

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***ORCHIS SANCTA L. VE SERAPIAS VOMERACEA (BURM. F.) BRIQ.*  
TÜRLERİNİN BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMİYLE ÜRETİMİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Ersan BEKTAŞ**

**HAZİRAN 2014**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***ORCHIS SANCTA L. VE SERAPIAS VOMERACEA (BURM. F.) BRIQ.***  
**TÜRLERİNİN BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMİYLE ÜRETİMİ**

**Ersan BEKTAŞ**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**  
**"DOKTOR (BİYOLOJİ)"**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :12.05.2014**

**Tezin Savunma Tarihi :09.06.2014**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN**

**Trabzon 2014**

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalında

Ersan BEKTAŞ Tarafından Hazırlanan

*ORCHIS SANCTA L.* ve *SERAPIAS VOMERACEA* (BURM. F.) BİRİQ.  
TÜRLERİNİN BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMİYLE ÜRETİMİ

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 14/ 05 / 2014 gün ve 481 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda


DOKTORA TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Asım KADIOĞLU ..... 

Üye : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN ..... 

Üye : Prof. Dr. Faik Ahmet AYAZ ..... 

Üye : Prof. Dr. Ali Ömer ÜÇLER ..... 

Üye : Prof. Dr. Ekrem GÜREL ..... 

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

“*Orchis sancta* L. ve *Serapias vomeracea* (Burm. F.) Briq. türlerinin bitki doku kültürü yöntemiyle üretimi” adlı doktora tezi çalışılmıştır. Bu doktora çalışması nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan ve ekonomik açıdan önem taşıyan salep orkidelerinin üretimi ve doğal ortamlara adaptasyonları konusunda önemli bilgiler sunmaktadır. Söz konusu bu doktora tez çalışmasının bu alanda çalışacak bilim insanlarına ve özel sektöre örnek teşkil edeceğini ümit ediyorum.

Lisansüstü eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenerek, gerek konu seçimi, gerekse çalışmaların yürütülmesi sırasında deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, yardım ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’e sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam süresince deneyim ve bilgilerini ve yardımını esirgemeyen, yol gösteren tez izleme komitesi üyeleri sayın Prof. Dr. Faik Ahmet AYAZ ve Prof. Dr. Ali Ömer ÜÇLER’e teşekkür ederim.

Ayrıca, tez çalışması süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen tüm hocalarıma ve dostlarıma; Yrd. Doç. Dr. Aykut SAĞLAM, Yrd. Doç. Dr Kadriye İNAN, Yrd. Doç. Dr. Onur TOSUN, Araş. Gör. Fuat YETİŞSİN, Araş. Gör. Mutlu GÜLTEPE, Araş. Gör. Mehmet DEMİRALAY, Araş. Gör. Halil İbrahim GÜLER, Araş. Gör. Nesrin ÇOLAK, Mustafa GÜNAYDIN ve Figen TOSUN’a, çok değerli abilerim Ünal ANLAŞ, Mustafa ANLAŞ ve Osman ANLAŞ’a, K.T.Ü. Biyoloji Bölümü Bölüm Başkanlığı ve Öğretim üyelerine, Trabzon Teknoloji Geliştirme Bölgesi yönetici ve çalışanlarına, Trabzon KOSGEB Müdürlüğü çalışanlarına ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Ömrü elverdiği sürece her türlü fedakârlıkla yanımda olan Babama ve maddi manevi her daim destek olan aile bireylerime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ersan BEKTAŞ

Trabzon 2014

## TEZ BEYANNAMESİ

Doktora tezi olarak sunduğum “*Orchis sancta* L. ve *Serapias vomeracea* (Burm. F.) Briq. türlerinin bitki doku kültürü yöntemiyle üretimi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 09 / 06 / 2014

Ersan BEKTAŞ

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ .....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XIV
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Orchidaceae Familyasının Morfolojik Özellikleri .....	7
1.2.1. <i>Orchis sancta</i> L.'nin Morfolojik Özellikleri.....	8
1.2.2. <i>Serapias vomeracea</i> (Burm. F.) Briq.'in Morfolojik Özellikleri.....	9
1.3. Bitki Doku Kültürü .....	11
1.3.1. Bitki Doku Kültürüyle Sentetik Tohum Üretimi .....	14
1.4. Literatür Özeti.....	15
1.5. Tezin Amacı.....	22
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	23
2.1. Materyal .....	23
2.1.1. Bitki Materyali .....	23
2.1.2. Besi Ortamlarının Belirlenmesi .....	23
2.1.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Belirlenmesi.....	23
2.2. Metot .....	25
2.2.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonunun Yapılması .....	25
2.2.1.1. Çamaşır Suyu ile Yüzey Sterilizasyonunun Yapılması .....	25
2.2.1.2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile Yüzey Sterilizasyonunun Yapılması .....	26
2.2.2. Tohumların Canlılık Yüzdelerinin Belirlenmesi .....	26
2.2.3. Besi Ortamlarının Hazırlanması .....	27
2.2.4. <i>İn Vitro</i> Kültürlerin Başlatılması .....	27
2.2.4.1. <i>O. sancta</i> ve <i>S. vomeracea</i> Tohumlarının <i>İn Vitro</i> Çimlendirilmesi .....	27

2.2.4.1.1.	Farklı Besi Ortamlarının Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	27
2.2.4.1.2.	Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Tohumların Çimlenmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	28
2.2.4.2.	Sitokininlerin Sürgün Oluşumu ve Uzaması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	29
2.2.4.3.	Oksinlerin Sürgün Oluşumu ve Uzaması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	29
2.2.5.	<i>O. sancta</i> ve <i>S. vomeracea</i> 'nin Sentetik Tohumlarının Üretilmesi .....	30
2.2.5.1.	Protokorm Benzeri Yapıların Oluşturulması ve İzolasyonu .....	30
2.2.5.2.	Kaplama Matriksinin Hazırlanması ve Protokorm Benzeri Yapıların Kaplanması .....	31
2.2.5.3.	Sentetik Tohumların Farklı Ortamlarda Çimlendirilmesi.....	32
2.2.6.	<i>İn Vitro</i> Koşullarda Oluşturulan Fidelerin Toprak Koşullarına Adapte Edilmesi .....	32
2.2.6.1.	Deneme I: Sterilize Edilmeyen Toprak Koşullarına Adaptasyon.....	32
2.2.6.2.	Deneme II: Sterilize Torf Ortamında Adaptasyon.....	33
2.2.7.	Farklı <i>İn Vitro</i> Koşullarda Oluşan Tuberlerin Glukomannan Miktarının Belirlenmesi .....	34
2.2.7.1.	Tuberlerden Glukomannan Özütlenmesi ve Miktarının Belirlenmesi.....	34
2.2.8.	İstatistik Analizleri.....	35
3.	<b>BULGULAR</b> .....	36
3.1.	Tohumların Yüzey Sterilizasyonu .....	36
3.1.1.	Çamaşır Suyu ile Sterilizasyon .....	37
3.1.1.1.	<i>O. sancta</i> ile Yapılan Sterilizasyon Çalışmaları .....	37
3.1.1.2.	<i>S. vomeracea</i> ile Yapılan Sterilizasyon Çalışmaları .....	37
3.1.2.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile Sterilizasyon .....	38
3.1.2.1.	<i>O. sancta</i> ile Yapılan Sterilizasyon Çalışmaları .....	39
3.1.2.2.	<i>S. vomeracea</i> ile Yapılan Sterilizasyon Çalışmaları .....	39
3.2.	Tohumların <i>İn Vitro</i> Çimlendirilmesi .....	40
3.2.1.	Besi Ortamlarının <i>İn Vitro</i> Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi .....	40
3.2.1.1.	<i>O. sancta</i> ile Yapılan Çimlendirme Çalışmaları .....	40
3.2.1.2.	<i>S. vomeracea</i> ile Yapılan Çimlendirme Çalışmaları.....	41
3.2.2.	Çeşitli Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin <i>İn Vitro</i> Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkileri.....	43
3.2.2.1.	<i>O. sancta</i> ile Yapılan Çimlendirme Çalışmaları .....	43
3.2.2.2.	<i>S. vomeracea</i> ile Yapılan Çimlendirme Çalışmaları.....	49

3.3.	Sitokininlerin Sürgün Oluşumu ve Uzaması Üzerine Etkileri.....	55
3.3.1.	<i>O. sancta</i> ile Yapılan Sürgün Oluşturma Çalışmaları.....	55
3.3.2.	<i>S. vomeracea</i> ile Yapılan Sürgün Oluşturma Çalışmaları .....	60
3.4.	Oksinlerin Sürgün Oluşumu ve Uzaması Üzerine Etkileri .....	64
3.4.1.	<i>O. sancta</i> ile Yapılan Sürgün Oluşturma Çalışmaları.....	64
3.4.2.	<i>S. vomeracea</i> ile Yapılan Sürgün Oluşturma Çalışmaları .....	63
3.5.	<i>İn vitro</i> Koşullarda Üretilen Tuberlerin Glukomannan İçeriğinin Belirlenmesi .....	67
3.5.1.	<i>O. sancta</i> Tuberlerinin Glukomannan Miktarı.....	68
3.5.2.	<i>S. vomeracea</i> Tuberlerinin Glukomannan Miktarı .....	69
3.6.	<i>O. sancta</i> ve <i>S. vomeracea</i> 'nin Sentetik Tohumlarının Üretimi.....	71
3.6.1.	Protokorm Benzeri Yapıların Oluşturulması ve İzolasyonu .....	71
3.6.1.1.	<i>O. sancta</i> ile Yapılan PBY Oluşturma Çalışmaları .....	72
3.6.1.2.	<i>S. vomeracea</i> ile Yapılan PBY Oluşturma Çalışmaları .....	73
3.6.2.	Sentetik Tohumların Farklı Ortamlarda Çimlendirilmesi.....	74
3.7.	<i>İn Vitro</i> Koşullarda Oluşturulan Fidelerin Toprak Koşullarına Adapte Edilmesi .....	77
3.7.1.	Sterilize Edilmeyen Toprak Koşullarına Adaptasyon (Deneme I) .....	75
3.7.1.1.	<i>O. sancta</i> ile Yapılan Adaptasyon Çalışmaları .....	77
3.7.1.2.	<i>S. vomeracea</i> ile Yapılan Adaptasyon Çalışmaları.....	78
3.7.2.	Sterilize Torf Ortamında Adaptasyon (Deneme II) .....	79
4.	TARTIŞMA .....	81
5.	SONUÇLAR.....	97
6.	ÖNERİLER.....	99
7.	KAYNAKLAR .....	100

ÖZGEÇMİŞ



Doktora Tezi

ÖZET

*ORCHIS SANCTA* L. ve *SERAPIAS VOMERACEA* (BURM. F.) BRIQ. TÜRLERİNİN  
BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ YÖNTEMİYLE ÜRETİMİ

Ersan BEKTAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN  
2014, 111 Sayfa,

Bu doktora tezinde Orchidaceae familyasından *Orchis sancta* L. ve *Serapias vomeracea* (Burm. F.) Briq. türlerinin *in vitro* koşullarda üretimi ve oluşan fidelerin toprak koşullarına adaptasyonu ve ayrıca sentetik tohumlarının üretilmesi ve çimlendirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *O. sancta* ve *S. vomeracea* olgun tohumlarının asimbiyotik çimlendirilmesi çalışmalarında en etkili besi ortamının her iki türde de Orchimax aktif kömürlü besi ortamının olduğu belirlenmiştir. Çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin ve farklı derişimlerinin çimlenme üzerindeki etkilerine bakıldığında, *O. sancta*'nın 1,0 mg/L ZEA, *S. vomeracea*'nin 2,0 mg/L 6-BA içeren ortamlarda en yüksek çimlenme yüzdelerine sahip oldukları görülmüştür. En yüksek sürgün uzama miktarı *O. sancta*'da (53,24 mm) ve *S. vomeracea*'de (42,88 mm) 0,25 mg/L TDZ içeren ortamlarda gözlenmiştir. *O. sancta*'da 1,0 ve 2,0 mg/L KİN içeren ortamlarının, *S. vomeracea*'de 2,0 mg/L IBA içeren ortamların yaprak oluşumunda daha etkili oldukları belirlenmiştir. *O. sancta* ve *S. vomeracea*'nin köklerinin oluşumunda ve uzamasında IBA'nın denenen yüksek derişimlerinin etkili olduğu gözlenmiştir. Türlerle ait tuberlerin oluşmasında ve bu tuberlerin içerdikleri glukomannan miktarlarında 2,0 mg/L ZEA içeren ortamların daha olumlu etkileri olduğu görülmüştür. *In vitro* koşullarda gelişen her iki türe ait fidelerin toprak koşullarına adaptasyonları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan sentetik tohumlar ise besi ortamlarında ve toprak koşullarında yüksek oranlarda çimlendirilmiştir. Bu çalışma, *O. sancta* ve *S. vomeracea*'nin bitki doku kültürü yöntemiyle üretilebileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Orchis sancta*, *Serapias vomeracea*, *In vitro*, Orchimax, asimbiyotik çimlenme, Sentetik tohum, Glukomannan

PhD. Thesis

SUMMARY

MICROPROPAGATION OF *ORCHIS SANCTA* L. ve *SERAPIAS VOMERACEA* (BURM. F.) BRIQ. SPECIES (ORCHIDACEAE) VIA PLANT TISSUE CULTURE TECHNIQUES

Ersan BEKTAŞ

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN  
2014, 111 Pages

In this thesis, the *in vitro* production of *Orchis sancta* L. and *Serapias vomeracea* (Burm. F.) Briq., belonging to the Orchidaceae family, acclimatization of *in vitro* produced plantlets as well as production and germination of their synthetic seeds were studied. Orchimax including activated charcoal was the best germination medium for the mature seeds of *O. sancta* and *S. vomeracea*. The highest germination rates were observed on Orchimax medium supplemented with 1.0 mg/L ZEA and 2.0 mg/L 6-BA. The medium containing 0.25 mg/L TDZ gave the superior shoot elongation in *O. sancta* and *S. vomeracea* with the values of 53.24 and 42.88 mm, respectively. The most effective leaf formation was obtained from *O. sancta* cultures maintained in the medium supplemented with 1.0-2.0 mg/L KIN whilst that of *S. vomeracea* was 2.0 mg/L IBA. Amongst all plant growth regulator concentrations tested, high concentrations of IBA enhanced the root formation and elongation for both species. The highest tuber formation as well as their glucomannan contents extracted from *in vitro* growing *O. sancta* and *S. vomeracea* plantlets were detected in the medium supplemented with 2.0 mg/L ZEA. Plantlets of *O. sancta* and *S. vomeracea* were carefully taken from their growth media and successfully acclimatized in the soil. Synthetic seeds of *O. sancta* and *S. vomeracea* were prepared and successfully germinated in growth medium and also in commercially available torf medium. This study shows that *O. sancta* and *S. vomeracea* can be produced by plant tissue culture techniques.

**Key Words:** *Orchis sancta*, *Serapias vomeracea*, *In vitro*, Orchimax, asymbiotic germination, Synthetic seed, Glucomannan

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Salep orkidelerine ait tuberlerin görünüşleri .....	2
Şekil 2. Salep orkidelerinin olgun tohumlarının mikroskop görüntüleri .....	6
Şekil 3. Doğal ortamlarda yetişen <i>Orchis sancta</i> bireyleri .....	9
Şekil 4. <i>Orchis sancta</i> 'nın Türkiye'deki yayılış alanları .....	9
Şekil 5. Doğal ortamlarda yetişen <i>Serapias vomeracea</i> bireyleri .....	10
Şekil 6. <i>Serapias vomeracea</i> 'nin Türkiye'deki yayılış alanları .....	10
Şekil 7. Orkide tohumlarının <i>in vitro</i> ortamlardaki gelişim süreçleri .....	18
Şekil 8. <i>În vitro</i> ortamlarda oluşan protokormlar .....	31
Şekil 9. <i>În vitro</i> ortamda gelişen ve toprağa aktarılma aşamasına gelen <i>O. sancta</i> ve <i>S. vomeracea</i> fideleri .....	33
Şekil 10. <i>O. sancta</i> , ve <i>S. vomeracea</i> tohumlarının canlılık testi sonrası görünüşleri .....	38
Şekil 11. Farklı besi ortamında çimlenen <i>O. sancta</i> tohumlarının stereo mikroskop görüntüleri .....	41
Şekil 12. Farklı besi ortamında çimlenen <i>S. vomeracea</i> tohumlarının stereo mikroskop görüntüleri .....	42
Şekil 13. Farklı TDZ derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>O. sancta</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	44
Şekil 14. Farklı ZEA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>O. sancta</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	45
Şekil 15. Farklı 6-BA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>O. sancta</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	46
Şekil 16. Farklı IBA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>O. sancta</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	46
Şekil 17. Farklı IAA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>O. sancta</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	47
Şekil 18. Farklı 2,4-D derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>O. sancta</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	48
Şekil 19. Farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>O. sancta</i> tohumlarının çimlenme yüzdesine etkilerinin karşılaştırılması .....	48
Şekil 20. Farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>O. sancta</i> türünün protokorm oluşumuna etkilerinin karşılaştırılması .....	49

Şekil 21.	Farklı TDZ derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>S. vomeracea</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	50
Şekil 22.	Farklı ZEA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>S. vomeracea</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	50
Şekil 23.	Farklı 6-BA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>S. vomeracea</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	51
Şekil 24.	Farklı IBA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>S. vomeracea</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	52
Şekil 25.	Farklı IAA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>S. vomeracea</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	52
Şekil 26.	Farklı 2,4-D derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki <i>S. vomeracea</i> tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları .....	53
Şekil 27.	Farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>S. vomeracea</i> tohumlarının çimlenme yüzdelerine etkilerinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 28.	Farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin <i>S. vomeracea</i> türünün protokorm oluşturma yüzdelerine etkilerinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 29.	<i>O. sancta</i> fidelerinin farklı bitki büyüme düzenleyicileri varlığındaki görünüşleri.....	57
Şekil 30.	Bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerinin <i>O. sancta</i> 'da gözlemlenen sürgün oluşum parametrelerine etkisi.....	59
Şekil 31.	<i>S. vomeracea</i> fidelerinin farklı bitki büyüme düzenleyicileri varlığındaki görünüşleri.....	61
Şekil 32.	Bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerinin <i>S. vomeracea</i> 'de gözlemlenen sürgün oluşum parametrelerine etkisi.....	63
Şekil 33.	<i>İn vitro</i> koşullarda yetiştirilen <i>O. sancta</i> ve <i>S. vomeracea</i> 'de kök oluşumu .....	66
Şekil 34.	<i>O. sancta</i> 'da tuber oluşumu.....	69
Şekil 35.	<i>S. vomeracea</i> 'de tuber oluşumu.....	70
Şekil 36.	<i>S. vomeracea</i> 'de kallus oluşumu .....	71
Şekil 37.	<i>O. sancta</i> ve <i>S. vomeracea</i> 'de protokorm benzeri yapıların oluşumu .....	72
Şekil 38.	<i>S. vomeracea</i> ve <i>O. sancta</i> sentetik tohumlarının sterilize torf ortamında çimlenmeleri .....	75
Şekil 39.	<i>S. vomeracea</i> 'den elde edilen sentetik tohumların besi ortamındaki gelişimleri .....	76
Şekil 40.	Torf ortamına aktarılan <i>O. sancta</i> fidelerinin 1. ve 2. ay sonundaki görünüşleri.....	78
Şekil 41.	Torf ortamına aktarılan <i>S. vomeracea</i> fidelerinin 1. ve 2. ay sonundaki görünüşleri.....	79

Şekil 42.	Sterilize torf ortamına aktarılan <i>O. sancta</i> fidelerinin 2 ay sonraki görünüşleri .....	80
Şekil 43.	Sterilize torf ortamına aktarılan <i>S. vomercea</i> fidelerinin 2 ay sonraki görünüşleri .....	80

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1.	Bazı salep orkidesi tuberlerinin kimyasal içerikleri .....	4
Tablo 2.	Bitki büyüme düzenleyicilerinin gruplandırılması, işlevleri ve yaygın kullanılanları .....	13
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan besi ortamları ve kimyasal içerikleri.....	24
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri. ....	25
Tablo 5.	Tohumların yüzey sterilizasyonu denemeleri sonrası canlılık oranları ve besi ortamlarındaki kontaminasyon sıklıkları. ....	36
Tablo 6.	<i>O. sancta</i> ve <i>S. vomeracea</i> tohumlarının farklı besi ortamlarındaki çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdeleri.....	43
Tablo 7.	Sitokininlerin <i>O. sancta</i> 'da sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri .....	58
Tablo 8.	Sitokininlerin <i>S. vomeracea</i> 'de sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri .....	62
Tablo 9.	Oksinlerin <i>O. sancta</i> 'da sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri .....	65
Tablo 10.	Oksinlerin <i>S. vomeracea</i> 'de sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri .....	67
Tablo 11.	<i>O. sancta</i> ve <i>S. vomeracea</i> 'de protokorm benzeri yapı oluşum oranları ve eksplant başına oluşan ortalama PBY sayıları.....	74
Tablo 12.	<i>O. sancta</i> ve <i>S. vomeracea</i> 'ye ait sentetik tohumlarının çimlenme oranları .....	76

## SEMBOLLER DİZİNİ

KCM	Knudson C besi ortamı
LM	Lindemann besi ortamı
-OM	Orchimax aktif kömürsüz besi ortamı
+OM	Orchimax aktif kömürlü besi ortamı
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
mL	Mililitre
mm	Milimetre
KİN	Kinetin
ZEA	Zeatin
IBA	İndol-3-bütirikasit
2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetikasit
6-BA	6-Benziladenin
2-İP	2-İzopentiladenin
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
TDZ	Thidiazuron
µmol	Mikromol
PBY	Protokorm benzeri yapı
IAA	İndol-3-asetikasit
mg	Miligram

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

Bitkiler, fotosentezle güneş enerjisini kimyasal bağ enerjisiye dönüştürmeleri ile yeryüzündeki canlılığın ana kaynakları olmalarının yanı sıra renkleri, kokuları ve görünüşleriyle dünyamızı yaşanılır kılan canlılardır. Ayrıca bitkiler besin kaynağı, giyim, ilaç ve daha pek çok malzemenin üretildiği kaynaklardır.

