform sistemi mikroçoğaltım denemelerinde elde edilen bitkicikleri.

MOLEKÜLER ÇALIŞMALARLA AİT BULGULAR

Çalışma kapsamında kullanılan üç genotipte de katı kültür ve Plantform biyoreaktör sistemlerinde çoğaltılan bitkilerde herhangi bir genetik farklılık olup olmadığı başlangıç materyali kullanılarak SSR markırları ile karşılaştırmalı olarak test edilmiştir. Bu bağlamda, keçiboynuzu için geliştirilmiş ve polimorfik olduğu doğrulanmış toplam 9 SSR primeri kullanılmıştır. SSR analizlerinde kullanılmak üzere Kıbrıs, Monoik ve Adana genotipinden örnekler alınmıştır. SSR analizleri sonucunda kullanılan SSR primerlerinin keçiboynuzu için daha önce polimorfik sonuçlar vermesi nedeniyle bu çalışma sonucunda elde edilen monomorfik DNA bant profilleri bu bitkilerin genetik olarak sabit olduğunu ispatlamaktadır. Sonuç olarak, 9 SSR primeri kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda bu bitkilerin genetik olarak başlangıç materyali ile farklı olmadığı belirlenmiştir.

Geçici Daldırma Sistemleri (Temporary Immersion Systems) bitkilerin *in vitro* kültürü için ideal gelişme ortamlarına olanak sağlamaktadır. Geçici Daldırma Sistemleri, kültür bitkilerinin mikroçoğaltımı, sekonder metabolitlerin üretimi ve organogenesis çalışmalarında ortaya çıkan sorunların çözümü için klasik doku kültürü tekniklerine alternatif bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Günümüzde, benzer veya farklı teknolojik prensiplere dayalı çeşitli geçici daldırma sistemleri, bitkilerde doku ve organ kültürü çalışmalarında materyallerin *in vitro*'da başarılı bir şekilde geliştirilmesi için uygulanmaktadır [10].

Geliştirilen geçici daldırma sistemleri arasında TIB, RITA, GIB, SETIS biyoreaktör ve Plantform sistemleri bulunmaktadır [10]. Son yıllarda geliştirilen bu sistemler arasında Plantform biyoreaktör sistemi oldukça yoğun kullanım alanına sahip olmuş ve birçok araştırmacı tarafından farklı türdeki bitkiler için kullanılmıştır. Süs bitkilerinden endüstriyel bitki türlerine kadar geniş bir kullanım alanı bulunan bu sistem ile; su mercimeği [11], yüksük otu, kirpi otu ve ahududu [12], saplı meşe [13], mersin ve zeytin [14], süs çimi, kasımpatı, incir ve kırmızı frenk üzümü [15],

şeker otu [16], phalaenopsis [17], vanilya bitkisi [18], muz [19], bambu [20], su oku bitkisi [21], mersin bitkisi [22], gerbera [23], bitkilerinin Plantform biyoreaktör sisteminde rejenerasyonu incelenmiştir.

Keçiboynuzunun *in vitro* koşullarda farklı kültür ortamlarının mikroçoğaltıma etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, katı kültür ve Plantform biyoreaktör sistemleri kıyaslanmıştır [24]. Çalışma sonunda Plantform biyoreaktör sisteminde elde edilen bitkilerde bitki boyu, taze ve kuru ağırlık parametreleri katı kültürlerden elde edilen parametrelere göre daha yüksek oranda sonuçlar vermiştir. Bu çalışmada Plantform biyoreaktör sisteminin farklı üç keçiboynuzu genotipinin mikroçoğaltımı ve köklenmesi üzerine etkinliği agar ile katılaştırılmış klasik doku kültürü yöntemi ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen bulgulara göre Plantform biyoreaktör sistemi Kıbrıs, Monoik ve Adana genotiplerinin mikroçoğaltımında kardeşlenme katsayısı açısından katı kültür ortamına göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Plantform biyoreaktör sistemi Kıbrıs genotipi için bitki boyu (cm) açısından daha iyi sonuç verirken, Monoik ve Adana genotipleri için istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Buna rağmen bu iki genotipe ait bitkicikler Plantform sisteminde yaprak sayısı ve kalitesi bakımından daha iyi gelişme göstermiştir.

Geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde uygulanan teknik parametreler (daldırma, havalandırma vb) gelişme ortamlarının optimizasyonunda etkili olmaktadır. Bunun yanında kültür kaplarına transfer edilen eksplant sayısı da bitki gelişimini etkilemektedir. Bu duruma bağlı olarak optimum daldırma- havalandırma süreleri ve başlangıç eksplant sayısında net bir ölçüt söylenemez. *Quercus robur* L. bitkisinin *in vitro* koşullarda Plantform sisteminde mikroçoğaltımında 8 saatte bir 12 dk ve 16 saatte bir 8 dk olmak üzere iki farklı daldırma süresi araştırıldığı bir çalışmada [13], 8 saatte bir 12 dk'lık daldırma süresinin bitki gelişimi üzerine daha etkili olduğunu belirtilmiştir. Plantform biyoreaktör sisteminde kültüre alınarak Afrika yağ palmyesi (*Elaeis guineensis* Jacq.) bitkisinin embriyojenik kallus oranını artırmak amacıyla

yapılan bir çalışmada [25], 1 saatte bir 3 dk, 3 saatte bir 3 dk ve 6 saatte bir 3 dk olmak üzere daldırma sürelerini uygulanmıştır. Çalışma neticesinde en yüksek embriyojenik kallus oluşumunun 3 saatte bir 3 dk daldırma süresinde elde edildiği belirtilmiştir. *Pinellia ternate* bitkisinde farklı daldırma sürelerinin kardeşlenme katsayısına ve gelişmesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla bir çalışma yapılmıştır [26]. Çalışmaya ek olarak kültür kaplarına koyulan eksplant sayısının bitki gelişimine etkilerini incelemek amacıyla kültür kaplarına farklı sayılarda eksplant transfer edilmiştir. Çalışma sonunda, bitki çoğalması ve büyümesi üzerinde en başarılı daldırma süresini 12 saatte bir 5 dk olarak belirtilmiştir. Ayrıca en fazla yaş ağırlık kültür kaplarına 60 eksplant konulduğu zaman elde edilirken, kültür kaplarına 80 ve 100 eksplant koyulduğunda bitkilerin 60 eksplant koyulan sisteme göre daha zayıf gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. *Gynura procumbens* sürgün kültüründe sürgünlerin içerdiği biyokütle ve flavonoidin üretimindeki değişkenliğe kültür ortamının içeriği ve daldırma sürelerinin etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada [27], geçici daldırma sisteminde farklı büyüme düzenleyici kombinasyonları ve farklı daldırma süreleri (3 saatte bir 5 dk ve 12 saatte bir 15 dk) uygulanmıştır. Kültür sonucunda en yüksek flavonoidin oranı 12 saatte bir 15 dk daldırma süresinde elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan üç farklı keçiboynuzu genotipi için Plantform biyoreaktör sisteminde daldırma süresi 4 saatte bir 10 dk, havalandırma süresi ise 4 saatte bir 15 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Plantform biyoreaktör sisteminde mikroçoğaltım denemelerinde 60 bitki kültüre alınmıştır. [27], tarafından mersin bitkisinde yürütülen çalışmalarda Plantform biyoreaktör sisteminde kültür kaplarına farklı sayılarda eksplant konularak bitki gelişimlerini incelemiş, 500 ml sıvı besin ortamlarına 100, 120 ve 150 bitki konulduğu zaman bitki gelişiminin 60 ve 80 bitki konulan kültür kaplarına göre daha iyi olduğunu belirtmişlerdir. Elde edilen bu verilere göre geçici daldırma biyoreaktör sistemlerinde kültüre alınan eksplant sayısının her bitki türü için optimize edilmesi bitki gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Tunaloğlu, R., Özkaya, M.T., 2003. Keçiboynuzu. Tarımsal Ekonomi.
- [2] Ahraz A., 2003. Locust Bean Gum (Keçiboynuzu Zamkı) E-410'un Türkiye'de Üretimi. Gıda Teknolojisi, 7, 36-37.
- [3] Anonim, 2017. Food and Agriculture Organization of The United Nations Database. <http://www.fao.org/home/en/>, Erişim Tarihi: 15.11.2018.
- [4] Anonim. 2017. Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı.
- [5] Takayama, S., Misawa, M., 1981. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. Plant Cell Physiol. 22: 461-467.
- [6] Etienne, H., Berthouly, M., 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69.3: 215-231.
- [7] Etienne, H., Berthouly, M., 2006. Bioreactors in coffee micropropagation. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18.1: 45-54.
- [8] Şimşek, Ö., Kanat, F. E., Serçe, S., & Kaçar, Y. A., 2008. Bazı Meyve Türlerinde DNA İzolasyon Yöntemlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması. Derim, 25(1), 59-69.
- [9] Malfa, S., Currò, S., Douglas, A. B., Brugaletta, M., Caruso, M., Gentile, A., 2014. Genetic diversity revealed by EST-SSR markers in carob tree (*Ceratonia siliqua*