Anadolu coğrafyası, 3000 den fazlası endemik olmak üzere, 10000 civarında bitki türüyle zengin bir floraya sahiptir. Ülkemizde doğal olarak yetişen ve 140 kadar türle bu flora zenginliğine katkıda bulunan bitkilerin arasında “orkideler” olarak bilinen türler de yer alır. Orkide denildiğinde akla ilk olarak tropikal bölgelerde yetiştirilen ya da yetişen, gösterişli, çeşitli şekil ve renklerde çiçekleri olan, pahalı süs bitkileri gelir. Süs bitkisi olarak bilinen orkidelerin yanı sıra, başta Türkiye olmak üzere çevre ülkelerde doğal olarak yetişen ve salep olarak adlandırılan bir orkide grubu daha bulunur. Salep orkideleri Orchidaceae (Orkidegiller) familyasının önemli bir bölümünü oluşturur (Gümüş, 2009).

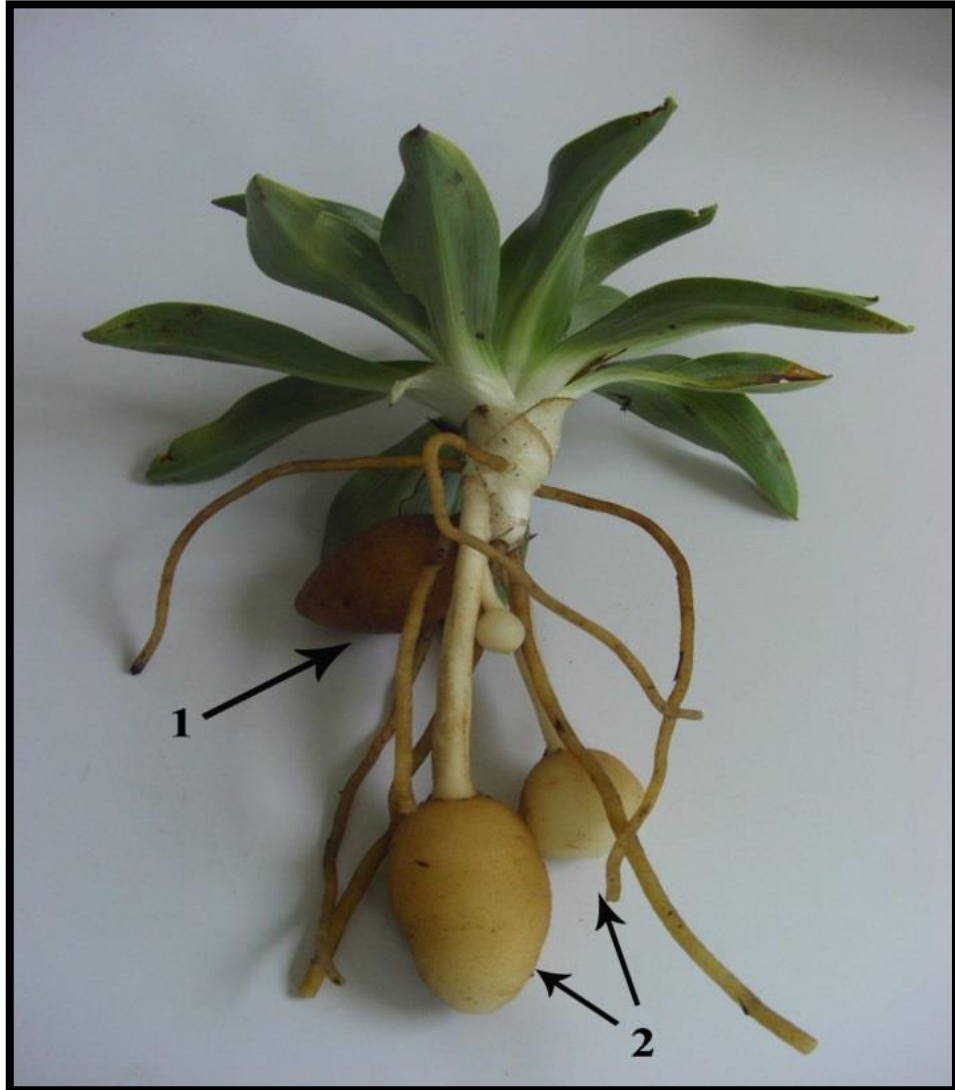
Orchidaceae familyası, çiçekli bitkilerin tür sayısı bakımından en fazla ve yeryüzünde en geniş yayılışa sahip olan familyalarından biridir. Dünya genelinde 800 civarı cinsi ve yaklaşık 30.000 türü olduğu belirlenmiştir (Arditti ve Ghani, 2000). Türkiye’de 24 cins ve 140 türün doğal olarak yetiştiği bildirilmiştir (Sezik, 1984; Akgül, 1993). Yurdumuzda doğal olarak yetişen bu 140 türün %13’ünün endemik olduğu belirlenmiştir (Erdem, 2004). Ülkemizde yetişen türler ılıman kuşak orkideleri ya da karasal orkideler (terrestrial orchids) olarak adlandırılırlar. Çiçeklerinin çok küçük olmasının dışında temel özellikleriyle diğer orkidelerle benzer çiçek yapısına sahiptirler. İlıman kuşak orkidelerinin bir kısmı saprofit olarak yaşarlar.

Epifitik orkideler, tropikal iklimlerde başka bitkilerin gövde ve dalları üzerinde yaşamakta ya da gerekli koşulların sağlandığı seralarda ticari amaçlı üretimleri yapılmaktadır. Epifitik orkideler, gösterişli çiçeklerinden dolayı süs bitkisi olarak değerlendirilir. Bununla birlikte fotosentez yapma yeteneğinde olup, parazit değildirler.

İlıman kuşak veya karasal orkidelerin toprakaltı organları; yumru (kök tuberi), kök ve rizom olarak farklılık gösterir. Tuberler genellikle yuvarlak, elipsoid, uzamış ya da dallanmış olabilir. Tuberlerin şekilleri ve hatta büyüklükleri bazı cinslerin ayırımında



önemli bir anahtar olabilir. Tuberler genellikle iki tane olup bunlar birbirine yapışık durumdadır. Birisi yetiştiği yıla ait olan genç tuber, diğeri ise bir önceki yıla ait tuberdir. Kış mevsimini bir önceki yıl oluşan tuberde depolanan besin maddeleriyle geçiren bitkinin ek köklerinden biri bahara doğru kalınlaşmaya başlar ve ucunda bir tuber meydana getirir. Bu tuber gelişirken bir tomurcuk vasıtasıyla yeni yılın gövdesi de gelişmeye başlar. Bitkinin gelişmesi ilerledikçe yeni tuberde gelişir. Eski tuberdeki mevcut depo maddeleri geliştirmekte olan bitki tarafından kullanıldığı için, büyüme mevsiminin sonunda yeni oluşan tuberin yanında içi boş olarak bulunur (Sezik, 1984).



Şekil 1. Salep orkidelerine ait tuberlerin görünüşleri. 1: bir önceki yıla ait tuber, 2: yeni oluşan tuberler

Türkiye’de 117 farklı orkide türünden salep elde edilmektedir. Türkiye’de çoğunlukla Batı (İzmir ve çevresi), Güneybatı (Muğla ve çevresi), Güney (Maraş, Adıyaman, Antalya, Silifke civarı) ve Kuzey Anadolu (Kastamonu ve çevresi) olmakla beraber Anadolu’nun birçok yerinde yetişir. Ülkemizde yetişen orkide türleri arasında yer alan *Orchis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Platanthera*, *Anacamptis*, *Dactylorhiza* cinslerine ait olanlar başta olmak üzere birçok tür doğadan toplanarak salep üretiminde kullanılır (Sezik, 2002).

Salep, yumrulu (kök tuberi) orkidelerden elde edilir. Önceleri değişik amaçlarla ilaç yapımında kullanılan salep günümüzde daha çok gıda katkısı olarak değerlendirilmektedir. Salebin doğadan sökülmesini takiben uygulanan işlemler Sezik (1984) tarafından açıkça belirtilmiştir. Genel olarak bitkilerin çiçeklenme döneminde tuberleri topraktan sökülür ve yeni yıla ait tuber alınır (bazen eski tuberlerde alınır). Toplanan taze tuberlerin üzerindeki toprak ve diğer maddeler su ile yıkanarak temizlenir. Temizlenen tuberler su, süt ya da ayran içerisinde kaynatılır. Kaynatmanın esas sebebi tuberlerin içsel gelişimini durdurmak ve baharda yeni bir orkidenin oluşmasını engellemektir. Ayrıca kaynatma işlemi salebin kendine has aromasının ortaya çıkmasını sağlar. Kaynatılan tuberler daha sonra soğuk suyla yıkanır ve ipe dizilerek ya da uygun bir zemine serilerek diş kesmeyecek ve elle kırılmayacak hale gelinceye kadar kurutulur. Kurutulan tuberler değirmenlerde toz haline getirilir.

Salep geleneksel olarak iştah ve zihin açıcı, felç giderici, nefsi kuvvetlendirici ve afrodisyak olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Ayrıca kalbi kuvvetlendirici ve ciğer ağrılarının tedavisinde kullanıldığı da bilinmektedir. İbn-i Sina'nın “Kanun” adlı eserinin 2. cildinde (Edviyei Müfrede) Hüssa-el sal'eb ve Hüssa-el kelb başlıkları altında saleple ilgili çok geniş bilgiler bulunmaktadır. Salep, Osmanlı Sarayı'nın “Helvahane”sinde her sene padişahlar için pişirilen macunların kaydedildiği defterde de yer almıştır. Bu örnekler, salebin Osmanlılar ’da ve daha önceki devirlerdeki tıpta önemli bir yeri olduğunu, değişik formları halinde ve değişik amaçlar için ilaç olarak kullanıldığını göstermektedir. Batı kaynakları da salebin Dioscorides'ten beri asırlarca afrodisyak olarak Avrupa ve özellikle doğu ülkelerinde kullanıldığını belirtmektedirler. Son yıllarda salebin geleneksel kullanımından vazgeçilmiş sadece gıda katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır (Sezik, 1984).

Dondurma ve içeceklerde kullanımının yanı sıra, genel olarak salep içerdiği yüksek musilajdan dolayı (%57’den fazla) insanlarda doğal mukoza koruyucu, mide ülserini

dindirici ya da tedavi edici, solunum sistemini temizleyici, çocuklarda ishal önleyici ve afrodisyak olarak geleneksel ya da tıbbi alanlarda da kullanılır. Ayrıca tablet halinde kullanılan bazı güçlü ilaçların kaplanması da kullanılır. 1996 yılında salep özellikle çocuklarda anemide kullanılan farmasötik madde olarak resmi listede yer almıştır (Kasperek ve Grimm, 1999).

Salep üretiminde kullanılan orkidelerin yapılarında glukomannanlar (%7-61), nişasta (%1-36), şekerler (%2-3) ve azotlu maddeler (%0,5-1) bulunur. Salebin etken maddesi glukomannanlardır. Glukomannanlar su, ayran ya da süt içerisinde şişer ve viskoz bir çözelti meydana getirirler. Salebin kalitesi elde edildiği türün kimyasal kompozisyonuna bağlıdır ve ortalama % 40 civarı ya da üzerinde glukomannan içeren türlerden kaliteli salep elde edilir. Bu madde, 3 molekül mannozun 1 molekül glukoz ile  $\beta$  (1-4) bağıyla bağlanıp, polimerleşmesi sonucu meydana gelen heterojen yapıda bir poliholozittir. İçecek olarak tüketilen salebe kıvam veya katkı maddesi olarak Maraş dondurmasına geç erime ve sertlik sağlayan, salepteki glukomannanlardır. Yapıda bulunan az miktardaki nişasta da, şişme özelliği dolayısıyla, glukomannanlara yardımcı olur (Sezik, 1984).

Tablo 1. Bazı salep orkidesi tuberlerinin kimyasal içerikleri (g/100g)\*

Türler	Glukomannan	Nişasta	Protein
<i>Orchis italica</i> Poir.	54,6	5,44	3,92
<i>Orchis morio</i> L.	51,2	7,99	4,95
<i>Dactylorhiza osmanica</i> (Kl.) Soo var. <i>osmanica</i> (Kl.) Soo	22,5	38,7	3,11
<i>Orchis simia</i> Lam.	38,3	10,4	3,53
<i>Serapias vomeracea</i> (Burm. F.) Briq.	44,8	13,4	4,83
<i>Orchis anatolica</i> Boiss.	43,5	14,7	3,20
<i>Orchis coriophora</i> L.	29,0	17,0	3,16
<i>Ophrys mammosa</i> Desf.	17,7	33,8	3,25

\* Tekinşen ve Güner, (2010)'dan alınmıştır.

Türkiye'de doğal olarak yetişen orkidelerin tuberleri asırlarca salep üretimi için toplanmış, hem yurt içinde kullanılmış hem de başta Suriye, Yunanistan, Ürdün, Lübnan, İsrail, Suudi Arabistan ve Kıbrıs gibi ülkeler olmak üzere diğer ülkelere de ihraç edilmiştir.

Orkide tuberlerinden elde edilen salep, içecek ve dondurma sanayiinde ve bazı drogların üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla her yıl milyonlarca orkide doğadan sklmekte ve gelecek yıl oluşacak olan bitki yok edilmektedir. Diğer ekonomik bitkilerde olduğu gibi doğadan toplanarak kullanılan bu bitkilerin sayıları her yıl biraz daha azalmakta ve yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadır (Ekim vd., 1989). Orkide türlerinin popülasyonlarının hızla azalması sonucunda, Tarım Bakanlığı 1974 yılında orkide tuberlerinin ihracatını yasaklamıştır (Sezik, 1984). 1995 yılına kadar süren toz salep ihracatı da, aynı yıl durdurulmuştur. Ayrıca, 2004'te bu bitkilerin doğadan sklmelerini sınırlayan ‘‘Doğal iek Soğanlarının Skm, retimi ve Ticaretine İlişkin Yönetmelik’’ yürürlüğe girmiştir. Bu yönetmelik ‘‘Nesilleri Tehlikede Olan Doğal Bitki ve Hayvan Türlerinin Uluslararası Ticaretinin Düzenlenmesine Dair Anlaşma’’ -CITES hükümlerine uyarlanmıştır. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın, Doğal iek Soğanlarının 2006 yılı İhracat Listesi Hakkındaki 2005/44 no'lu tebliği ile numaraları belirtilen Orchidaceae (salep) türlerinin tuber ve droglarında (toz, tablet) ve her türlü formdaki ihracatı yasaklanmıştır.

Tuberler yaş iken 2-7 g olduğuna göre, ortalama 4 g olarak düşünülürse 1 kg taze tuber için 250 adet orkidenin sökülmesi gerekmektedir. 1 kg toz salep üretmek için yaklaşık 1000-4000 tubere ihtiyaç duyulur (Sezik, 1984). Bu şekilde yılda 45 ton salebin, 40 farklı orkide türüne ait 40 – 180 milyon adet bitkinin sökülmesiyle elde edildiği bildirilmiştir (Erdem, 2004). Tamamen doğada doğal olarak yetişen bitkilerden karşılanan bu işlem ciddi ekolojik tahribata yol açmaktadır. Zira bu bitkiler bir yıl sonrası için rezerv olan bu tuberlerden neslini devam ettirebilirler.

Doğada tohumlarından çimlenmeleri çok güçtür ve uzun zaman alır. Orkide tohumları 0.25-1.2 mm uzunluğunda ve 0.09-0.27 mm genişliğindedir. Ağırlıkları ise 0.3-1.4  $\mu\text{g}$ 'dır (Arditti, 1967). Toz gibi bir yapıda olup gözle tek bir tohumun ayırt edilmesi bile güçtür. Bu sayede rzgrla ya da suyla uzak mesafelere kolayca taşınabilirler (Arditti ve Ghani, 2000). Bütün iekli bitkiler arasında en küçük tohuma sahip bitkilerdir (Mitchell, 1989). Gevşek ve şeffaf bir hücre tabakasından oluşan ince bir tohum kabuğuyla kaplanmıştır ve bu tohumların endospermi (besin dokusu) yoktur. Tohum kabuğu içinde sadece embriyo yer alır. Bu tohumların çimlenebilmesi için sıcaklık, işık, nem ve oksijen gibi tüm diğer tohumların ihtiyaç duyduğu uygun ekolojik koşulların yanı sıra bir de ‘‘mikorizal fungus’’ ile bir ortalık kurma ihtiyaı bulunmaktadır.



Şekil 2. Salep orkidelerinin olgun tohumlarının mikroskop görüntüleri, Bar: 1mm

Orkide türleri çoğunlukla *Rhizoctonia* sp. funguslarıyla simbiyoz girerler (Andersen ve Rasmussen, 1996). Fotosentez yapma yeteneğine sahip orkidelerin fungusa olan bağımlılıkları ortadan kalkar (*Corallorhiza* sp. ve *Neottia* sp. türleri hariç). Bu simbiyotik yaşamda, bahar ve yaz mevsiminde orkide tohumuna ait hücreler baskınken, sonbahar ve kış aylarında fungus hücreleri baskındır. Tohum çimlendiğinde yuvarlak yumurta şekilli bir yapı oluşturur. Aynı yapı, yapraktan ya da kök ucundan yapılan rejenerasyon sonucunda da meydana gelir. Bu sebepten dolayı bu yapılar, protokorm benzeri yapı (PBY) olarak Türkçeye çevrilen, “protokorm like bodies” kelimelerinin baş harflerden yapılan PLB kısaltması ile anılır (Kamemoto vd., 1999). Aynı zamanda mikorizom adıyla da anılırlar. Birçok olumsuzluğa rağmen, günümüzde az da olsa orkide türlerinin

bulunabilmesi, doğada çok az miktarda tohumun çimlenip tuber oluşturmasına bağlıdır (Gönülşen vd., 1996).

Orkide türlerinin tuber ve yapraklarının oluşması için uzun yıllar gerekir. En kısa ortalama süre 2-4 yıldır. *Orchis*, *Ophrys* ve *Dactylorhiza* türlerinde bitkinin ilk yaprakları ortalama 4, *Epipactis* Zinn ve *Cephalanthera* Rich. türlerinde 2-3 yıl sonra meydana gelir. *Spiranthes aestivalis* (Poir.) Rich. türünün ilk tuberi oluşturması 9 yılı bulmaktadır. *Neottia* Guett. türlerinde ilk çiçek 9-12 yıl sonra meydana gelmektedir. *Listera* R. Br. türlerinde ise 4. yılda ilk yaprak meydana gelir, fakat bitki ancak 15. yılda çiçek açar. *Cypripedium* L. türlerinde ise ergin bir ferdin meydana gelmesi için 16 yıl veya daha uzun bir süre beklemek gerekir (Gümüş, 2009).

Orkidelerin çoğunlukla generatif yolla ürerler fakat bazen vejetatif yolla üredikleri de görülmektedir. Olumsuz çevre koşulları nedeniyle gelişimlerini tamamlayamayan türler nesillerini devam ettirmek için vejetatif yolu tercih edebilirler. *Orchis*, *Dactylorhiza* ve *Ophrys* türlerinin tuberleri, zamanla birbirinden ayrılıp 2 ayrı bitki meydana getirirler ve kümeler oluştururlar. Doğada büyük *Dactylorhiza* kümelerine rastlanmasının sebeplerinden biri de bu vejetatif çoğalma şeklidir (Sezik, 1984).

Salep orkidelerinin aşağıda verilen nedenlerden dolayı tarımı ya da vejetatif üretimi yapılamamaktadır.

- tohumlarının çok küçük, besin deposu bakımından eksik ve kusurlu olması
- çimlenme için mikorizal bir fungusla işbirliğine ihtiyaç duyması
- çimlenmeden sonra da yetişkin bir bitki haline gelinceye kadar uzun yıllar geçmesi
- ayrıca uygulanabilir vejetatif yollarla çoğaltım olanaklarının sınırlı ya da hiç olmaması üretimini ya da tarımını kısıtlamaktadır.

Ancak, doku kültürü yöntemleriyle tohumların çimlendirilmesi, bitki ve tuber elde edilebilme olanağı, sentetik tohumlarının üretilmesi gerçekleştirilebilmektedir. Bu sayede orkidelerin yok olma riskinin ortadan kaldırılacağı ve üretim yöntemlerinin geliştirilebileceği yönünde bir ışık bulunmaktadır.

## 1.2. Orchidaceae Familyasının Morfolojik Özellikleri

Orchidaceae (Salepgiller veya Orkidegiller), Asparagales takımına ait bir familyadır. Çiçekli bitkilerin ikinci büyük familyasıdır. Dünyada yaklaşık 880 cins ve 22 binden fazla

tür ihtiva etmektedir. Geniş yayılışlıdır, çoğunluğu tropiklerde yayılmış, soğuk ılıman ve subarktik bölgelerde daha az yayılmışlardır (Simson, 2006).

Tuberli, rizomlu çok yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar basit, bazen pul şeklinde; almaşık (alternat), bazen iki sıralı, nadiren karşılıklı veya çevrel (vertisillat) şeklindedir. Çiçek durumu tek salkım (rasem), başak veya bileşik salkımdır. Çiçekler er dişi, nadiren tek eşeyli, zigomorf, nadiren aktinomorf simetriye sahiptir. Çiçek örtü yaprakları (periyant) perigon halinde ve 2 dairede, her dairede 3 tepal mevcut, iç dairenin orta yaprağı bazen birkaç loplu belirgin bir dudak şeklini almış ve açılmış çiçekte aşağıya doğru sarkmıştır. Ekseriye bu perigon yaprağı nektaryum ihtiva eder. Androkeum 1 veya 2 stamenden oluşur. Ginekeum 3 bileşik karpelli, yumurtalık alt durumlu, tohum taslağı (ovül) çok sayıdadır. Meyve küçük ve bol tohumlu kapsül halindedir. Tohumlarda embriyo çok küçük, farklılaşmamış ve endosperm (besi doku) bulunmaz.

Orkidelerin pek çoğu, çok yıllık basit yapraklı bitkilerdir, gelişme durumlarına göre dört grupta toplanabilirler (Kreutz, 1998);

- a) Ağaçlar üzerine hava kökleriyle tutunanlar (epifit).
- b) Taşlara tutunanlar (litofit).
- c) Kökleriyle toprağa bağlı olan orta kuşak orkideler (terrestrial).
- d) Çürükçül grup orkideler.
- e) Parazit gurup

Çalışma kapsamında, Orchidaceae familyasına ait ve Türkiye’de salep üretiminde kullanılan orta kuşak orkidelerinden (terrestrial ya da karasal orkideler), *Orchis sancta* ve *Serapias vomeracea* değerlendirilmiştir.

### 1.2.1. *Orchis sancta* L.’nin Morfolojik Özellikleri

Çok yıllık otsu bir bitkidir. Çiçeklenme zamanı Nisan ile Haziran ayları arasındadır. Yukarıya doğru uzayan 2 adet küremsi-elipsoid tuberleri vardır. Genellikle çimenli yerlerde ve kalkerli topraklarda, 0-450 m yükseklikleri arasında yetişirler. Doğu Akdeniz elementi olan bu tür Yunanistan, Ege, Kıbrıs ve Batı Suriye bölgelerinde yayılış gösterir. Türkiye’de genellikle Batı ve Güney Anadolu’da özellikle Antalya, Aydın, Hatay, Isparta, İçel, İzmir Manisa ve Muğla civarlarında yayılış gösterir (Davis, 1982).

Familya : Orchidaceae  
 Cins : *Orchis* L.  
 Tür : *Orchis sancta* L.



Şekil 3. Doğal ortamlarda yetişen *Orchis sancta* bireyleri



Şekil 4. *Orchis sancta*'nın Türkiye'deki yayılış alanları

### 1.2.2. *Serapias vomeracea* (Burm. F.) Briq.'nin Morfolojik Özellikleri

Çok yıllık otsu bir bitkidir. Genellikle 2, nadiren 3 ya da 4 adet oval tuber ihtiva eder. Bitkinin uzunluğu 20-40 cm arasındadır. Gövde yeşil, iki adet zarsı bazal yaprak ve 6-8 adet mızrak şeklindeki parlak yeşil ya da kırmızımsı üst yapraklardan oluşur. Boyuna damarlanma gösteren 3-10 adet kırmızı-mor çiçek ihtiva eder. Çiçeklenme zamanı Mart ile Mayıs ayları arasındadır. Genellikle killi topraklarda, makiliklerde, kuru ve ıslak



çayırlıklarda, yol kenarlarında ve harabe yerlerde deniz seviyesinden 1000 m. yüksekliklere kadar yetişebilmektedirler. Doğu Akdeniz elementi olan bu tür Doğu Akdeniz ülkelerinde yayılış gösterir. Türkiye’de genellikle Dış Anadolu’da özellikle İstanbul, Zonguldak, Diyarbakır, Giresun, Hatay, İzmir, Muğla, Ordu, Rize ve Tekirdağ civarlarında yayılış gösterir (Davis, 1982).

Familya : Orchidaceae  
 Cins : *Serapias* L.  
 Tür : *Serapias vomeracea* (BURM. FIL.) BRIQ.



Şekil 5. Doğal ortamlarda yetişen *Serapias vomeracea* bireyleri



Şekil 6. *Serapias vomeracea*'nin Türkiye'deki yayılış alanları

### 1.3. Bitki Doku Kültürü

1900'lü yılların başlarında geliştirilen bitki doku kültürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon ya da kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak doku kültürünün temel amaçları arasında sayılabilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetiksel iyileştirme çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanır (Babaoğlu vd., 2001).

Bitki doku kültürü işlemlerinde genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibariyle üç kısımda incelenebilir; 1) organize olmuş meristematik hücreleri ihtiva eden somatik dokulardan rejenerasyon, 2) meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon ve 3) mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon. Birinci tip rejenerasyonda uç ve yan meristemlerden bitkiler çoğaltılır. Elde edilen hücreler tamamen donör (verici) bitkiye benzerler. İkinci tip rejenerasyon doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının, genellikle bitki büyüme düzenleyicilerinin (özellikle oksin ve sitokinler) etkisi sonucu bölünerek ve organize olarak, organları ve daha sonra da bitkiyi (doğrudan organogenez) veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması (doğrudan somatik embriyogenesis) şeklinde olabilir. Ayrıca her iki durum, belirli bir kallus, protokallus veya hücre süspansiyon oluşumu devresinden sonra da ortaya çıkabilir (dolaylı rejenerasyon). Son olarak normal kromozom sayısının yarısını ihtiva eden hücrelerden doğrudan veya dolaylı yollarla bitki rejenerasyonu olabilir. Bu durumda donör bitkinin kromozom sayısının yarısına sahip, genellikle sterilize olan haploid bitkiler elde edilebilir (Babaoğlu vd., 2001).

Bitki doku kültürleri; 1) türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü, 2) haploit bitki üretimi, 3) somaklonal varyasyon, 4) *in vitro* seleksiyon, 5) *in vitro* döllenme, 6) germplazm muhafazası ve 7) protoplast füzyonu gibi başlıca bitki ıslahı uygulamalarında kullanılmaktadır. Bitki ıslahının yanı sıra, bitki doku kültürleri ticari alanlarda da kullanılmaktadır. Özellikle hastalıksız bitki üretimi, sentetik tohum üretimi,

mikroçoğaltım, sekonder metabolitlerin üretimi ve kimerik bitkilerin oluşturulmasında ilk başvurulan ve sıklıkla kullanılan yöntemdir.

Bitki hücrelerinden embriyo elde edilmesi sadece döllenmiş yumurta hücreleriyle değil *in vitro* kültür şartlarının uygun hale getirilmesiyle, somatik hücre, doku veya organlarla da mümkündür. Vejetatif hücrelerden gelişen bu embriyolar somatik embriyo olarak isimlendirilirler. Somatik doku hücreleri genellikle yüksek oranlarda oksin içeren besi ortamlarında kültüre alınıp sonrasında oksin içermeyen yeni bir ortama aktarılarak embriyo üretme yeteneği kazanırlar (Monier, 1990). Somatik ve zigotik embriyogenez arasındaki en önemli fark elde edilmiş yöntemlerinden kaynaklanmaktadır. Zigotik embriyo döllenmiş bir yumurta hücresinden geliştiği için, elde edilen bitkiler genetiksel farklılıklara açıktır. Diğer taraftan somatik embriyolardan elde edilen bitkiler genetik olarak klondurlar (Bournman, 1994). Somatik embriyogenez bitkilerin hızlı çoğaltılmasında, sentetik tohum üretiminde ve transformasyon çalışmalarında önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak eksplant kaynağı, genotip, bitki büyüme düzenleyicileri, azot kaynağı ve çevre somatik embriyogenezi önemli ölçüde etkileyen faktörlerdir.

Tablo 2. Bitki büyüme düzenleyicilerinin gruplandırılması, işlevleri ve yaygın kullanılanları (Gaspar ve ark., 1996; Haberer ve Kieber, 2002)

BBD	Fonksiyonu	En Yaygın Kullanılanlar
Oksinler	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Köklenmenin teşvik edilmesi</li> <li>- Apikal dominansi</li> <li>- Işığa yönelme</li> <li>- Yan sürgün gelişiminin baskılanması</li> <li>- Hücre gelişimi</li> <li>- Kallus oluşumunun uyarılması, hücre süspansyonlarının eldesi ve somatik embriyo oluşumu</li> <li>- Kallus oluşumu, organogenez ve somatik embriyo oluşumu (sitokininlerle birlikte)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- IBA (indol butirik asit)</li> <li>- IAA (indol asetik asit)</li> <li>- 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetik asit)</li> <li>- NAA (naftalen asetik asit)</li> </ul>
Sitokininler	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, rejenerasyon ve sürgün çoğaltımı</li> <li>- Çiçeklenmenin geciktirilmesi</li> <li>- Yaprak dökülmesinin engellenmesi</li> <li>- Sürgünlerde köklenme ve embriyogenezin engellenmesi</li> <li>- Çimlenmenin artırılması</li> <li>- Yaşlanmanın geciktirilmesi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- BAP/BA (benzilaminopürin/6-benziladenin)</li> <li>- KIN (kinetin)</li> <li>- Adenin Sülfat</li> <li>- 2iP (izo pentil adenin)</li> <li>- TDZ (thidiazuron)</li> <li>- Zeatin</li> </ul>
Giberellinler	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılması</li> <li>- Sürgün boyunun uzaması</li> <li>- Kallus gelişimini, organogenez ve adventif kök oluşumunun engellenmesi</li> <li>- Bitkilerde çiçeklenmenin artırılması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GA3 (Gibberellik asit)</li> </ul>
Absisik Asit	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Somatik embriyoların olgunlaşması</li> <li>- Yaprak ve meyve dökülmesi (absisyon),</li> <li>- Dormansi</li> <li>- Stomaların kapanması</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ABA (Absisik asit)</li> </ul>
Etilen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Meyve olgunlaşması, senesens ve yaprak absisyonunun teşvik edilmesi</li> <li>- Yüksek derişimlerde, mikrotübül ve mikrofibrillerin yerleşimlerini etkileyerek, hücre uzamasının azaltılıp, hücre genişlemesinin artırılması</li> <li>- <i>In vitro</i> kültürlerde, alt kültür sonrasında zamana bağlı olarak, büyüme ve organogenezin inhibe edilmesi</li> <li>- Kallus ve süspansiyon kültürlerinde büyümede, gövde ve kök uzaması, aksillar ve adventif tomurcuk oluşumu, embriyogenez</li> </ul>	
Diğer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poliaminler (polen olgunlaşması, vejetatif sürgün formasyonu, köklenme ve somatik embriyogenez).</li> <li>- Oligosakkarinler (oksin varlığında kallus oluşumunun teşvik edilmesi, oksin yokluğunda yan kök sayısında artış sağlanması (örneğin, buğday embriyo kültürlerinde)</li> <li>- Salisilatlar (çiçeklenme ve tuber oluşumunun uyarılması, bazı patojenlere karşı hastalık direncinin olusturulması için sistemik sinyaldir, çimlenmenin inhibe edilmesi)</li> <li>- Jasmonatlar (patates meristem kültürlerinde tomurcuk formasyonunun teşvik edilmesi, rizogenezin uyarılması ve kallus oluşumunun geciktirilmesi)</li> </ul>	

*In vitro* bitki doku, hücre ve organ kültürlerinin besi ortamlarında, çalışmanın amacına (doku farklılaşması ve gelişmesi, klonal çoğaltım, kallus oluşturma, köklendirme, sekonder metabolit üretimi, patojenden arındırılmış bitki eldesi, germplazmanın uzun veya orta süreli saklanması vb.) bağlı olarak farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılır. Bitki büyüme düzenleyicileri bitkilerde büyüme, gelişme ve üreme gibi olayların düzenlenmesinden sorumludur. Temel olarak, bitki büyüme düzenleyicileri hücre bölünmesi, hücre uzaması ve hücre farklılaşması gibi faaliyetlerin düzenlenmesini içerir. İlk keşfedilen bitki büyüme düzenleyicileri oksinlerdir. Daha sonra, gibberellinler, sitokininler, absisik asit ve etilen tanımlanmıştır. Bu beş bitki büyüme düzenleyici grubu en çok bilinenlerdir. Bunlara ek olarak, poliaminler, oligosakkarinler, salisilatlar, jasmonatlar listeye yeni eklenenlerdir ve yenileri de eklenmeye devam etmektedir (Tablo 2).

### **1.3.1. Bitki Doku Kültürüyle Sentetik Tohum Üretimi**

Sentetik tohum teknolojisi ilk olarak 1977 yılında Murashige adlı araştırmacı tarafından, doğal tohumların yerine geçebilecek bir sistem olarak, somatik embriyoların bir matriks (kapsül) içinde enkapsüle edilerek kullanılması" şeklinde öne sürülmüştür (Redenbaugh vd., 1988). Orkidelerde, somatik embriyo görevini protokorm benzeri yapılar üstlenmektedir ve bu yapıların kaplanması sonucunda sentetik tohumlar oluşturulmaktadır. Buna göre, yöntem, klonal çoğaltım ve tohumla çoğaltımın avantajlarını birleştiren bir yaklaşımdır. Sentetik tohum, kısır ya da kararsız genotipe sahip, genetik yapısı değiştirilmiş bitkilerde, tohum verimliliği indirgenmiş, elle tozlaştırılan hibritlerde ve seçkin germplazmaların kurtarılması gibi pek çok alanda potansiyel kullanıma sahiptir. Sentetik tohumun büyüklüğü ve somatik embriyoyu çevreleyen kapsülün kalınlığı, saklama, taşıma, aktarma ve ekim için avantajlar sağlamaktadır (Redenbaugh vd., 1988). Embriyoların kaplanmasında kullanılan materyal, taşıma ve ekim sırasında embriyoyu koruyacak nitelikte olmalı ve çimlenme ve bitki gelişimini engellememelidir. Ayrıca, kaplama materyali, besin maddelerini ve diğer kimyasalları tutma ve gerektiği zaman bırakma özelliğine de sahip olmalıdır (Redenbaugh vd., 1986). Somatik embriyoların enkapsüle edilmesinde kullanılan en yaygın hidrojel sodyum aljinattır. Sodyum aljinat uygun viskozite ve hızlı jelleşme özelliğine sahiptir, ayrıca bitki için toksik değildir (Onishi vd., 1994).

#### 1.4. Literatür Özeti

Salep, *Orchis* Tourn. ex L., *Anacamptis* Rich., *Ophrys* L., *Serapias* L., *Himantoglossum* Spreng., *Barlia* (Biv.) Parl, *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski ve *Platanthera* Rich. türlerine ait tuberlerden ve tamamen doğadan sökülerek elde edilmektedir (Sezik 1984). Yaşam döngülerini çoğunlukla yeni oluşan tuberlerle ya da çok azda olsa çimlenen tohumlarla tamamlayabilmektedirler. tuberlerin kontrolsüz ve aşırı toplanması ve tohumlarının olgunlaşmasına fırsat vermeden bitkilerin sökülmesi, bu türlerin sayılarında azalmaya ve hatta bazılarının yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmasına neden olmaktadır. Bu türlerin tarımının yapılamaması ve vejetatif olarak çoğaltılamamaları, var olanı sökmek yerine bitkiyi üretmeye yönelik hızlı ve kontrollü çoğaltım yöntemlerinin geliştirilerek kullanılmasını zorunlu hale getirmektedir. Ticari amaçlarla doğadan toplanan bitkilerin korunması amacıyla uygulanabilecek en ideal alternatif yöntemin “üretim” olduğu tüm dünyada kabul edilmektedir. Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki üretilmesi (mikroçoğaltım), birçok bitki türünde olduğu gibi orkidelerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir. Eğer bitkilerin uygun besin maddesi ihtiyaçları, hormon ve kültür istekleri yeterince karşılanırsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman ve Kester, 1975; Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Mikroçoğaltım, ekolojik koşullardan bağımsız olarak yapılmakta ve klasik yöntemlerle çoğaltmaya alternatif bir yaklaşım sağlamaktadır. Büyük boyutlarda yapılan mikroçoğaltım çalışmaları yüksek potansiyel sağlayıp hız, zaman ve yerden kazanç sağlar (Aka-Kacar vd., 2001).

Bu amaçla değişik bitki eksplantları (olgunlaşmış ve olgunlaşmamış tohumlar, sürgün ucu, kök ucu, yaprak, meristem), besin ortamları, hormon kombinasyonları, agar ve şeker düzeyleri ve yetiştirme koşulları kullanılarak Orchidaceae familyasına ait bazı bitkilerin *in vitro* simbiyotik ve asimbiyotik koşullarda üretimi için doku kültürü sistemlerini geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır (Crafts ve Miller, 1974; Arditti vd., 1981; Hadley, 1982; Malmgren, 1992; Özkoç ve Dalcı, 1993; Stewart ve Kane, 2006; Yamazaki ve Miyoshi, 2006; Valetta vd., 2008; Bektaş vd., 2013).

Besi dokusundan yoksun olan orkide tohumları özellikle *Rhizoctonia* sp. türü mantarla ile yaptıkları simbiyotik ortaklık sayesinde doğada azda olsa çimlenebilmektedirler. Bu mantarlarla orkide tohumları arasındaki ilişki yapılan bazı çalışmalarda rapor edilmiştir. Orkide tohumlarının ototrofik safhaya ulaşmak için yeterli

besin içermediği, gereken ek besinleri, endofitik fungusu sindirerek sağladığı belirtilmiştir (Harvais ve Hadley, 1967b). Yapılan bir araştırmada *Rhizoctonia solani* izolatının miselyumunda çeşitli aminoasitlerin bulunduğu belirlenmiştir. (Hadley, 1982). *Dactylorhiza purpurella*'nın yeterli miktarda glutamik asit sentezleyemediği ve bunu sağlamak için simbiyotik fungusa bağımlı olduğu rapor edilmiştir (Harvais ve Pekkala, 1975). Bir başka *Rhizoctonia* türünün de sentezlediği niasini ortama salgıladığı belirlenmiştir (Hijner ve Arditti, 1973). Endofitik fungusların kompleks karbonhidratları parçaladığı, bunları absorbe ederek orkide dokusuna taşıdığı kanıtlanmıştır (Hadley, 1982). Bazı mikorizal fungusların sitokininleri ürettikleri belirtilmiştir (Crafts ve Miller, 1974). Fungusların ürettikleri bu sitokininlerin orkidelerin doğal ortamlarında çimlenmelerine yardımcı olduğu düşünülmektedir.

İnorganik azotun tohum çimlenmesi üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu belirtilmektedir (Malmgren, 1992; Raghavan ve Torrey, 1964; Van Waes ve Debergh, 1986). Stewart ve Kane (2006) ve Anderson (1996) , besi ortamında bulunan organik azot kaynağının orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine olumlu etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Türkiye'de yetişen ılıman kuşak orkidelerinden *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* tohumlarının inorganik azot bulunmayan ortamda daha yüksek oranda çimlendiği tespit edilmiştir (Özkoç ve Dalcı, 1993). Yapılan bir çalışmada, *Orchis coriophora* L. türünün olgunlaşmış tohumları inorganik azot kaynağı içeren ortamlardaki çimlenme oranlarının, organik ve inorganik azotun ikisini de içeren ortamdakinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonucun, organik azot kaynağı olarak ortamda mevcut olan triptondan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Bektaş vd, 2013).

Çimlenmenin başlangıç aşamasında pH çok önemli olduğu halde, fidelerin pH değişimine daha az duyarlı olduğu belirlenmiştir. Orkide türlerin çimlenebilmesi için en uygun pH değerinin türlere göre değişmekte ve 3,0-6,8 arasında değiştiği bildirilmiştir (Arditti, 1967). Daha sonra yapılan çalışmalarda, ılıman kuşak orkidelerinin çimlenebilmeleri için en uygun pH değerinin 5.8 olduğu kaydedilmiştir (Van Waes ve Deberg, 1986). Sıcaklığın orkide tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişimi üzerindeki etkisiyle ilgili yapılan çalışmalarda en uygun sıcaklığın 20- 25 °C olduğu bildirilmiştir (Arditti, 1967; 1979). *Dactylorhiza majalis* (Reichenb) P.F. Hunt and Summer türünde maksimum çimlenmenin 23,5 °C'de olduğu rapor edilmiştir (Rasmussen vd, 1990). Karasal orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine en olumlu etkiye sahip hormonların,

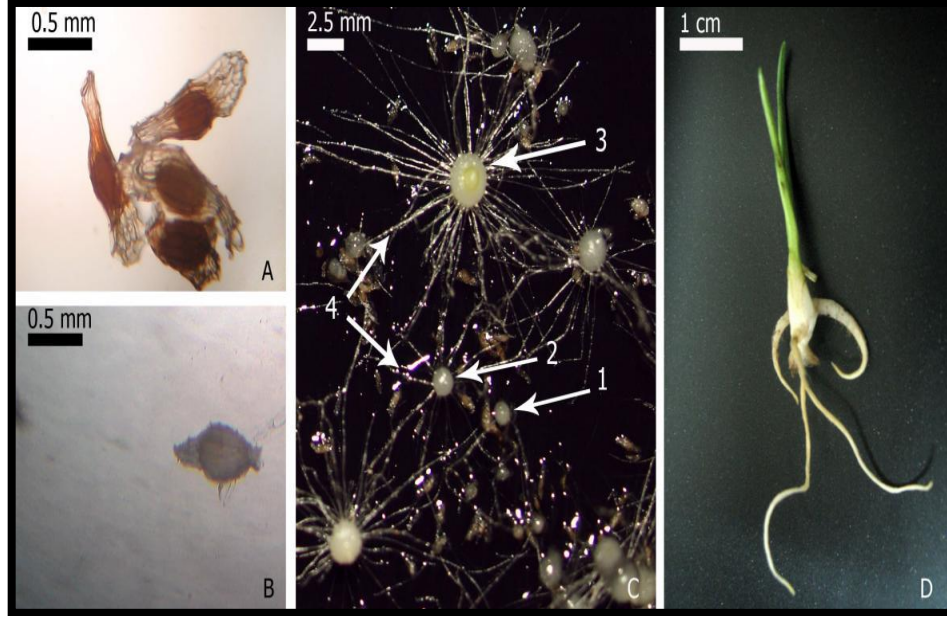
sitokininler olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen, bitki hormonlarının çimlenme üzerindeki etkilerinin oldukça farklı olabileceği bildirilmiştir (Arditti ve Harrison, 1977).

Orkide tohumlarının çimlenmesinde en önemli faktörlerden biri de yüzey sterilizasyonudur. Bu amaçla çimlendirme çalışmalarında sodyum hipoklorit (Van Waes ve Debergh, 1986), kalsiyum hipoklorit (Warren, 1981), civa klorür (Harvais ve Hadley, 1967a), hidrojen peroksit (Bektaş vd, 2013) gibi çeşitli kimyasallar kullanılmıştır.