L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, 205-211.

- [10] Cengiz, M., 2018. Bazı Turunçgil Genotiplerinin Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Mikroçoğaltımı ve Genetik Kararlılığının Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- [11] Yenice, Z., 2010. Geçici Daldırma Sistem Biyoreaktörlerle Su Mercimeği (*Lemna minor* L.) Bitkisinin *In vitro* Çoğaltımı. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- [12] Welander, M., Persson, J., Asp, H., Zhu, L. H., 2014. Evaluation of a New Vessel System Based on Temporary Immersion System for Micropropagation. Scientia Horticulturae, 179:227-232.
- [13] Gatti, E., Ozudogru, A., Lambardi, M., and 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 Abstract Book.
- [14] Benelli, C., Fernanda, C. M., De Carlo, A., 2015. Plant Form, a temporary immersion system, for *in vitro* propagation of *Myrtus communis* and *Olea europaea*. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants Abstract Book.
- [15] Lambardi, M., Roncasaglia, R., Bujasha, D., Balleiro, F., Correia Da Silva, D. P., Ozudogru, E. A., 2015. Improvement of shoot proliferation by liquid culture in temporary immersion. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants Abstract Book.
- [16] 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.
- [17] Masnoddin, M., Repin, R., Aziz, Z.A., 2016. Micropropagation of an Endangered Borneo Orchid, *Paphiopedilum rothschildianum* Callus Using Temporary Immersion Bioreactor System. (Thai Agricultural Research Journal), 34(2):161-171.
- [18] Ramirez-Mosqueda, M.A., Iglesias-Andreu, L.G., 2016. Evaluation of Different Temporary Immersion Systems (BIT®, BIG, and RITA®) in The Micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(2):154-160.
- [19] Daungban, S., Pumisutapon, P., Topoonyanont, N., and Poonnoy, P., 2017. Effects of Explants Division by Cutting, Concentrations of TDZ and Number of Sub-culture Cycles on Propagation of 'Kluai Hom Thong' Banana in A Temporary Immersion Bioreactor System. Thai Journal of Science and Technology, 6(1):89-99.
- [20] Gutiérrez, L.G., López-Franco, R., and Morales-Pinzón, T., 2016. Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) Using A Temporary Immersion System RITA®. African Journal of Biotechnology, 15(28):1503-1510.
- [21] 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.
- [22] Biçen, B., 2017. Mersin Bitkisinin (*Myrtus communis* L.) Klasik ve Yeni Nesil Doku Kültürü Teknikleri ile Çoğaltılması ve Köklendirilmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- [23] Frómeta, O. M., Morgado, M. M. E., Da Silva, J. A. T., Morgado, D. T. P., Gradaille, M. A. D., 2017. *In vitro*

Propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a Temporary Immersion Bioreactor. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 1-9.

[24] Cavallaro, V., Scalisi, C., Saita, A., Malvuccio, A., La Rosa, S., Pellegrino, A., Barbera, A. C., 2015. Improving in vitro mass proliferation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) from seedling apices by temporary immersion systems. In VI International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants 1155:221-226.

[25] Marbun, C. L. M., Toruan-Mathius, N., Utomo, C., Liwang, T., 2015. Micropropagation of embryogenic callus of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) using temporary immersion system. Procedia Chemistry, 14, 122-129.

[26] 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.

[27] Pramita, A. D., Kristanti, A. N., Utami, E. S. W., Manuhara, Y. S. W., 2018. Production of biomass and flavonoid of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr shoots culture in temporary immersion system. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.