Yamazaki ve Miyoshi (2006), orkide tohumlarının çimlenme sürecini, embriyonun gelişimsel basamaklarına göre sınıflandırmıştır. Bunların; 1) embriyonun şişmeye ve tohum kabuğunu doldurmaya başladığı “çimlenme öncesi basamak”, 2) embriyonun tohum kabuğunu kırdığı “çimlenme basamağı”, 3) embriyonun tohum kabuğundan tamamen sıyrılıp çıktığı “protokorm basamağı”, 4) protokormun yüzeyinde rizoidlerin olduğu “rizoid basamağı”, 5) ilk sürgün ucunun protokormdan farklılaştığı “sürgün basamağı” olmak üzere 5 aşamadan oluştuğunu rapor etmiştir (Şekil 7).

Önal (1999), *Orchis laxiflora*, *Orchis sancta* ve *Serapias vomeracea* tohumlarını *in vitro*'da çimlendirmiştir. %10 patates özütü ile desteklenen ortamda *Orchis laxiflora* ve *O. sancta* türlerine ait tohumlardan sırasıyla %80 ve %100'lük oranlarla en yüksek çimlenme oranları elde edilmiştir. *Serapias vomeracea* türüne ait tohumlarda ise en yüksek çimlenme oranı (%40), %10 ve %20 muz özütü eklenen Knudson C ortamından elde edilmiştir. En iyi bitki gelişim oranı *Orchis laxiflora*'da %10 hindistan cevizi sütü içeren Knudson C ortamından, *O. sancta*'da %20 patates özütü içeren Knudson C ortamından elde edilmiştir.





Şekil 7. Orkide tohumlarının *in vitro* ortamlardaki gelişim süreçleri (Bektaş vd., 2013)

*Orchis mascula* L. türünde *in vitro* koşullarda farklı içeriğe sahip 6 besi ortamının çimlenme üzerine etkileri araştırılmış ve çimlenme oranının en yüksek 6-benziladenin ve aktif karbon içeren Orchimax ortamında olduğu tespit edilmiştir. Sürekli karanlık koşullarda kültüre alınan denemelerde çimlenme görülmemiştir. 16/8 h aydınlık/karanlık fotoperiyodunda kültüre alınan tohumların, 20-30 gün aralığında şişmeye başladığı, 3 ay sonra tohum kabuğundan sıyrılıp rizoidleri verdiği, 4-5 ay aralığında sürgün uçlarının belirginleştiği, 5-6 ay aralığında da ilk görünür yaprakların oluştuğu görülmüştür. Sonraki iki ay boyunca da köklerin ve tuberlerin oluştuğu ve yeşil yaprakların geliştiği gözlenmiştir. Toprağa aktarılan bitkilerin mikorizal fungusa ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir (Valletta vd, 2008).

*In vitro* koşullarda *Dactylorhiza* türlerinin kök ve sürgün gelişimi üzerine bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi araştırılmış, 6-benziladenin'in tek başına ya da IBA ile kombinasyonları şeklinde ortama eklenmesinin sürgün uzunluğunu artırdığı rapor edilmiştir. IBA ve NAA ile desteklenen ortamlarda kök uzunluğu ve kök gelişme oranı artmıştır (Wotavova-Novotna vd., 2007).

Kültür ortamında orkide hücreleri ortama yüksek miktarda fenolik bileşikler salgırlar. Bu fenoliklerin ortamda birikmesi bitkilerin ölümüne neden olur. Compton ve Preece (1986), eksplantın hızlı bir şekilde taze besi ortamına aktarılmasının tavsiye edilen

bir yol olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ortama aktif karbon ya da askorbik asit ilavesiyle bu sorunun üstesinden gelinebileceği rapor edilmiştir (Seenı ve Latha, 1992; Seenı ve Latha, 2000). Ayrıca aktif karbon ilavesinin kültür ortamındaki pH seviyesini artırdığı ve pH seviyesinin kültüre alma süresince sabit kalmasını sağladığı, azot alınımını artırarak büyümeyi teşvik ettiği tespit edilmiştir (Eymar vd., 2000).

Stewart ve Kane (2006), altı farklı besin ortamının, 4 farklı sitokininin ve 3 fotoperiyodik rejimin *Haberina macroceratitis* tohumlarının çimlenmesi üzerine etkilerini araştırmışlar ve en uygun ortamı tespit etmeye çalışmışlardır. Lindemann ve Knudson C ortamları 8 hafta sonunda en yüksek çimlenme oranını vermiştir. Protokorm oluşumu ise Malmgren ortamında 8-16 hafta sonra meydana gelmiştir. Zeatin ve kinetin'in 1 µM'lık derişiminin çimlenme oranını artırdığını tespit edilmişlerdir. %91,17'lik toplam çimlenme oranı ve protokorm oluşumu, tümüyle karanlıkta elde edilmiştir. Fide gelişimi için 8/16-saat fotoperiyot rejiminin daha uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Andronova ve Ivasenko (2007), *in vitro* ortamda çimlendirilen *Dactylorhiza maculata* türüne ait tohumlardan oluşturdukları 13 ve 18 aylık olan bitkileri laboratuvarında ve dış koşullarda toprağa transfer etmişlerdir. Laboratuvarında kalanlardan 13 aylıklarda % 45, 18 aylık bitkilerde ise % 83 canlılık görülürken; dış koşullarda bırakılanlardan 13 aylık bitkilerde % 8, 18 aylık bitkilerde ise % 30 canlılık oranı elde edilmiştir.

Gümüş ve arkadaşları (2008), Batı Karadeniz Bölgesi'nde salep elde edilen 6 farklı orkide türünü toplayarak *in vitro* ortamlarda çalışmışlardır. Çalışmada MS, ½ MS, VWD ve Knudson C ortamlarını denemiş ve en yüksek çimlenme oranını *D. nieschalkiorum* türünden % 24.41 ile VWD ortamından elde edildiğini bildirmişlerdir. Protokorm oluşumunun ise sadece 3 türde meydana geldiği ve en yüksek protokorm oluşum oranının % 13.11 ile *D. nieschalkiorum*'dan elde edilmiştir.

*Phalaenopsis* Little Steve çeşidinin yaprak parçalarının eksplant olarak kullanıldığı bir çalışmada 2,4-D (0,45; 2,26 ve 4,52 µM), kinetin (2,32; 4,65; 13,95 µM), BA (2,22; 4,44; 13,32 µM) ve TDZ (2,27; 4,54; 13,62 µM) dozları denenmiştir. Besi ortamı olarak, 10 mg/L Myo-inositol, 0.5 mg/L niasin, 0.5 mg/L pridoksin HCl, 2 mg/L glisin, 1 g/L pepton, 170mg/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,2g/L gelrit ve 20g/L şeker karışımı ihtiva eden ½ MS kullanmıştır. TDZ'nin ve BA'nın, yaralanmış yaprak parçalarında embriyo oluşturduğu, KİN'in etkili olmadığı gözlenmiştir. 2,4-D'nin ise engelleyici etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Kuo vd., 2005). Aktar ve arkadaşları (2007), *Dendrobium* orkidelerinin, Vacin&Went besı ortamında, IBA'nın 0; 0,5; 1,0; 1,5 ve 2,0 mg/L derişimlerinin, kök

sayısı, kök uzunluğu kök yaş ağırlığı ve kök oluşum zamanı üzerine etkilerini araştırmışlardır. IBA'nın derişimlerinin araştırılan dört parametre üzerinde önemli etkilerinin olduğu belirlenmiştir.

Bailes ve arkadaşları (1986), karasal orkidelerin *in vitro* üretiminde karşılaşılan en önemli sorunlardan birinin aklimasyon çalışmalarının olduğunu bildirmişlerdir. *In vitro* ortamda büyütülen ve daha sonra toprağa aktarılan bitkilerin çoğunun hayatını sürdüremediği tespit edilmiştir. Sera ya da tarla koşullarına aktarılan bitkiler, kültür ortamına göre daha düşük bağıl neme, daha yüksek ışık şiddetine ve sterilize olmayan bir ortama maruz kaldıklarından, stres altındadırlar. Toprağa aktarma çalışmalarının başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için uygun *ex vitro* koşullar ve uygun araçların kullanılması gerekmektedir (Hazarika, 2003). Aklimatizasyon çalışmaları, bitkileri *in vitro*'da alıştırmaya başlayarak ya da toprağa transfer edildikten sonra ABA gibi anti-transpirantlarla terleme oranını azlatarak hızlandırılabilir (Pospisilova vd., 1999). Kishor ve arkadaşları (2006), toprağa transfer edilen orkideler için uygun büyüme ortamının özelliklerinin, maksimum su tutma kapasitesinde, porozitede ve drenajda olması gerektiğini bildirmişlerdir.

*Habenaria bractescens* Lindl. türünün *in vitro* bitki rejenerasyonu ve yumru (tuber) oluşturulması çalışmalarında BA'nın ve sukrozun farklı derişimleri ile desteklenen MS ortamı kullanılmış, tuber köklerinin oluşmasında en etkili derişimlerin, 4,41  $\mu\text{M}$  BA ve 87,6 mM sukroz derişimleri olduğu belirlenmiştir. Kök tuberlerinin 45 gün sonra oluştuğu belirtilmiştir. Oluşan tuberler herhangi bir aklimasyon çalışması yapılmadan başarılı bir şekilde sera ortamında toprağa aktarılmıştır (Medina vd., 2009).

*Dendrobium candidum* (Orchidaceae) türünden protokorm benzeri yapıların oluşturulmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada eksplant olarak boyuna ikiye bölünen protokormlar kullanılmıştır. Kesilen protokormlar, 8,8  $\mu\text{M}$  6-BA ile desteklenen MS (1/2 makroelement ve 1/1 mikroelement içeren) ortamında 40 günde bir altkültürleri yapılarak kallus oluşumuna teşvik edilmiş ve kalluslar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına aktarılarak protokorm benzeri yapıların oluşması sağlanmıştır. 2 cm boya ulaşan PBY'ler vermikulit içeren saksılarda sera ortamına aktarılmış ve oluşan fidelerin %95'inin canlılıklarının devam ettiği bildirilmiştir (Zhao vd., 2008).

Sheelavanthmath ve arkadaşları (2005), *Aerides crispum* orkide türünün PBY'lerinin geniş çapta üretimi için yeni metot geliştirmeye çalışmışlardır. Hindistan cevizi sütü ve farklı derişimlerdeki çeşitli sitokin ve oksinlerle destekli MS ortamında protokormları ve

yaprak parçalarını kültüre almışlardır. PBY oluşumu için en uygun ortamın, 1  $\mu$ M 6-BA ile desteklenen ortam olduğu ve bu ortamdan eksplant başına ortalama 49,1 adet PBY elde edildiği bildirilmiştir. Oluşan PBY'ler bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına alınarak 6-8 hafta içerisinde fideler oluşturulmuştur. Fidelerin daha sonra sera ortamlarında saksılara alındığı ve fidelerin %85'inin canlılığını sürdürdüğü gözlemlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde bazı orkidelerin (süs orkidelerinin) sentetik tohumlarının üretiminin gerçekleştirildiği görülmektedir. Ancak bu çalışmalar birkaç türle sınırlı kalmıştır. Çalışma kapsamında ele alınan *Serapias vomeracea* ve *Orchis sancta* türlerine ait herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Orkidelerin sentetik tohumları protokorm benzeri yapıların alginat ile kaplanmasıyla elde edilmektedir. Saiprasad ve Polisetty (2003) yaptıkları çalışmada, üç farklı orkide türünden elde ettikleri protokorm benzeri yapıları alginat ile kaplayarak sentetik tohumları üretmişlerdir. Uygun sodyum alginat,  $\text{CaCl}_2$  ve MS besisi ortamının farklı derişimleri denenmiştir. En uygun kaplama yönteminin 75 mM  $\text{CaCl}_2$  solusyonunda katılaştırılan ve %3 sodyum alginat ve  $\frac{3}{4}$  MS içeren sentetik tohumlardan elde edildiğini bildirmişlerdir. 0,54  $\mu$ M NAA ve 0,44  $\mu$ M 6-BA ile desteklenen MS ortamıyla hazırlanan sentetik tohumların %100'ünün bitkiye dönüştüğünü gözlemlenmişlerdir. Oluşturulan bitkilerin hepsi, tek başına ya da briket parçalarıyla kombine edilen odun kömürü ortamlarında canlılıklarını sürdürmüşlerdir.

Literatürde çeşitli kaynaklarda glukomannan özütlenmesi ve saflaştırılmasıyla ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar genel olarak solvent özütlenmesiyle, ultrasonik ve enzimatik yollarla gerçekleştirilmiştir (Yuan vd., 2003; Liu vd., 2005; Chua vd., 2012; Mikkelson vd., 2013). Özellikle *Amorphophallus* türlerinin yumrularının ihtiva ettiği glukomannan miktarları da belirlenmiştir. Bu yöntemler genel olarak glukomannanın asitlerle ya da enzimlerle hidroliziyle ortaya çıkan D-glukoz ve D-mannoz miktarlarının spektrofotometrik yollarla tayini ile gerçekleştirilmektedir (Tekinşen ve Güner, 2010; Chua vd., 2012). Bin ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada öğütülmüş konja yumrularındaki glukomannan miktarını HPLC ile kromotografik yollarla belirlemişler fakat bu yöntemde de glukomannanın hidrolizi sonucu oluşan ürünlerden yararlanılmış hatta kullanılan kolonun sıcaklığını 90°C gibi yüksek derecelere çıkartılarak çalışılmıştır.

Chua ve arkadaşları (2012), üç farklı metot deneyerek (Glucomannan Assay Kit, 3,5-DNS Colorimetric Assay, Phenol-Sulphuricacid Colorimetric Assay) *Amorphophallus konjac* K. Koch türünün yumrularındaki glukomannan miktarlarını belirlemişlerdir. Her bir yöntemden elde edilen sonuçları karşılaştırarak en uygun glukomannan tespit yöntemini

belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara 3,5- DNS colorimetric assay yönteminin diğer yöntemlere göre daha verimli ve güvenilir sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Glucomannan Assay Kit'in enzimatik reaksiyonların tam olarak gerçekleşmemesi gibi nedenlerden dolayı verimli olmadığını ve çok düşük değerler elde edildiğini bildirmişlerdir.

Literatürde bazı salep türlerinin glukomannan içeriklerinin tespiti ile ilgili sadece bir çalışmaya ulaşılmaktadır. Bu çalışmada, Anadolu'da doğal olarak yetişen 10 farklı Orchidaceae familyası türü tuberlerinin glukomannan içerikleri Glucomannan Assay Kit kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *O. italica*, *O. morio*, *O. anatolica*, *O. tridentata* ve *S. vomeracea* ssp. *orientalis* türlerinin tuberlerinin glukomannan içerikleri diğer türlere göre daha yüksek bulunmuştur (Tekinşen ve Güner, 2010).

### 1.5. Tezin Amacı

Tez çalışması kapsamında, bitki doku kültürü, sentetik tohum üretimi gibi bitki biyoteknolojisi alanındaki güncel teknolojiler kullanılarak *Orchis sancta* L. ve *Serapias vomeracea* (Burm. F.) Briq. bitki türlerine yönelik çalışmalar amaçlanmıştır. Bu bağlamda *O. sancta* ve *S. vomeracea* bitkilerinin olgun tohumlarının *in vitro* asimbiyotik çimlendirilmesini, *in vitro* fide ve tuberlerinin üretimini ve fidelerin toprak koşullarına adaptasyonunu, sentetik tohumlarının üretimini ve toprak koşullarına adaptasyonunu, *in vitro*'da oluşturulan tuberlerin glukomannan içeriklerinin belirlenmesini sağlayacak protokoller geliştirilmiştir. Çalışılan orkide türleri üzerine yapılan daha önceki çalışmaların hiçbirisinde sentetik tohum üretimi ve oluşturulan tuberlerin glukomannan içeriklerinin belirlenmesiyle ilgili raporlara rastlanmamıştır. Çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin ve bunların farklı derişimlerinin varlığında, bu türlerin asimbiyotik çimlendirmesi ve fidelerin *in vitro* üretimi konularındaki mevcut çalışmalar kapsamlı değildir.

## **2. YAPILAN ÇALIŞMALAR**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Bitki Materyali**

Araştırmada Türkiye Florasında yetişen ve salep elde edilmesinde kullanılan *S. vomeraceae* ve *O. sancta* türlerinin olgun tohumları, kültürlerin başlatılmasında eksplant olarak kullanılmıştır. *Orchis sancta* L. ve *S. vomeraceae* (Burm. F.) Briq. türlerine ait olgun tohumlar Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Çimlendirilen olgun tohumlardan elde edilen protokormlar ve fideler daha sonraki çalışmalarda eksplant olarak kullanılmıştır.

#### **2.1.2. Besi Ortamlarının Belirlenmesi**

Araştırma kapsamında, olgun tohumların çimlendirilmesi çalışmalarında, farklı içeriklere sahip 4 farklı hazır besi ortamı kullanılmıştır. Kullanılan besi ortamları ve içerikleri Tablo 3’de verilmiştir. Çimlendirme çalışmalarından elde edilen verilere göre en iyi sonucun gözlendiği besi ortamı (Orchimax aktif kömürlü besi ortamı), daha sonraki çalışmalarda temel besi ortamı olarak kullanılmıştır. Besi ortamları katılaştırıcı ajan olarak Phytoagar (Duchefa Biochemie, Netherlands) ve karbon kaynağı olarak sukroz ile desteklenmiştir.

#### **2.1.3. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Belirlenmesi**

Çalışma kapsamında oksin ve sitokinin gruplarına ait farklı bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmıştır. Ayrıca sitokinin benzeri kimyasal olarak kabul edilen Thidiazuron (TDZ) çalışmalarda sitokininler grubunda değerlendirilmiştir. Tüm bitki büyüme düzenleyicileri Duchefa Biochemie (Netherlands) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri Tablo 4’te sunulmuştur.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan besi ortamları ve kimyasal içerikleri

		<b>-OM*</b>	<b>KCM*</b>	<b>LM*</b>	<b>+OM*</b>	<b>MS*</b>
<b>Makro elementler</b> mg/L	CaCl <sub>2</sub>	166,00	-	-	166,0	332,02
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85,00	250,00	135,00	85,00	170,00
	KNO <sub>3</sub>	950,00	-	-	950,0	1900,0
	MgSO <sub>4</sub>	90,35	122,15	58,98	90,35	180,54
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825,00	500,00	-	825,00	1650,00
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	241,30	347,20	-	-
	KCl	-	250,00	1050,00	-	-
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	500,00	1000,00	-	-
<b>Mikro elementler</b> mg/L	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	25,00	-	-	-
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	8,45	5,68	-	8,45	-
	AlCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	0,56	-	-
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0125	-	0,02	0,0125	0,025
	FeSitrat	-	-	4,40	-	-
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,10	-	1,01	3,10	6,20
	KI	0,415	-	0,10	0,415	0,83
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	8,45	-	0,05	8,45	16,90
	NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	0,03	-	-
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,30	-	0,57	5,30	8,60
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0125	-	-	0,0125	0,025
	FeNaEDTA	36,70	-	-	36,70	36,70
	Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125	-	-	0,125	0,25
	<b>Vitaminler</b> mg/L	Miyo-inositol	100,00	-	-	100,00
Nikotinic asit		1,00	-	-	1,00	0,50
Piridoksin HCL		1,00	-	-	1,00	0,50
Tiyamin HCL		10,00	-	-	10,00	0,10
Glisin		-	-	-	-	2,00
<b>Organikli</b> er g/L	Sukroz	20,0	-	-	20,0	-
	Tripton	2,0	-	-	2,0	-
	Aktif Kömür	2,0	-	-	-	-
	MES (mg/L)	1000,0	-	-	1000,0	-

\* -OM: Orchimax aktif kömürsüz besi ortamı, KCM: Knudson C besi ortamı, LM: Lindemann besi ortamı, +OM: Orchimax aktif kömürlü besi ortamı, MS: Murashige ve Skoog besi ortamı çalışma kapsamında kullanılmamıştır. Bitki doku kültürü çalışmalarında en sık kullanılan besi ortamı olduğundan karşılaştırma amaçlı verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri

OKSİNLER	SİTOKİNİNLER
2,4-diklorofenoksi asetik asit, 2,4-D	Zeatin, ZEA
İndol-3-butirik asit, IBA	6-benziladenin (Benzilaminopürin), 6-BA
İndol-3-asetik asit, IAA	2-izopentiladenin [6- $\gamma$ - $\gamma$ -(dimetilallilamino) pürin], 2-iP
	Kinetin (6-furfurilaminopürin), KİN
	Thidiazuron [1-fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)urea], TDZ

## 2.2. Metot

### 2.2.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonunun Yapılması

Eksplant olarak kullanılacak olan olgun tohumların yüzey sterilizasyonları, iki farklı sterilizasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlerde (%5, 10, 20 ve 30) hazırlanan ticari çamaşır suyu (Domestos, %4,5 NaOCl içerir) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%35'lik stok) ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan tohumların, sterilizasyon öncesi ve sonrası canlılık testleri 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride ile yapılarak, uygulanan yöntemin canlılık üzerine etkisine bakılmıştır. Ayrıca sterilize edilen tohumlar besi ortamlarına ekilerek, ortamlardaki kontaminasyon oluşumları gözlenmiştir. Sonuçlar değerlendirilerek tohumlar için en uygun yüzey sterilizasyon yöntemi belirlenmiştir.

#### 2.2.1.1. Çamaşır Suyu ile Yüzey Sterilizasyonunun Yapılması

Çok küçük yapıya sahip olan olgun tohumlar, küçük zarflar şeklinde dikilen filtre kâğıtlarının içerisine yerleştirildikten sonra, hazırlanan %5, 10, 20 ve 30'luk ticari çamaşır suyu solüsyonlarında ayrı ayrı 10'ar dakika bekletilmiştir. Çamaşır suyu solüsyonlarından alınan tohumlar, 3 tekerrür olacak şekilde sterilize saf su içerisinde 5'er dakika bekletilerek durulanmıştır ve spatül ya da pens yardımıyla besi ortamlarının üzerine yayılarak ekimleri



gerçekleştirilmiştir. Her bir deneme grubundan elde edilen sterilize tohumlar için canlılık testi yapılmıştır ve besi ortamlarına ekilerek kontaminasyon oluşumları gözlenmiştir. Her bir deneme grubundan elde edilen sonuçlar, kendi aralarında ve herhangi bir muameleye tabi tutulmayan tohumlardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Kontaminasyon sıklıklarının belirlenmesinde, dış etmenlerden kaynaklanan kontaminasyonlar, tohum ekimi yapılmayan ve aynı besi ortamını ihtiva eden kültür kaplarının, ekim yapılanlarla aynı koşullarda inkübe edilmesiyle belirlenmiştir.

#### **2.2.1.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile Yüzey Sterilizasyonunun Yapılması**

Olgun tohumlar, 1-2 damla çamaşır suyu içeren %5'lik sukroz solüsyonu içerisinde 12 saat oda sıcaklığında vida kapaklı tüplerde bekletilmiştir. 12 saat sonunda, sukroz solüsyonu pipetör yardımıyla çekilerek tüplere %5, 10, 20 ve 30 'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmiştir. Tohumlar 30 dakika H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edilmiştir. Pipetör yardımıyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tüpler içerisinden çekilmiştir. Tohumlar spatül ya da pens yardımıyla besi ortamlarının üzerine yayılarak ekimleri yapılmıştır. Her bir deneme grubundan elde edilen sterilize tohumlar için canlılık testi yapıldı ve besi ortamlarına ekilerek kontaminasyon oluşumları gözlenmiştir. Her bir deneme grubundan elde edilen sonuçlar, kendi aralarında ve herhangi bir muameleye tabi tutulmayan tohumlardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Kontaminasyon sıklıklarının belirlenmesinde, dış etmenlerden kaynaklanan kontaminasyonlar, tohum ekimi yapılmayan ve aynı besi ortamını ihtiva eden kültür kaplarının, ekim yapılanlarla aynı koşullarda inkübe edilmesiyle belirlenmiştir.

#### **2.2.2. Tohumların Canlılık Yüzdelerinin Belirlenmesi**

Tohumların sterilizasyon öncesi ve sonrası canlılık testleri literatürde verilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir (Lauzer vd., 1994). Her bir deneme grubuna ait tohumlar, %1'lik TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride, Sigma-Aldrich, Austria) çözeltisine konulmuştur ve karanlıkta, 30 °C'de, 48 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, tohumlar binoküler mikroskop altında incelendi ve turuncu-kırmızı renkte görünen tohumlar canlı olarak kabul edilmiştir. Elde edilen verilere göre, tohumların yüzey sterilizasyonunda

kullanılan kimyasalların ve farklı derişimlerinin, tohumların canlılıkları üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

### 2.2.3. Besi Ortamlarının Hazırlanması

Tablo 3’de verilen miktarlarda tartılan ticari olarak hazırlanmış hazır besi ortamları 500 mL saf suda çözülmüştür. Besi ortamları, tüm denemelerde standart olarak %2 sukroz ve %0,8 agar ile desteklenmiştir. Orchimax aktif kömürlü ve kömürsüz hazır besi ortamları sukroz içerdiğinden, bu ortamlara sukroz ilavesi yapılmamıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin eklenmesinin ardından çözeltilerin hacmi 1000 mL’ye tamamlanıp, pH’sı 5,7-5,8’e ayarlanmıştır. Besi ortamları, otoklavlanabilir kapaklı şişeler içerisinde, 1 atm basınçta, 121 °C’de, 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besi ortamları hafifçe çalkalanarak agarın homojen dağılması sağlanmıştır ve transfer odasında soğumaya bırakılmıştır. Yüksek sıcaklıkta etkisini kaybeden bitki büyüme düzenleyicileri 0,22µm çapındaki filtrelerle sterilize edilmiştir ve otoklavdan sonra besi ortamı soğumadan ortama eklenmiştir. 40 °C civarına kadar soğutulan besi ortamları, sterilize kabin içerisinde kültür kaplarına aktarılmıştır.

### 2.2.4. *İn Vitro* Kültürlerin Başlatılması

#### 2.2.4.1. *O. sancta* ve *S. vomeracea* Tohumlarının *İn Vitro* Çimlendirilmesi

Tohumların çimlendirilmesi çalışmalarında, besi ortamlarının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin çimlenme ve protokorm oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. İzlenen yöntemler iki ayrı başlık altında aşağıda verilmiştir.

##### 2.2.4.1.1. Farklı Besi Ortamlarının Tohumların Çimlenmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Yüzey sterilizasyonları yapılan *S. vomeraceae* ve *O. sancta* türlerinin olgun tohumlarının, Tablo 4’de verilen besi ortamlarına ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan kültür kapları, 3 ay boyunca 23±1 °C sıcaklıkta 16/8 saat fotoperiyoda ve 32 µmol s<sup>-1</sup> m<sup>2</sup> ışık rejimine ayarlanan iklimlendirme dolabında kültürü yapılmıştır. Kültür kaplarının, her bir

türün denenen besi ortamlarındaki çimlenme sürelerinin belirlenebilmesi için günlük periyotlarda kontrollü olarak takibi yapılmıştır. Tohumların ekiminden 2 ay sonra kültür kaplarındaki çimlenen tohum sayısı tespit edilerek, canlı tohum sayısına göre çimlenme yüzdeleri belirlenmiştir. 90 gün sonunda tekrar sayım yapıp protokorm oluşturma yüzdeleri tespit edilmiştir. *Serapias vomeraceae* ve *O. sancta* tohumlarının denenen besi ortamlarında çimlenme yüzdeleri bakımından karşılaştırması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre tohumların çimlenebileceği ve protokormlarının oluşturulabileceği en uygun ortam belirlenmiştir. Çimlenme ve protokorm oluşum oranları yüzde (%) olarak verilmiştir.

#### **2.2.4.1.2. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Tohumların Çimlenmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi**

Bir önceki çalışma sonucunda çimlenme üzerine en iyi etkiyi gösterdiği belirlenen Orchimax aktif kömürlü besi ortamı kullanılarak farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin ve her birinin farklı derişimlerinin çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdeleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak oksinlerden IBA, IAA ve 2,4-D, sitokininlerden ZEA, 6-BA ve TDZ tek başlarına 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L derişimlerinde besi ortamlarına eklenmiştir. Ekim yapılan kültür kapları, 3 ay boyunca  $23\pm 2$  °C sıcaklıkta 16/8 saat fotoperiyoda ve  $32 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$  ışık rejimine ayarlanan iklim dolaplarında inkübe edilmiştir. Her bir türün denenen besi ortamlarındaki çimlenme sürelerinin belirlenebilmesi için, kültür kaplarının günlük takibi yapılmıştır. Tohumların ekiminden 2 ay sonra kültür kaplarındaki her bir türe ait çimlenen tohum sayısı tespit edilmiştir. Üçüncü ay tekrar sayım yapıp protokorm oluşturma yüzdeleri tespit edilmiştir. Her bir denemeden elde edilen sonuçlar yüzde (%) olarak hesaplanmıştır ve kontrol ile karşılaştırarak, çimlenme yüzdesini ve protokorm oluşturma yüzdesini teşvik eden en etkili bitki büyüme düzenleyicisi ve derişimi belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen Orchimax aktif kömürlü besi ortamı kullanılmıştır.

#### 2.2.4.2. Sitokininlerin Sürgün Oluşumu ve Uzaması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Araştırmanın bu aşamasında, çeşitli sitokininlerin, *S. vomeraceae* ve *O. sancta* türlerine ait sürgün boyları, yaprak sayıları, kök ve tuber oluşumları üzerine etkileri belirlenmiştir. Sitokinin grubundan, 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L derişimlerdeki ZEA, KİN, 2-iP, 6-BA ve TDZ kullanılmıştır. Önceki çalışmalarda elde edilen çimlendirilmiş tohumlardan oluşturulan protokormlar eksplant olarak kullanılmıştır. Ekim yapıldığı anda boyları ölçülen ve ilk boyları belirlenen protokormların, 60 gün sonundaki sürgün boyları belirlenmiştir. 3 ay sonunda oluşan fidelerin, kök sayıları ve uzunlukları ve yaprak sayıları belirlenmiştir. Her bir tür için, aynı bitki büyüme düzenleyicisinin farklı derişimlerini içeren ortamlardan elde edilen veriler kendi aralarında ve aynı derişime sahip farklı bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamlardan elde edilen veriler kendi aralarında istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. *Orchis sancta* türünün 6 ay sonundaki ve *S. vomeracea* türünün 11 ay sonundaki tuber oluşum oranları (%) belirlenmiştir. Her bir deneme 3 tekerrür ve ortalama 20'şer örnek olacak şekilde tasarlanmıştır ve ortalamaları alınmıştır.

#### 2.2.4.3. Oksinlerin Sürgün Oluşumu ve Uzaması Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Araştırmanın bu aşamasında, 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L derişimlerdeki oksin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden IBA, IAA ve 2,4-D'nin, *S. vomeraceae* ve *O. sancta* türlerine ait sürgün boyları, yaprak sayıları, kök ve tuber oluşumları üzerine etkileri belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda elde edilen çimlendirilmiş tohumlardan oluşturulan protokormlar eksplant olarak kullanılmıştır. Ekim yapıldığı anda boyları ölçülen ve ilk boyları belirlenen protokormların, 60 gün sonundaki sürgün boyları belirlenmiştir. 3 ay sonunda oluşan fidelerin, kök sayıları ve uzunlukları ve yaprak sayıları belirlenmiştir. Her bir tür için, aynı bitki büyüme düzenleyicisinin farklı derişimlerini içeren ortamlardan elde edilen veriler kendi aralarında ve aynı derişime sahip farklı bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamlardan elde edilen veriler kendi aralarında istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. *Orchis sancta* türünün 6 ay sonundaki ve *S. vomeracea* türünün 11 ay sonundaki tuber oluşum oranları (%) belirlenmiştir. Her bir deneme 3 tekerrür ve ortalama 20'şer örnek olacak şekilde tasarlanmıştır ve ortalamaları alınmıştır.

## 2.2.5. *O. sancta* ve *S. vomeracea*'nin Sentetik Tohumlarının Üretilmesi

### 2.2.5.1. Protokorm Benzeri Yapıların Oluşturulması ve İzolasyonu

PBY'lerin oluşturulması çalışmalarında, %0,8 Phytoagar, %2 sukroz ve tek başına TDZ (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L derişimlerinde) ya da 1.0 mg/L IBA ile kombinasyonlarıyla desteklenen Orchimax aktif kömürlü besi ortamı kullanılmıştır. Protokorm benzeri yapıların (PBY) oluşturulmasında iki farklı yol izlenmiştir. İlk yöntemde yukarıda bahsedilen ortamlara eksplantlar üzerinde oluşması muhtemel kallus yapılarından, dolaylı olarak PBY rejenerasyonu denenmiştir. İkinci yolda ise eksplant üzerinde doğrudan PBY'lerin rejenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Çimlendirme çalışmalarından elde edilen protokormlar eksplant olarak kullanılmıştır. Boyuna ikiye bölünen protokormlar, kesilen yüzeyleri besi ortamı üzerine gelecek şekilde kültür ortamlarına ekilmiştir. Oluşturulan kültürler 16/8 saat fotoperiyoda ve  $32 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^2$  ışık şiddetine ayarlanan iklim dolaplarında  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. 8 hafta sonunda, her bir ortamdaki protokorm başına oluşan protokorm benzeri yapıların miktarları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan her bir türe ait protokorm benzeri yapıların oluşturulması için en uygun ortamın tespiti gerçekleştirilmiştir.

TDZ'nin farklı derişimlerinin IBA ile kombinasyonu ile desteklenen ortamlarda oluşturulan ve uzunlukları ortalama 0,4 - 0,5 cm olan, *S. vomeracea* ve *O. sancta* türlerine ait protokorm benzeri yapılar, sterilize kabin içerisinde besi ortamı kalıntısı içermeyecek şekilde tek tek parçalara ayrılarak kaplanmaya hazır hale getirilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. *İn vitro* ortamlarda oluşan protokormlar A) +OM ortamında çimlendirilen olgun tohumlardan elde edilen protokormlar B) Protokorm benzeri yapıların oluşturulmasında eksplant olarak kullanılan boyuna ikiye bölünmüş protokormlar

#### 2.2.5.2. Kaplama Matriksinin Hazırlanması ve PBY'lerin Kaplanması

PBY'lerin kaplanması için sodyum alginat ve sentetik besi ortamının katılaştırılması için  $\text{CaCl}_2$  çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin hazırlanışları aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- $\text{CaCl}_2$  ve katılaştırıcı ajan içermeyen sıvı besi ortamı hazırlandı. Besi ortamı içeriği olarak Orchimax aktif kömürsüz besi ortamının kimyasal içeriği tercih edilmiştir. Besi ortamlarına olası kontaminasyonları engellemek için ilave antimikrobiyal ajanlar (Nystatin 100  $\mu\text{g/L}$ , 4-Chloro-3,5-xilenol 100  $\mu\text{g/L}$ ) eklenmiştir. Hazırlanan sıvı besi ortamı 0.22  $\mu\text{m}$  çapındaki filtre geçirilerek sterilize edilmiştir. Ayrıca bu ortam 2,0 mg/L ZEA ve 1,0 mg/L IBA ile desteklenmiştir.
- Hazırlanan ve sterilize hale getirilen sıvı besi ortamlarına %3 (w/v) sodyum alginat eklenmiştir.
- 75 mM'lık  $\text{CaCl}_2$  çözeltileri hazırlandı ve 0.22  $\mu\text{m}$  çapındaki filtre kullanılarak sterilizasyonu yapılmıştır.
- Kaplama matriksinin içerisine yerleştirilen PBY'ler,  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi içerisinde 30 dakika karıştırılarak katılaştırılmıştır.

- Katılaştırılan sentetik tohumlar sterilize saf su ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

### **2.2.5.3. Sentetik Tohumların Farklı Ortamlarda Çimlendirilmesi**

Hazırlanan sentetik tohumların, besi ortamında ve toprak koşullarındaki çimlenme ve fide oluşturma kabiliyetleri araştırılmıştır. Besi ortamı olarak bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen Orchimax aktif karbonlu (+OM) besi ortamı kullanılmıştır. Toprak olarak sterilize edilen ve edilmeyen ticari torf ortamı (Cihan Tarım, Manisa) kullanılmıştır (Analiz değerleri: pH 5,5-6,5, organik madde içeriği %69, nem %53,43 ve su tutma kapasitesi 618). Belirlenen ortamlara ekimi gerçekleştirilen sentetik tohumların 3 ay sonundaki canlılık oranları ve çimlenme yüzdeleri belirlenmiştir.

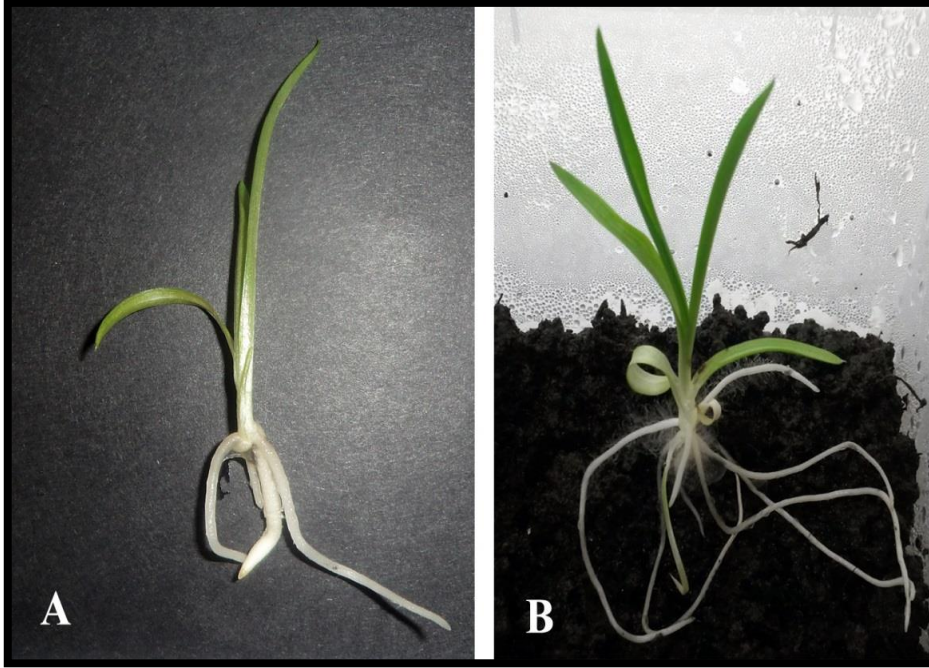
### **2.2.6. *İn Vitro* Koşullarda Oluşturulan Fidelerin Toprak Koşullarına Adapte Edilmesi**

#### **2.2.6.1. Deneme I: Sterilize Edilmeyen Toprak Koşullarına Adaptasyon**

Çimlendirildikten sonra toprak üstü kısımları ve kök oluşumları gerçekleşen *O. sancta* ve *S. vomeracea* (Şekil 9) türlerine ait fideler, besi ortamlarından alınarak toprak koşullarına aktarılmıştır. Besi ortamlarından alınan fideler üzerindeki ortam kalıntıları elle köklere zarar vermeyecek şekilde musluk suyu altında temizlenmiştir. Akan musluk suyu altında, besi ortamına bulaşmış kısımları su içerisinde kalacak şekilde fideler beherler içerisinde en az 30 dk. bekletilmiştir. Beher içerisinden alınan örnekler hafifçe silkelenip fazla sularından arındırıldıktan sonra, bir kısmı antifungal olarak %0,1 kloroksilenol ve %0,1 klorokresol içeren saf su içerisinde 2-3 dk. bekletilmiştir. Hafifçe silkelenen fideler toprağa aktarılmıştır. Toprak türü olarak orman altı toprağı ve ticari olarak satılan torf kullanılmıştır. Her bir saksıya eşit miktarda toprak konu ve eşit miktarda sulama yapılmıştır. Antibiyotikle muamele edilen ve edilmeyen örnekler iki gruba ayrılarak orman altı toprağı ve torfa ekilmiştir. Nem kaybını önlemek için ekim yapılan saksıların üst kısmı kısmen hava alabilecek şekilde 4 hafta kapalı tutulmuştur. Ekilen örneklerin 1 ve 2 ay sonundaki canlılık durumları ve oranları, morfolojik görünümleri belirlenmiştir. Ayrıca canlılığını sürdüren örneklerde tuber oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

### 2.2.6.2. Deneme II: Sterilize Torf Ortamında Adaptasyon

Toprağa aktarma aşamasına gelen fideler (Şekil 9), besi ortamlarından alınarak, ortam kalıntısı kalmayacak şekilde temizlenmiş ve sterilize edilen torf ortamına ekilmiştir. Her bir kültür kabına eşit miktarda toprak konularak sterilize edilmiş saf su ile eşit miktarda sulama yapılmıştır. Nem kaybını ve olası kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için kültür kaplarının kapakları hava almayacak şekilde kapatılarak 30 gün inkübe edilmiştir. 30 gün kapalı tutulduktan sonra kültür kaplarının kapakları açılmış ve fidelerin gelişimleri bu şekilde devam ettirilmiştir. Fidelerin 30 gün sonundaki (sterilize ortamdaki) ve 90 gün sonundaki canlılık oranları belirlenmiştir. Ayrıca canlılığını sürdüren örneklerde tuber oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.



Şekil 9. *In vitro* ortamda gelişen ve toprağa aktarılma aşamasına gelen (A) *O. sancta* ve (B) *S. vomeracea* fideleri



### 2.2.7. Farklı *İn Vitro* Koşullarda Oluşan Tuberlerin Glukomannan Miktarlarının Belirlenmesi

*İn vitro* koşullarda üretilen tuberlerin glukomannan miktarları literatürde verilen fenol-sülfürik asit yöntemiyle belirlenmiştir (Chua vd., 2012). Oksin ve sitokininlerin sürgün oluşumuna etkilerinin belirlendiği çalışmalarda oluşturulan fideler, tuber oluşumu için aynı koşullarda inkübe edilmiştir. *Orchis sancta*'da 6 ay, *S. vomeracea*'de 11 ay inkübe edilen ortanlardan elde edilen tuberler hasat edilmiş ve içerdikleri glukomannan miktarlarının belirlenebilmesi için toz haline getirilmiştir. *Orchis sancta* ve *S. vomeracea* türlerine ait tuberler geleneksel yolla salep tozu haline getirilmiştir. Kaynar su içerisinde 10 dakika kaynatılan tuberler, 50°C'ye ayarlanan etüvlerde kurutulmuştur. Kurutulan tuberler değirmen yardımıyla toz haline getirilmiştir.

0, 16, 32, 48, 64 ve 80 µg/mL glukoz içerecek şekilde hazırlanan solüsyonlar test tüplerine konularak, son hacim 2 ml'ye tamamlanmıştır. 1 ml %5'lik fenol ayırıcı test tüplerindeki örneklerin üzerine eklenmiştir. 5 ml konsantre sülfürik asit (%95-97) hızlı bir şekilde test tüplerine eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilen tüpler daha sonra 25°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Örneklerin spektrofotometrede 490 nm'de absorbansları ölçülmüş ve absorbansa karşılık gelen glukoz miktarı eğrisi çizilmiştir. Mannoz kalibrasyon eğrisi de glukoz için izlenen yolla belirlenmiştir. Glukoz (0 µg glukoz, 2 ml saf su) içermeyen tüpler kör olarak kullanılmıştır.

#### 2.2.7.1. Tuberlerden Glukomannan Özütleme ve Miktarlarının Belirlenmesi

Hazırlanan toz salep materyalinden 0.05 g tartılarak 40 ml saf su içerisinde, 4 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. 4 saat sonunda, son hacim 50 ml'ye tamamlanmış ve elde edilen solüsyon (25 °C, 4000xg, 40 dakika) santrifüj edilmiştir. Süpernatant'tan alınan 4 ml solüsyon saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra Bölüm 2.2.7.1'de açıklanan fenol-sülfürik asit yöntemine tabi tutularak glukomannan içerikleri belirlenmiştir. Tuber oluşumu gözlenen her ortamdan elde edilen materyallerin glukomannan içerikleri ayrı ayrı belirlenerek, ortamlar arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir.

### 2.2.8. İstatistik Analizleri

Verilerin istatistiksel analizleri Microsoft Excel (Office 2007, ToolPack Analyser) ve SPSS, Versiyon 17,0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılıklar ve farklılıkların önem dereceleri One-way ANOVA değişken analizi Duncan testi ile 0,05 olasılık seviyesinde hesaplanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin derişimlerinin artış ya da azalışlarının incelenen parametrelerle ilişkileri korelasyon testleri (Spearman two-tail testi) ile belirlenmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Denenen iki farklı yüzey sterilizasyon yöntemi sonrası elde edilen canlılık yüzdeleri ve kontaminasyon sıklıkları Tablo 5'te verilmiştir. Elde edilen veriler ışığında, sonraki denemelerde uygulanacak olan tüm tohum yüzey sterilizasyonları, belirlenen en uygun protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. Her deneme öncesinde, yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan tohumların canlılık testleri yapılmıştır. Elde edilen canlılık yüzdeleri göz önünde bulundurularak her iki türe ait tohumların çimlenme oranları hesaplanmıştır.

Tablo 5. Tohumların yüzey sterilizasyonu denemeleri sonrası canlılık oranları (%) ve besi ortamlarındaki kontaminasyon sıklıkları (%)

	Derişim (%)	<i>O. sancta</i>	<i>S. vomeracea</i>	Kontaminasyon sıklığı*
Çamaşır suyu	5	75,8±1.4	63,14±1.2	100
	10	65,74±1.9	51,79±1.1	100
	20	55,4±2.0	41,19±1.0	40
	30	38,21±1.4	22,35±0.9	Gözlenmedi
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5	80,49±1.2	58,88±1.0	10
	10	75,97±2.2	56,56±1.3	Gözlenmedi
	20	71,63±2.1	54,6±1.0	Gözlenmedi
	30	65,49±1.2	47,95±1.3	Gözlenmedi
<b>Kontrol**</b>		81,09±1.5	66,56±1.3	100

\* Her bir deneme için 20 kültür kabına ekim yapıldı ve 10 gün sonra kültür kaplarındaki kontaminasyon oluşumları hesaplandı ve ± standart sapmalarıyla beraber verildi. Sonuçlar 3 tekrarın ortalamasıdır.

\*\* Yüzey sterilizasyonu denemelerine tabi tutulmayan tohumlar kontrol grubu olarak değerlendirildi.

### 3.1.1. Çamaşır Suyu ile Sterilizasyon

Bu çalışmada ticari olarak satılan çamaşır suyunun (Domestos) farklı derişimlerde hazırlanan solüsyonlarının, tohumların yüzey sterilizasyonu üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Denenen derişimlerde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan olgun tohumların ilk olarak canlılık testleri yapıldı ve bu derişimlerin canlılık üzerindeki etkileri tespit edilmiştir. Her bir gruba ait sterilize edilmiş tohumlar besi ortamlarına ekilmiş ve 10 gün sonunda oluşan kontaminasyonlar gözlenerek oluşma sıklıkları yüzde olarak belirlenmiştir (Tablo 5). Kontrol grubu olarak ise çalışılan türlere ait, herhangi bir sterilizasyon uygulaması yapılmamış olgun tohumlar kullanılmıştır.

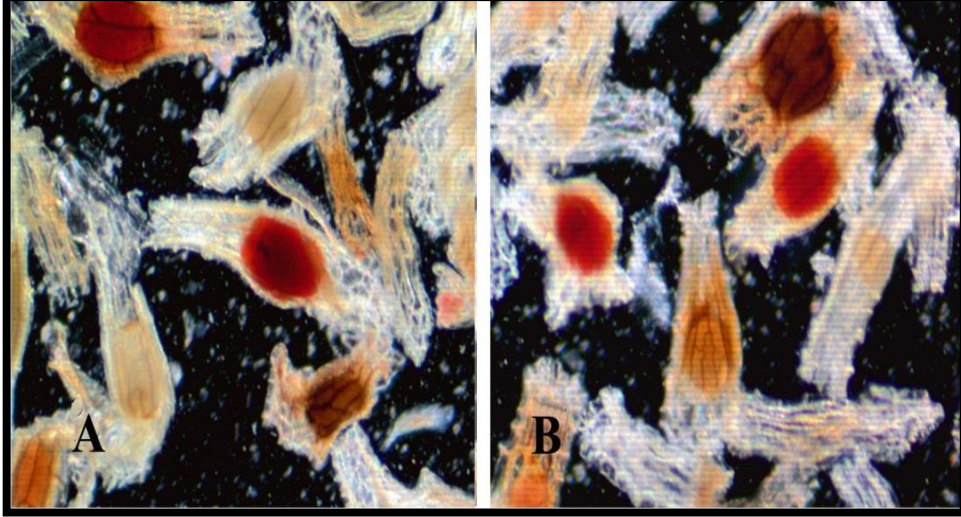
#### 3.1.1.1. *O. sancta* ile Yapılan Sterilizasyon alışmaları

Elde edilen sonuçlara göre, çamaşır suyu ile yapılan yüzey sterilizasyonunda artan derişimlerin tohumların canlılıklarını yitirmelerine neden olduğu belirlenmiştir. Derişimleri %5, %10, %20 ve %30 çamaşır suyu olan deneme gruplarında; canlılık oranlarının sırasıyla %75,8, %65,74, %55,4 ve %38,21 olduğu tespit edilmiştir. Artan amaşır suyu derişiminin, tohumların canlılığında %7 ila %53 oranında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Farklı derişimlerdeki çamaşır suyu ile sterilize edilen tohumların kültüre alınmasıyla, kültür ortamlarındaki kontaminasyon sıklıklarına bakıldığında artan derişimin kontaminasyonu engellediği görülmüştür. Çamaşır suyunun %5 ve %10'luk derişimleri ile yapılan yüzey sterilizasyonunda kültür kaplarının tamamında kontaminasyon tespit edilmiştir. %20'lik derişimde ise kültür kaplarının %40'ında kontaminasyon görülmürken, %30'luk derişimde bu olumsuzluğa rastlanmamıştır. Herhangi bir sterilizasyon işlemi uygulanmayan kontrol grubunda ise canlılık oranının %81,09 olduğu ve kontaminasyon sıklığının %100 olduğu gözlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, kontaminasyon oluşumunun dış etmenlerden ziyade tohum kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır.

#### 3.1.1.2. *S. vomeracea* ile Yapılan Sterilizasyon alışmaları

*Orchis sancta* ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi, artan çamaşır suyu derişiminin tohumların canlılığında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Elde edilen %5, %10, %20

ve %30 derişimlerdeki canlılık oranları sırasıyla %63,14, %51,79, %41,19 ve %22,35 olarak belirlenmiştir. Artan çamaşır suyu derişiminin canlılık oranlarında kontrole göre %6 ila %47 oranlarında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 10. A) *O. sancta*, B) *S. vomeracea* tohumlarının canlılık testi sonrası görünüşleri. Turuncu-kırmızı renkte boyananlar canlı, diğerleri canlılığını kaybetmiş tohumları göstermektedir.

Çamaşır suyunun derişimi ile kontaminasyondaki artış arasındaki ters ilişki bu türde de gözlenmemiştir. Artan derişimlere göre gözlenen kontaminasyon sıklıkları sırasıyla; %100, %100, %40 ve %0 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise canlılık oranının %66,56 ve kontaminasyon sıklığının %100 olduğu gözlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, kontaminasyon oluşumunun dış etmenlerden ziyade tohum kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır.

### 3.1.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile Sterilizasyon

Bu çalışmada, %5, %10, %20, %30 derişimlerinde hazırlanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonlarının, tohumların yüzey sterilizasyonu üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Belirlenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimlerinde yüzey sterilizasyonu yapılan olgun tohumların sterilizasyon sonrasındaki canlılık testleri yapılarak kontrol ile karşılaştırılmıştır. Sterilize edilen tohumlar, besi ortamına ekilerek kültür ortamındaki kontaminasyon sıklıkları yüzde olarak belirlenmiştir.

Kontrol grubu olarak, çalışılan yüzey sterilizasyonu yapılmamış olgun tohumlar kullanılmıştır.

### **3.1.2.1. *O. sancta* ile Yapılan Sterilizasyon Çalışmaları**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile sterilizasyonun araştırıldığı bu çalışmada tohumların canlılık oranlarının artan derişime bağılı olarak azaldığı görülmüştür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimlerinin %5, %10, %20 ve %30 olduğu durumlarda canlılık oranları sırasıyla %80,49, %75,97, %71,63 olarak bulunurken, sterilize edilmeyen kontrol grubunda bu oran %81,09 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre; artan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimleri, canlılık oranının %1 ila 20 arasında azalmasına neden olmuştur. %5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edilen tohumlarda, besi ortamlarına ekildikten sonra, %10 kontaminasyon oluşumu gözlenmiştir. Buna karşın; denenen diğer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimlerinde herhangi bir olumsuzluk gözlenmemiştir.

### **3.1.2.2. *S. vomeracea* ile Yapılan Sterilizasyon Çalışmaları**

Sterilize edilmeyen *S. vomeracea* tohumlarının canlılık oranları %66,56 olarak tespit edilmiştir. En yüksek canlılık oranı %58,88'lik değerle %5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muamelesinde elde edilmiştir. Bu sonucu; %56,56'lık değerle %10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muamelesi, %54,60'lık değerle %20 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muamelesi ve %47,95'lik değerle %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muamelesi ile elde edilen canlılık oranlarının takip ettiği belirlenmiştir. Bu verilere göre, artan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişiminin tohumların canlılığını, kontrole göre ortalama %12 ila %28 oranlarında azalttığı tespit edilmiştir.

Tohumların besi ortamına ekildikten sonraki 10 günlük süreçte, kültür kaplarındaki kontaminasyon oluşumları karşılaştırıldığında, %5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derişimleriyle yapılan yüzey sterilizasyonu denemelerinin, deneme ortamlarının %10'unda kontaminasyona neden olduğu tespit edilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin %10, %20 ve %30'luk derişimlerinde ise herhangi bir kontaminasyona rastlanmamıştır.

## 3.2. Tohumların *İn Vitro* Çimlendirilmesi

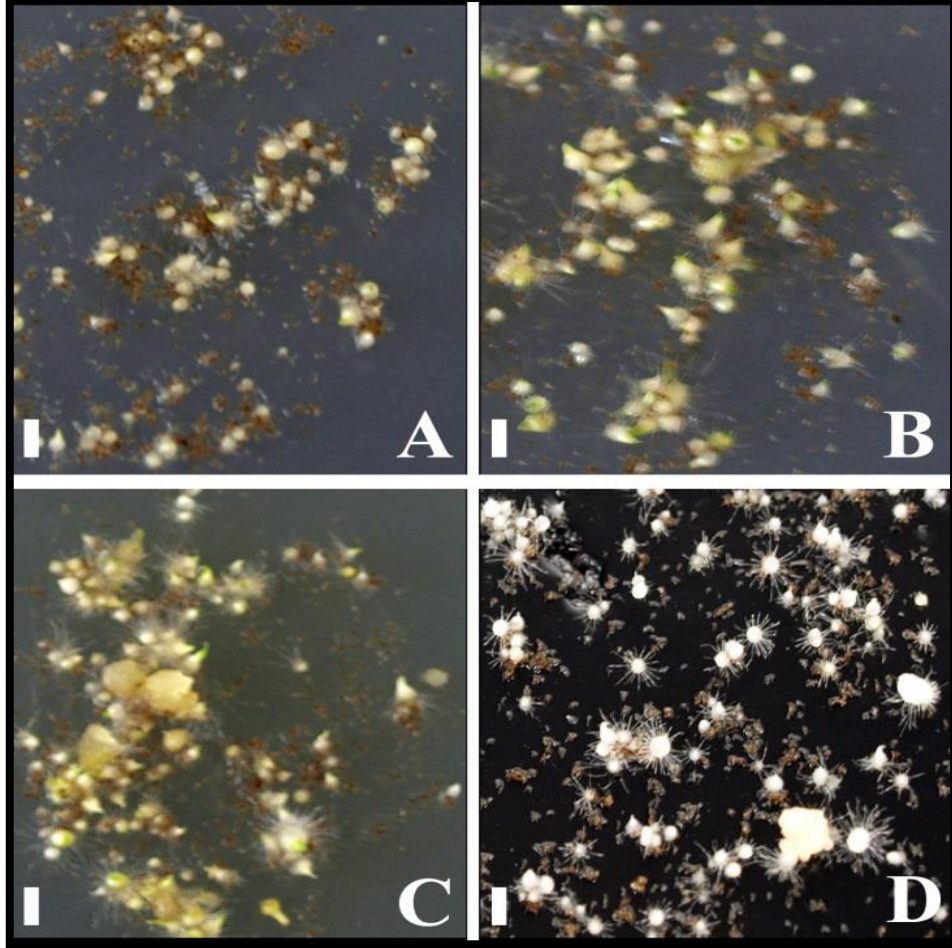
### 3.2.1. Besi Ortamlarının *İn Vitro* Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Farklı içeriklere sahip 4 temel besi ortamına ekilen *O. sancta* ve *S. vomeracea* olgun tohumları, 3 ay boyunca gözlemlenerek, her bir besi ortamındaki çimlenme süreleri, çimlenme yüzdeleri ve protokorm oluşturma yüzdeleri belirlenmiştir. Çimlenme yüzdeleri 60 günlük ve protokorm oluşturma yüzdeleri ise 3 aylık kültür ortamlarından elde edilen sonuçlara göre hesaplanmıştır. Çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdeleri Tablo 6' da verilmiştir. Çimlenme yüzdelerinin belirlenmesinde, türlere ait canlılık oranları göz önünde bulundurulmuş ve yüzde olarak hesaplanmıştır. Tohumlar petriyer üzerine iyice birbirinden ayrılacak şekilde yayılmak suretiyle ekildi ve 2 aylık inkübasyon süresi sonunda kültürlerin fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 11 ve 12). Çekilen fotoğraflar üzerinden, ImageJ uygulaması (ImageJ 1.46r, USA) ile analiz edilerek, tohumlara ait çimlenme oranları hesaplanmıştır.

#### 3.2.1.1. *O. sancta* ile Yapılan Çimlendirme Çalışmaları

Yapılan gözlemlere göre, *O. sancta* tohumlarının, Knudson C ve Lindemann besi ortamlarında ortalama 45 gün, Orchimax aktif kömürsüz besi ortamında 25 gün ve Orchimax aktif kömürlü besi ortamında 15 gün sonunda kök rizoidlerini oluşturup çimlenmeye başladıkları tespit edilmiştir. 2 ay sonunda, *O. sancta* tohumlarının denenen besi ortamlarındaki çimlenme yüzdeleri karşılaştırıldığında, en yüksek çimlenme yüzdesinin Orchimax aktif kömürlü besi ortamında olduğu tespit edilmiştir (%62,46). Buna karşın, en düşük çimlenme yüzdesi, %26,36 ile Knudson C besi ortamında gözlenmiştir. Lindemann besi ortamındaki çimlenme yüzdesi ile Knudson C besi ortamındaki çimlenme yüzdesinin hemen hemen aynı değerlere sahip olduğu belirlenmiştir (%26,87). Orchimax aktif kömürsüz besi ortamında tohumların %39,82'sinin çimlendiği gözlenmiştir. Çimlenen tohum sayısı üzerinden protokorm oluşturma yüzdeleri hesaplanmıştır. Knudson C ve Lindemann besi ortamlarında sırasıyla %51,95 ve %52,55 oranlarında protokorm oluşumu görülmüştür. Orchimax aktif kömürsüz besi ortamında protokorm oluşturma yüzdesi %63,20 olarak belirlenmiştir. En yüksek çimlenme yüzdesinin tespit edildiği Orchimax

aktif kömürlü besi ortamında ise protokorm oluşturma yüzdesinin (%73,42) diğer ortamlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.



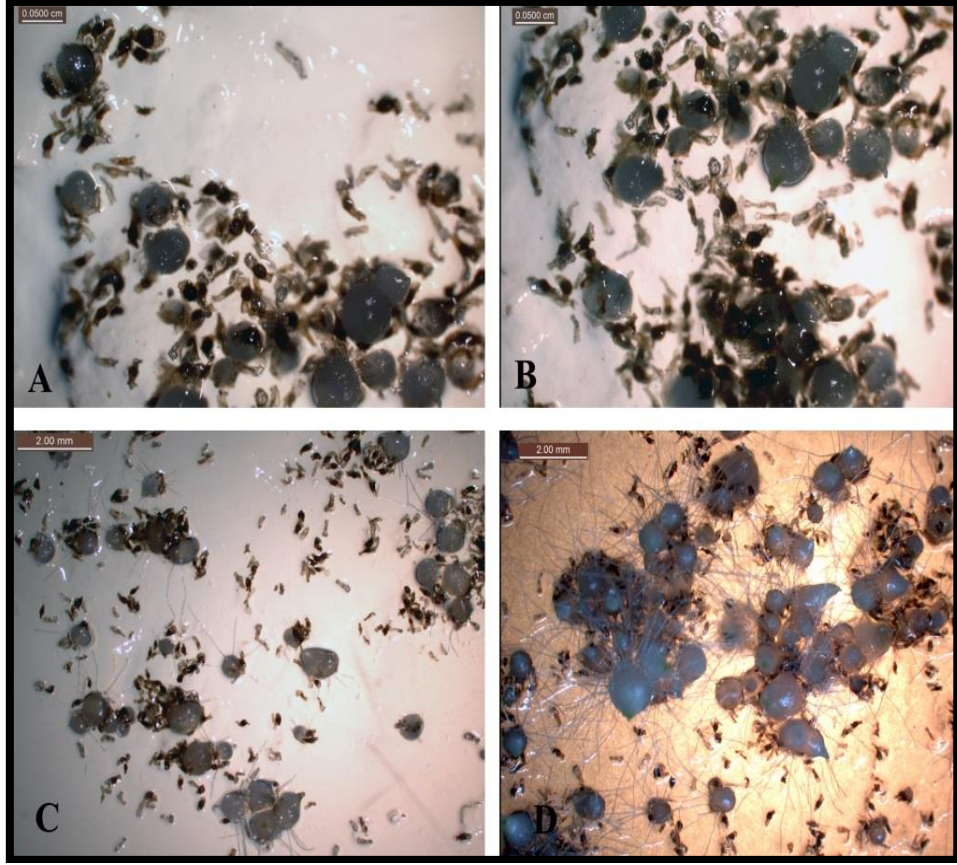
Şekil 11. Farklı besi ortamında çimlenen *O. sancta* tohumlarının stereo mikroskop görüntüleri. A) Knudson C, bar; 0,05 cm B) Lindemann, bar; 0,05 cm C) Orchimax aktif kömürsüz, bar; 2mm D) Orchimax aktif kömürlü, bar; 2 mm.

### 3.2.1.2. *S. vomeracea* ile Yapılan Çimlendirme Çalışmaları

*Serapias vomeracea* tohumlarının çimlendirilmesine dair çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Orchimax aktif kömürlü besi ortamının; çimlenme süresi, çimlenme yüzdesi ve protokorm oluşturma yüzdesi bakımından diğer besi ortamlarına göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu ortamda, *S. vomeracea* tohumlarının çimlenme süresi ortalama 20 gün ve çimlenme yüzdesi %73,74 olarak belirlenirken, protokorm oluşturma yüzdesinin %75,54 olduğu tespit edilmiştir. Orchimax aktif kömürsüz besi ortamında



tohumların ortalama 30 günde çimlendiği, ayrıca çimlenme yüzdesinin % 43,11 ve üç ay sonundaki protokorm oluşturma yüzdesinin ise % 61,22 olduğu belirlenmiştir. Knudson C ortamında çimlenme süresi 60 gün, çimlenme yüzdesi %27,95 ve protokorm oluşturma yüzdesi %52,22 olarak belirlenmiştir. Lindemann besi ortamında ise tohumların çimlenme süresi ortalama 60 gün, çimlenme yüzdesi %23,1 ve protokorm oluşturma yüzdesi %53,7 olarak belirlenmiştir.



Şekil 12. Farklı besi ortamında çimlenen *S. vomeracea* tohumlarının stereo mikroskop görüntüleri. A) Knudson C, bar; 0,05cm B) Lindemann, bar; 0,05cm C) Orchimax aktif kömürsüz, bar; 2mm D) Orchimax aktif kömürlü, bar; 2mm

Tablo 6. *O. sancta* ve *S. vomeracea* tohumlarının farklı besi ortamlarındaki çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdeleri

	%	KCM	LM	OM	OM+
<i>O. sancta</i>	Çimlenme *	26,36±1,3c	26,87±1.4c	39,82±1.5b	62,46±1.0a
	Protokorm oluşumu *	51,48±0,8d	52,55±0.8c	63,2±0.9b	73,42±1.4a
	Çimlenme süresi**	45	45	25	15
<i>S. vomeracea</i>	Çimlenme	27,95±2,4d	23,11±1.9c	43,11±1.5b	73,74±1.6a
	Protokorm oluşumu	52,22±2,9c	53,70±3.1c	61,22±1.0b	75,54±1.4a
	Çimlenme süresi	60	60	30	20

\* Çimlenme ve protokorm oluşturma oranları % olarak hesaplandı ve ± standart sapmaları ile birlikte verildi. Aynı satırdaki benzer harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ( $P<0,05$ ) farklı değildiler

\*\* Çimlenme süresi kök rizoidlerinin oluşmaya başladığı ve gözle görülür hale geldiği gün olarak hesaplandı.

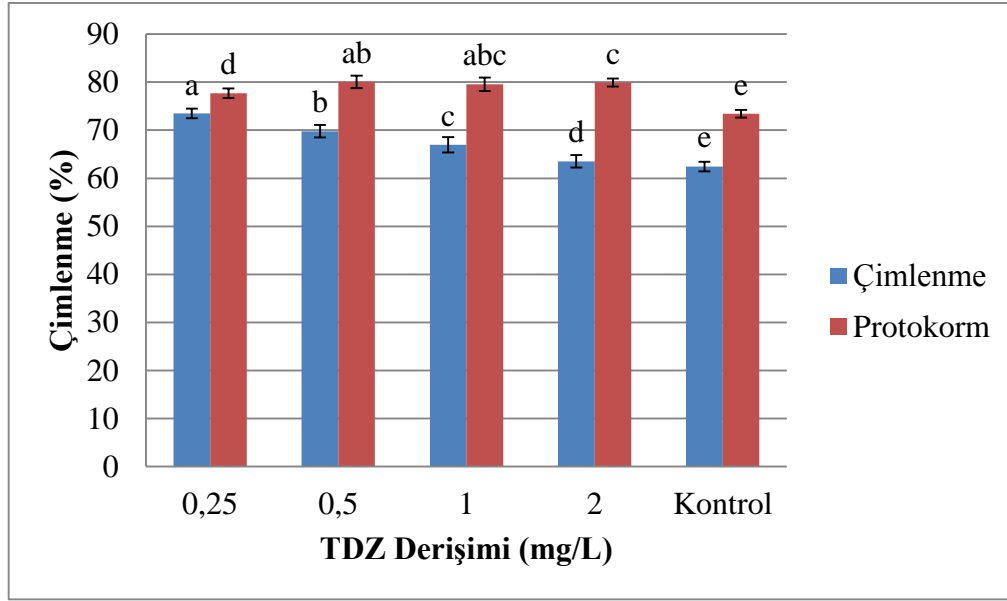
### 3.2.2. Çeşitli Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *In Vitro* Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkileri

Oksin ve sitokinin gruplarına ait çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin ve farklı derişimlerinin Orchimax aktif kömürlü besi ortamında hem çimlenme hem de protokorm oluşturma yüzdeleri hesaplanmış ve Şekil 13-28'de verilmiştir. Çimlenme yüzdeleri 2 aylık, protokorm oluşturma yüzdeleri ise 3 aylık kültürlerden hesaplanmıştır. *Orchis sancta*'da en yüksek çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdeleri %81,15 ve %83,14'lük değerlerle 2,0 mg/L ZEA derişiminde belirlenirken, *S. vomeracea*'de %84,03'lük çimlenme yüzdesi 2,0 mg/L 6-BA ve %89,91 protokorm oluşturma yüzdesi 2,0 mg/L ZEA derişimlerinde belirlenmiştir.

#### 3.2.2.1. *O. sancta* ile Yapılan Çimlendirme Çalışmaları

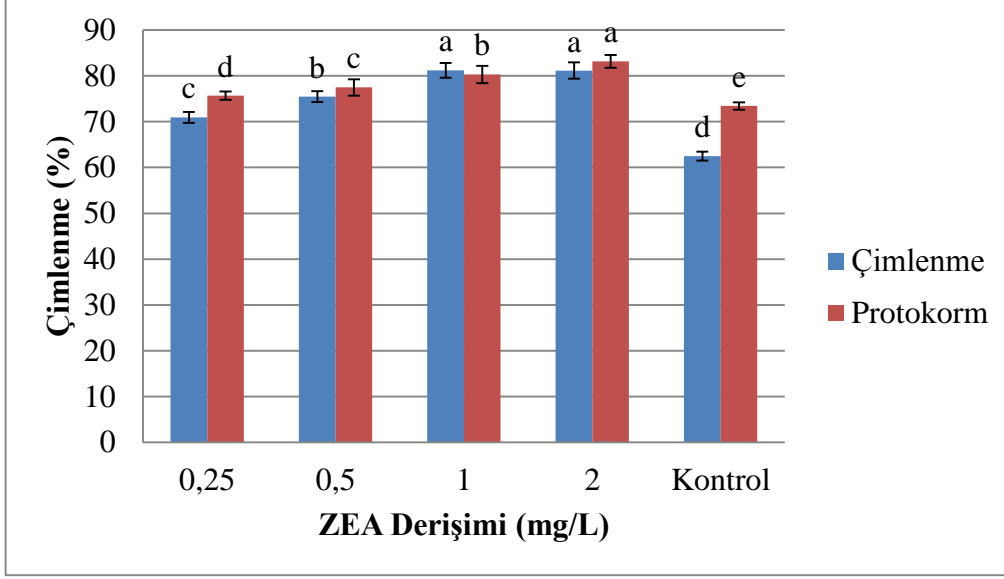
TDZ'nin farklı derişimleriyle desteklenen Orchimax aktif kömürlü besi ortamından elde edilen çimlenme sonuçlarına göre, artan TDZ derişimi ile çimlenme yüzdesi arasında negatif korelasyon ( $r^2 = -0,943$ ,  $P<0,01$ ) olduğu belirlenmiştir (Şekil 13). En yüksek çimlenme yüzdesi %73,46 ile 0,25 mg/L, en düşük ise %63,53 ile 2,0 mg/L derişimde bulunmuştur. TDZ'nin 0,5 mg/L ve 1,0 mL derişimlerinde elde edilen çimlenme yüzdeleri

ise sırasıyla %69,78 ve %66,97'dir. Diğer taraftan protokorm oluşturma yüzdeleri Şekil 13'de verilmiştir. Artan derişim ile protokorm oluşturma yüzdeleri arasında pozitif ya da negatif ilişki olmadığı saptanmıştır. En yüksek protokorm oluşturma yüzdesi 0,5 mg/L TDZ içeren ortamda %80,07 olarak hesaplanırken, en düşük yüzde %77,72 ile 0,25 mg/L TDZ içeren ortamda gözlenmiştir. Çimlenen tohumların 1,0 mg/L TDZ derişiminde %79,58'inin ve 2,0 mg/L derişiminde ise %79,92'sinin protokorma dönüştüğü belirlenmiştir.



Şekil 13. Farklı TDZ derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *O. sancta* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları

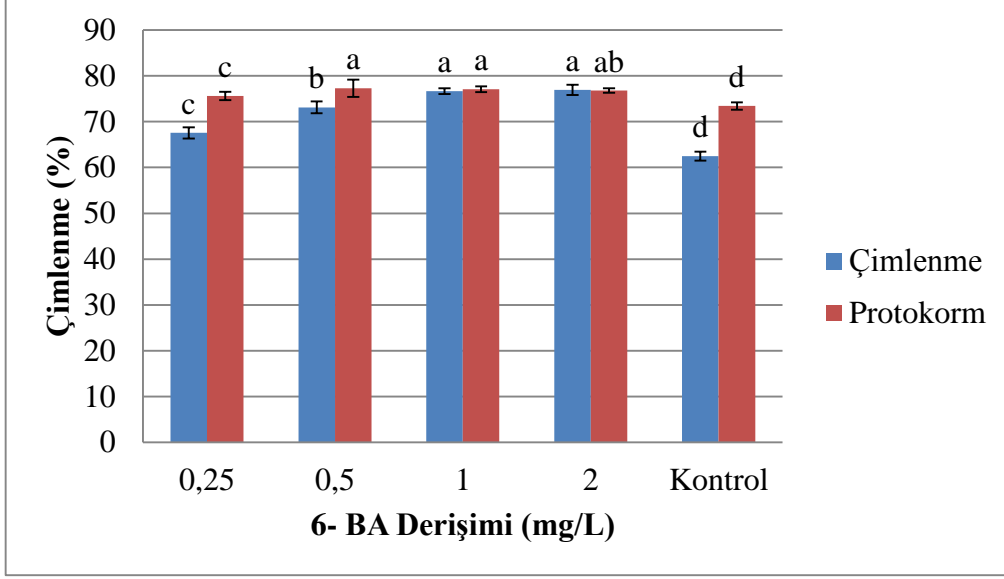
ZEA'nın artan derişimi ile çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdeleri arasında pozitif korelasyon belirlenmiştir ( $r^2= 0,860$  ve  $r^2= 0,874$ ) (Şekil 14). Hem çimlenme (%81,15) hem de protokorm oluşturma (%83,14) yüzdeleri 2,0 mg/L derişiminde maksimuma ulaşmıştır. ZEA'nın 0,25 mg/L derişiminde hesaplanan çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdeleri sırasıyla %70,93 ve %75,65 değerlerinde, 0,5 mg/L ZEA içeren ortamda %75,47 ve %77,46 ve 1,0 mg/L ZEA içeren ortamda ise %81,18 ve %80,28 olduğu belirlenmiştir.



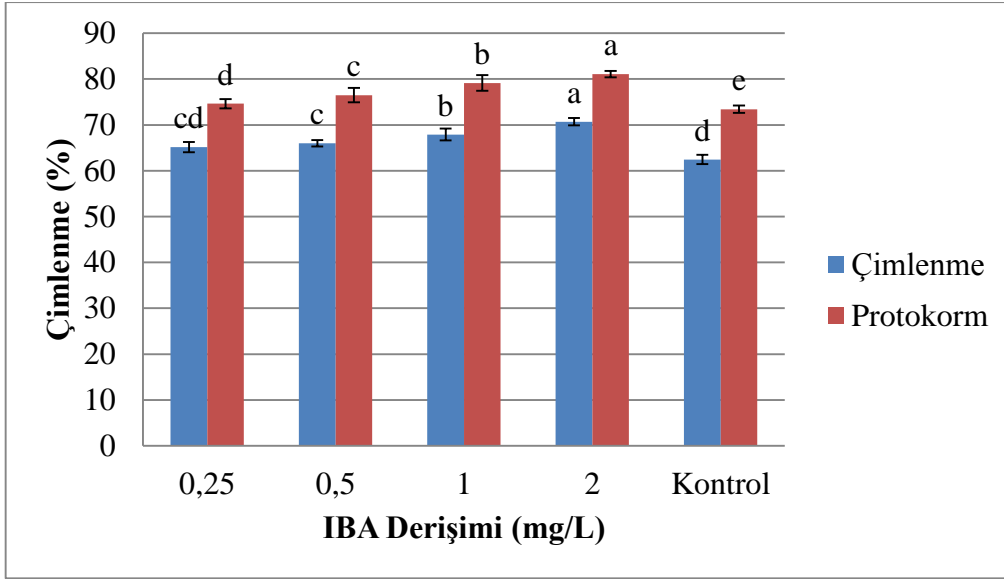
Şekil 14. Farklı ZEA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *O. sancta* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları

6-BA'nın farklı derişimlerinin denendiği çalışmalarda, artan derişim ile çimlenme arasında pozitif korelasyon ( $r^2= 0,864$ ), protokorm oluşma yüzdesinin ise derişim artışıyla ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 15). 6-BA uygulamalarında çimlenme yüzdeleri derişime bağlı olarak %67,54'den %76,91'e ulaşırken, protokorm oluşturma değerleri derişimden bağımsız olarak yaklaşık %77'dir.

Artan IBA derişimi ile çimlenme ve protokorm oluşumu arasında pozitif korelasyon ( $r^2= 0,862$  ve  $r^2= 0,884$ ) saptanmıştır (Şekil 16). 0,25 mg/L ile 2,0 mg/L'lik IBA derişimleri arasındaki çimlenme yüzdeleri sırasıyla %65,15 ile %70,69 aralığında belirlenmiştir. Protokorm oluşturma yüzdeleri ise sırasıyla %74,62 ile %81,06 arasında saptanmıştır.

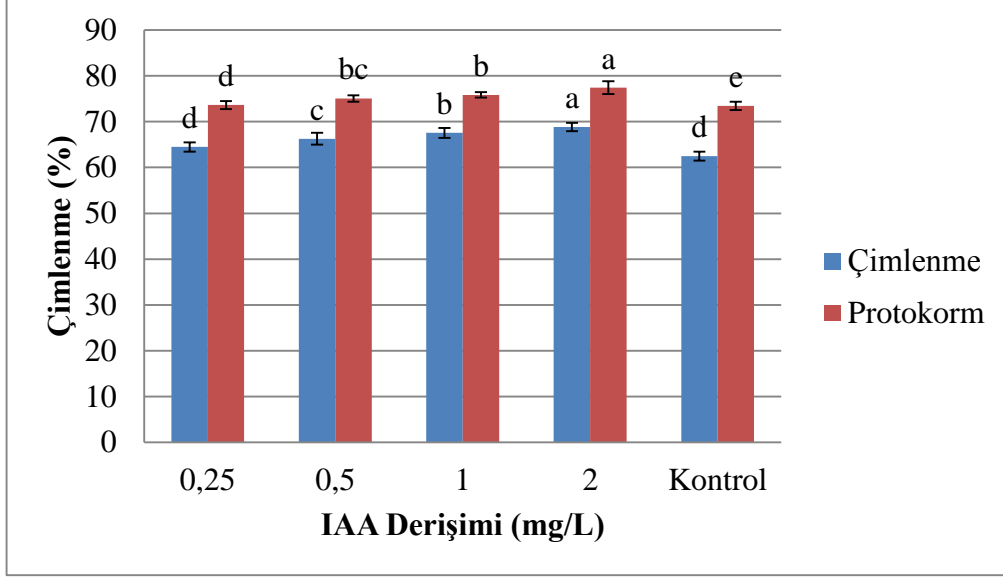


Şekil 15. Farklı 6-BA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *O. sancta* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları



Şekil 16. Farklı IBA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *O. sancta* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları

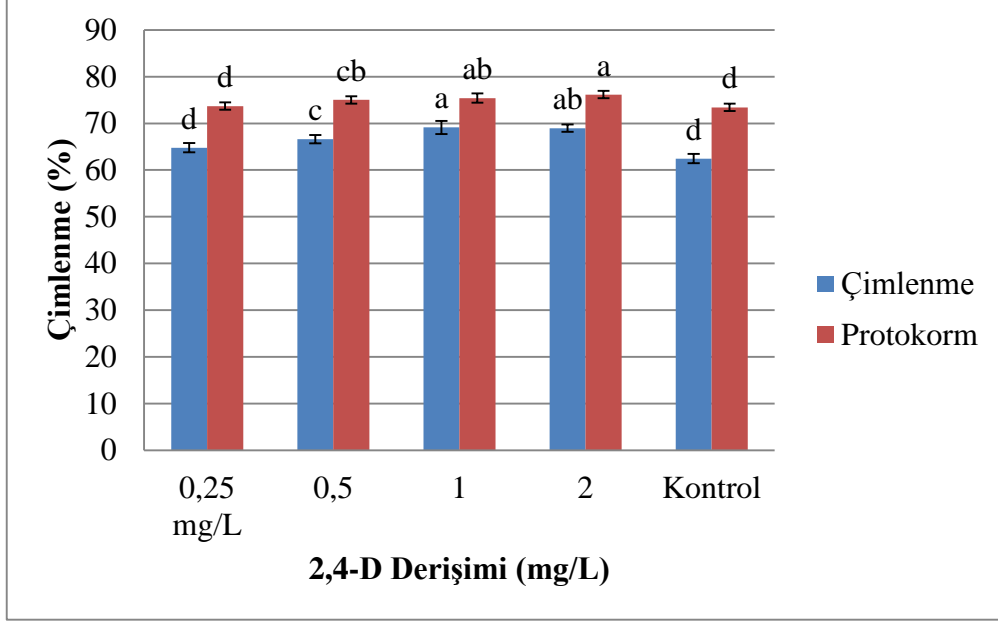
IBA derişimlerinin etkilerine benzer olarak IAA'nın artan derişimiyle çimlenme ve protokorm oluşumu arasında pozitif korelasyon ( $r^2= 0,829$  ve  $r^2= 0,835$ ) belirlenmiştir (Şekil 17). 0,25 mg/L ile 2,0 mg/L arasındaki çimlenme yüzdeleri %64,48-68,80, protokorm oluşturma yüzdeleri ise %73,61 - 77,43 aralığında hesaplanmıştır.



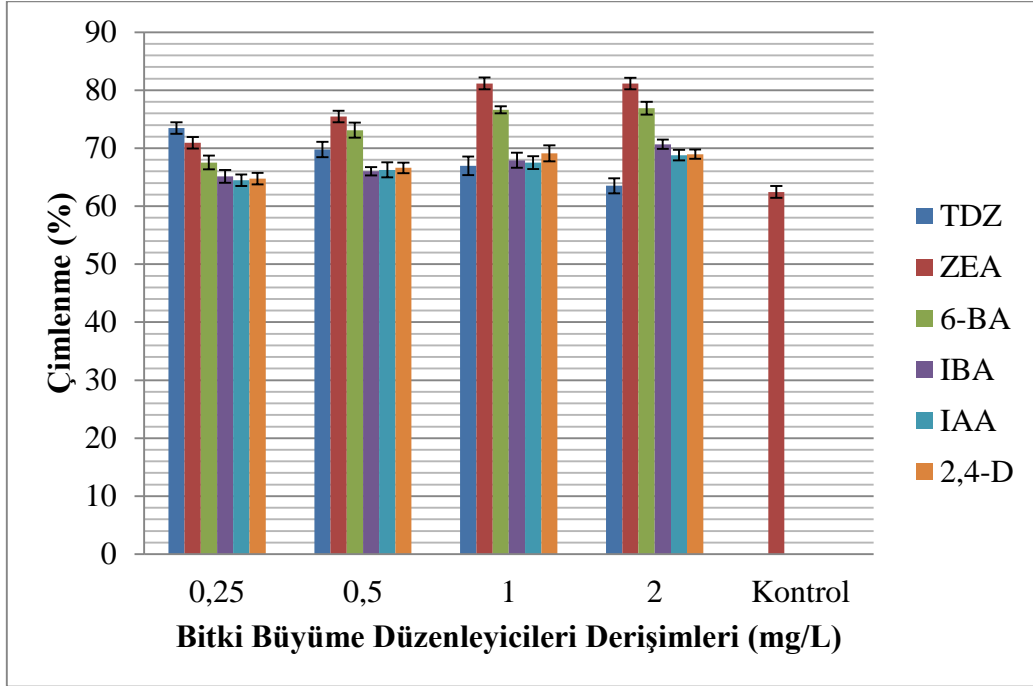
Şekil 17. Farklı IAA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *O. sancta* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları

Artan 2,4-D derişiminin çimlenme ve protokorm oluşumu üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışma sonuçları Şekil 18’de verilmiştir. Artan 2,4-D derişimi ile çimlenme ( $r^2= 0,835$ ) ve protokorm ( $r^2= 0,703$ ) oluşumu arasında pozitif yönde ilişki tespit edilmiştir. 0,25-2,0 mg/L 2,4-D derişim aralığında çimlenme %64,77-69,12 aralığında iken protokorm oluşturma yüzdeleri %73,70-76,17 aralığındadır. 2,4-D derişiminin en yüksek olduğu koşullarda hem çimlenme hem de protokorm oluşumunun maksimum düzeye ulaştığı gözlemlenmiştir.

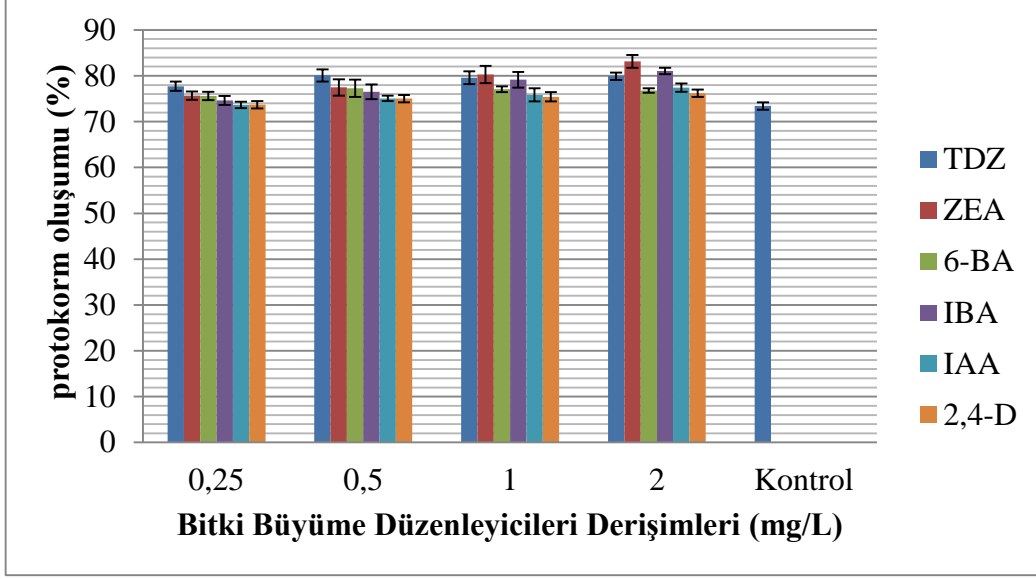
Genel olarak değerlendirildiğinde, ZEA’nın 1,0 ve 2,0 mg/L derişimleriyle desteklenen ortamlardaki çimlenme oranlarının, 2,0 mg/L ZEA içeren ortamlarda ise protokorm oluşumunun en yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 19 ve 20).



Şekil 18. Farklı 2,4-D derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *O. sancta* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları



Şekil 19. Farklı Bitki büyüme düzenleyicilerinin *O. sancta* tohumlarının çimlenme yüzdesine etkilerinin karşılaştırılması



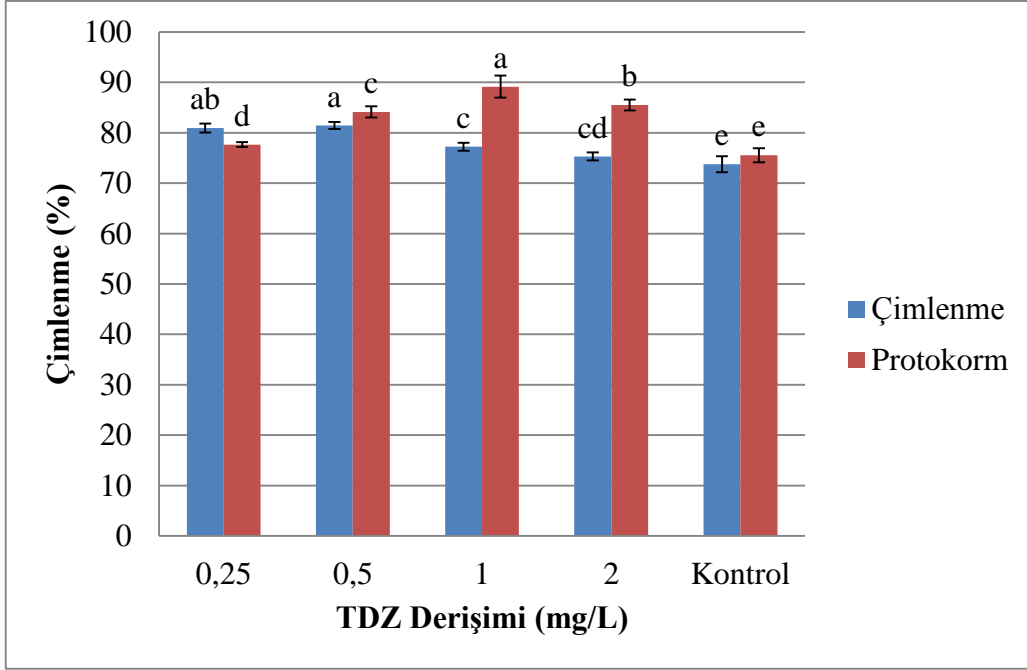
Şekil 20. Farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin *O. sancta* türünün protokorm oluşumuna etkilerinin karşılaştırılması

### 3.2.2.2. *S. vomeracea* ile Yapılan Çimlendirme Çalışmaları

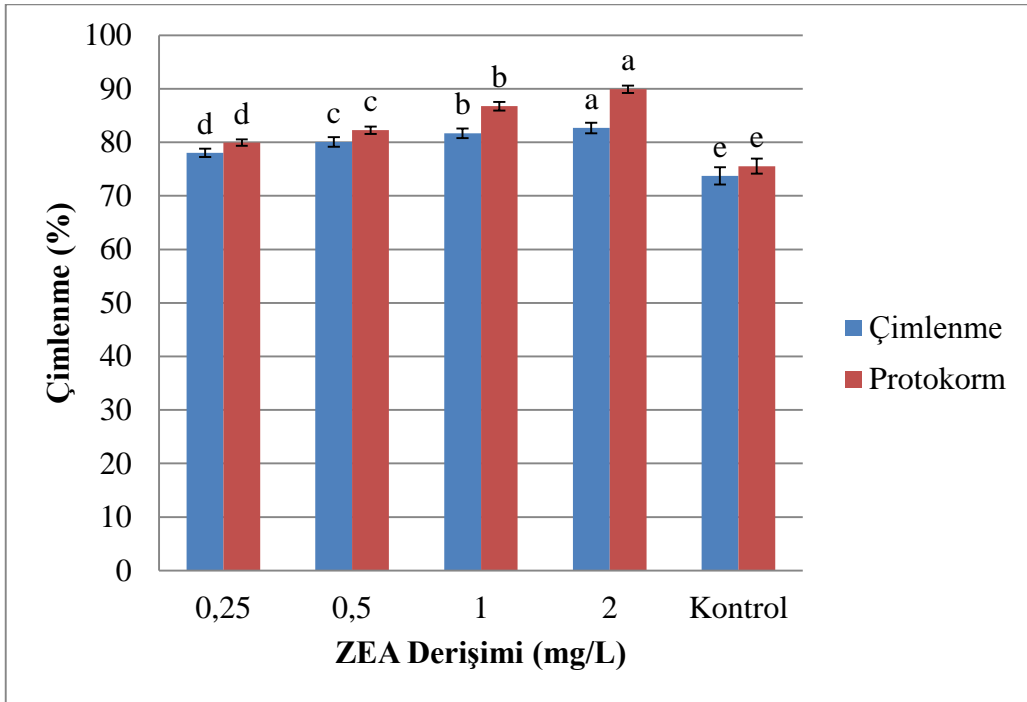
Artan TDZ derişimleri ve çimlenme yüzdeleri arasında istatistiksel açıdan negatif ilişki ( $r^2 = -0,832$ ) görülürken, protokorm oluşturma yüzdelerinde ise pozitif bir korelasyon ( $r^2 = 0,712$ ) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 21). TDZ'nin düşük derişimlerinden (özellikle 0,25 mg/L ve 0,5 mg/L derişimlerinin), kontrole ve diğer derişimlere göre daha yüksek çimlenme yüzdesi elde edilmiştir.

Yapılan denemeler sonunda, ZEA'nın yüksek derişimlerinin çimlenmeyi ve protokorm oluşumunu teşvik ettiği ( $r^2 = 0,876$  ve  $r^2 = 0,967$ ) görülmüştür (Şekil 22).



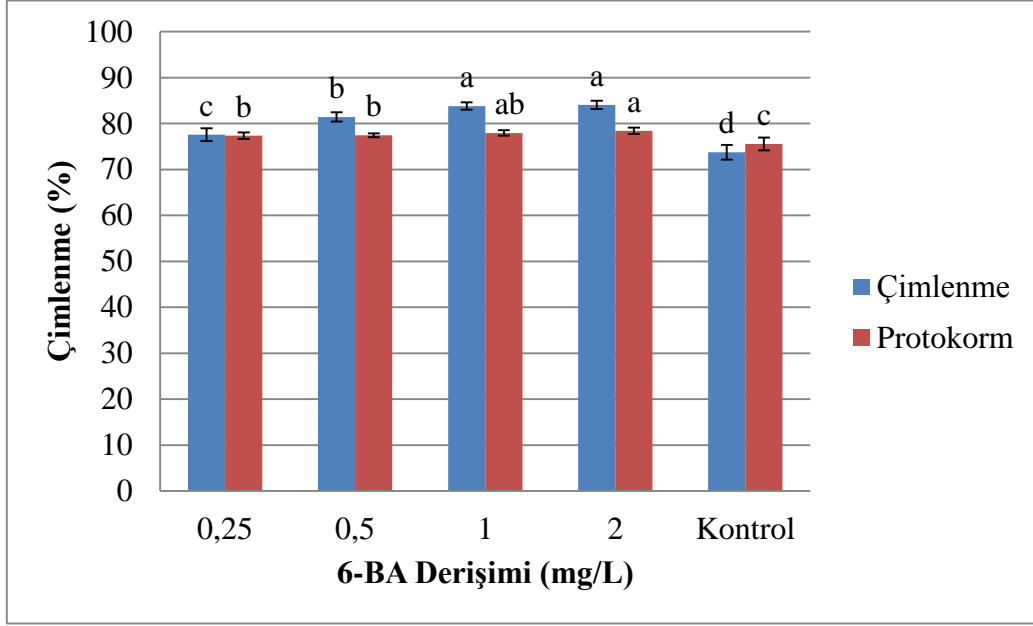


Şekil 21. Farklı TDZ derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *S. vomeracea* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları



Şekil 22. Farklı ZEA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *S. vomeracea* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları

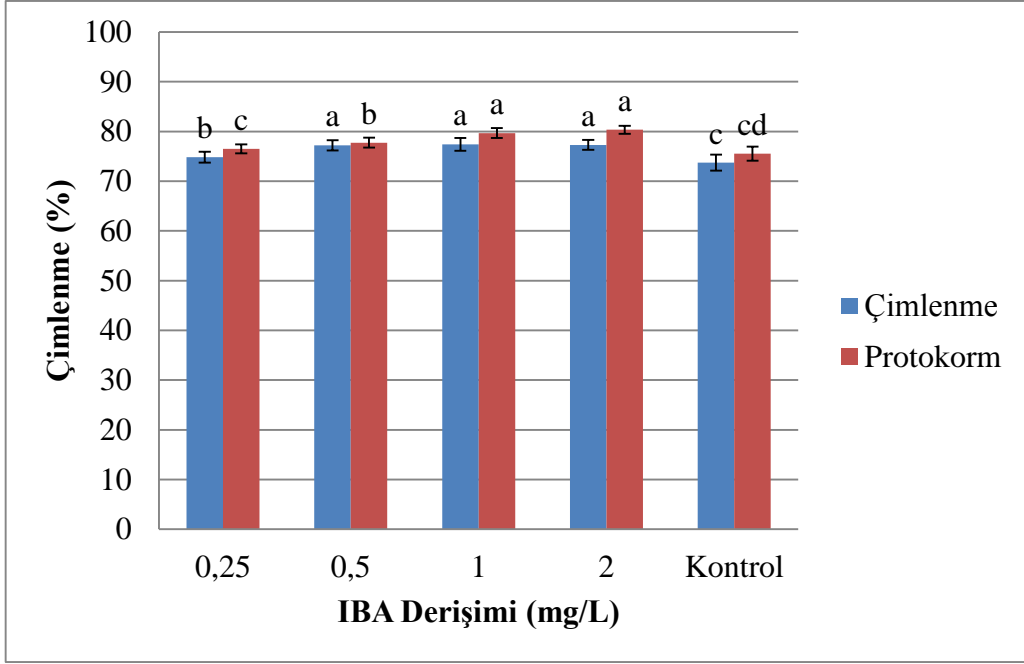
6-BA'nın farklı derişimlerinin uygulandığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar Şekil 23'de verilmiştir. Buna göre artan 6-BA derişimi ile çimlenme'nin önemli derecede ilişkili olduğu ( $r^2= 0,885$ ) ve sonuç olarak artışa neden olduğu belirlenmiştir. Protokorm oluşumunda da artan derişimin yükselmeye neden olduğu fakat önemli derecede etkilemediği tespit edilmiştir ( $r^2= 0,529$ ).



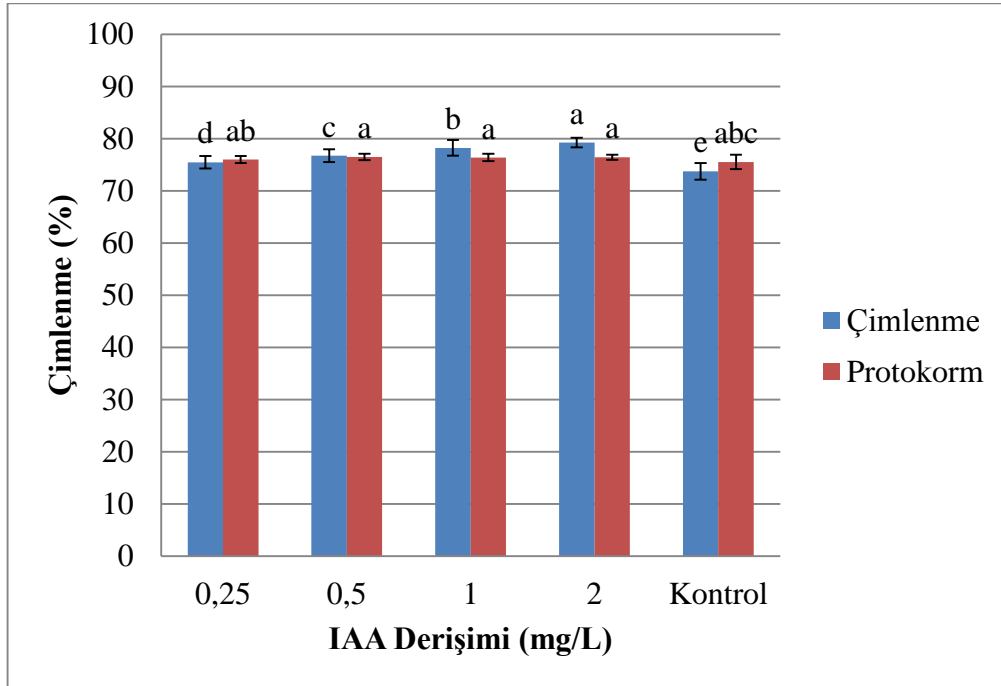
Şekil 23. Farklı 6-BA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *S. vomeracea* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları

IBA'nın artan derişimlerini içeren besi ortamlarındaki çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdelerinin incelendiği çalışma sonuçları Şekil 24'te verilmiştir. Artan derişime bağlı olarak, çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdeleri arasında pozitif ( $r^2= 0,747$  ve  $r^2= 0,872$ ) korelasyon tespit edilmiştir. Çimlenme yüzdeleri %73,84 - 77,4 arasında iken protokorm oluşturma yüzdeleri %76,05 - 80,34 arasında hesaplanmıştır.

Artan IAA derişimlerinin denendiği çalışmalardan elde edilen sonuçlar Şekil 25'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, IAA derişimindeki artışın çimlenmeyi artırdığı ( $r^2= 0,782$ ), protokorm oluşturma yüzdesine ise herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

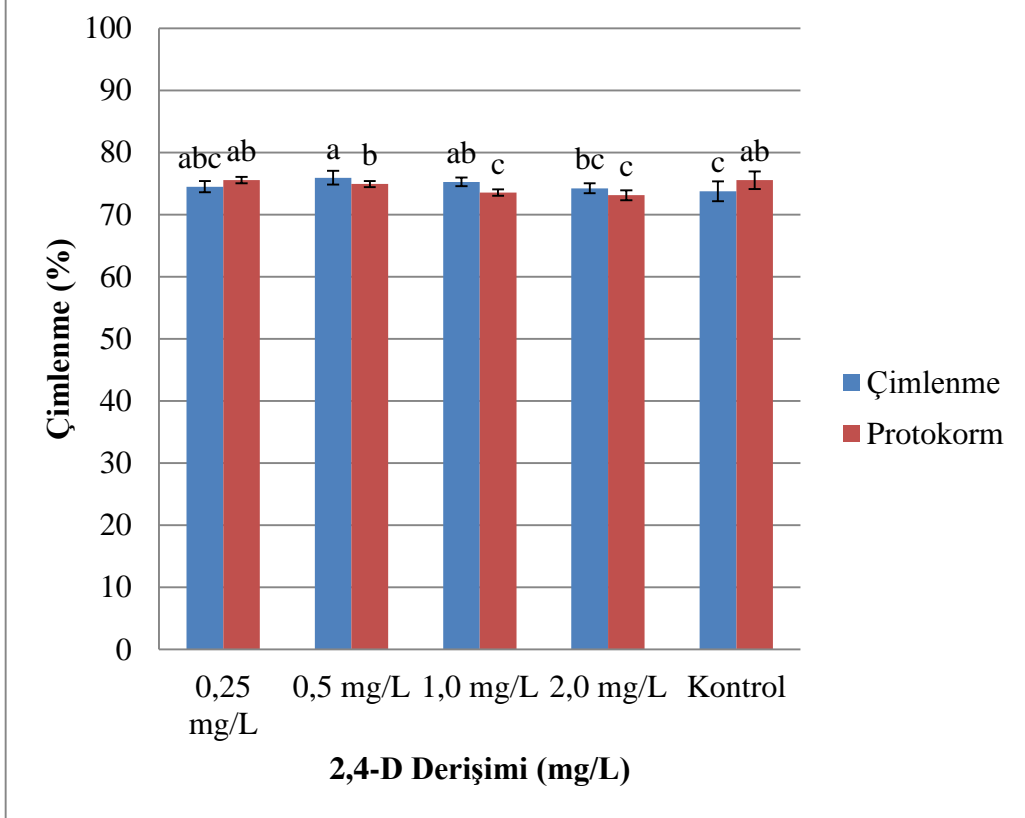


Şekil 24. Farklı IBA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *S. vomeracea* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları



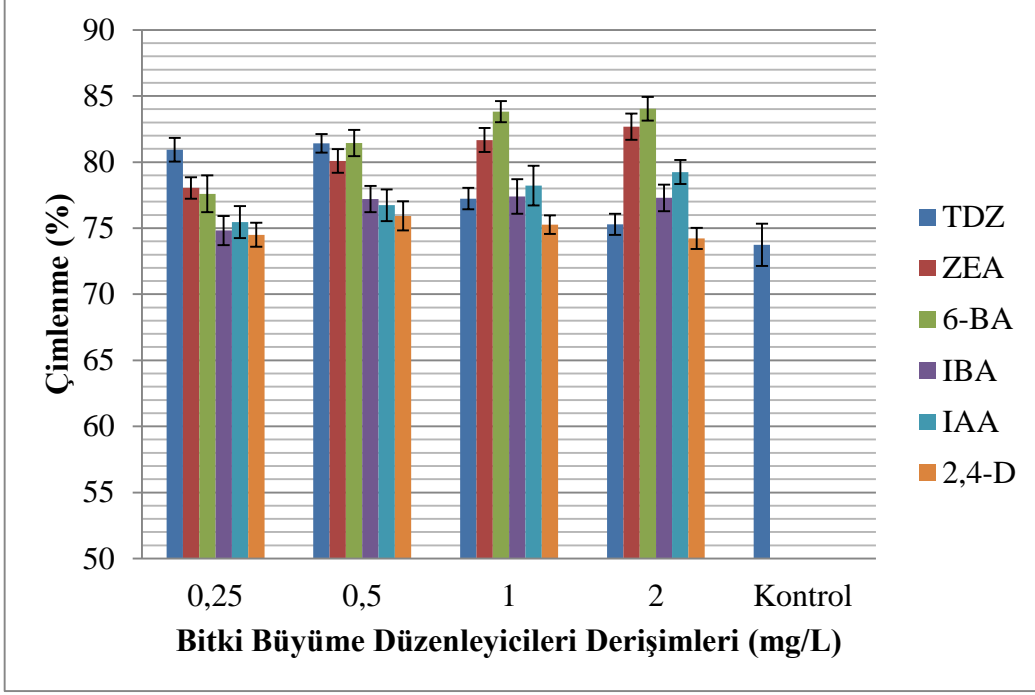
Şekil 25. Farklı IAA derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *S. vomeracea* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları

Çimlenme ve protokorm oluşumu üzerine, 2,4-D'nin, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L ve 2,0 mg/L derişimlerinin etkilerinin araştırıldığı çalışmalara ait sonuçlar Şekil 26'da verilmiştir. Şekilde sunulan verilere göre derişim artışının protokorm oluşturma yüzdesini azaltırken ( $r^2 = -0,860$ ) çimlenme yüzdesini değiştirmediği belirlenmiştir.

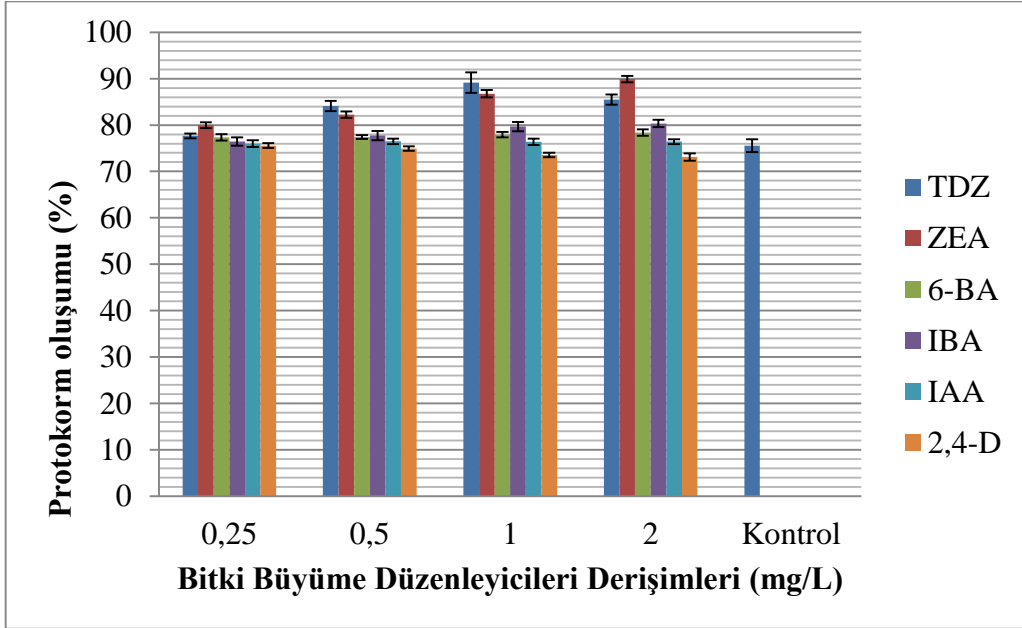


Şekil 26. Farklı 2,4-D derişimleriyle desteklenen +OM ortamındaki *S. vomeracea* tohumlarına ait çimlenme ve protokorm oluşumları

Genel olarak değerlendirme yapıldığında, 6-BA'nın 1,0 ve 2,0 mg/L derişimleriyle desteklenen ortamlardaki çimlenme oranlarının en yüksek değerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 27). Ayrıca, en yüksek protokorm oluşumu 2,0 mg/L ZEA içeren ortamlarda tespit edilmiştir (Şekil 28).



Şekil 27. Farklı Bitki büyüme düzenleyicilerinin *S. vomeracea* tohumlarının çimlenme yüzdelere etkilerinin karşılaştırılması



Şekil 28. Farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin *S. vomeracea* türünün protokorm oluşturma yüzdelere etkilerinin karşılaştırılması

### 3.3. Sitokininlerin Sürgün Oluşumu ve Uzaması Üzerine Etkileri

Çalışmanın bu aşamasında, 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L derişimlerindeki zeatin (ZEA), kinetin (KİN), 2- izopentiladenin (2-iP) ve 6- benziladenin (6-BA) sitokinin sitokinilerle ve sitokinin benzeri kimyasal olan thidiazuron (TDZ) ile desteklenen Orchimax aktif kömürlü besi ortamı kullanılmıştır. Bu kimyasallara ait farklı derişimlerin 2 aylık süre boyunca sürgün oluşumu ve uzaması üzerindeki etkilerine izlenmiştir. Sitokininlerin sürgün ve kök oluşumuna etkileri *O. sancta* için Tablo 7 ve Şekil 30'da, *S. vomeracea* için Tablo 8 ve Şekil 32'de verilmiştir. Ayrıca, 3 ay sonundaki kök sayıları ve uzunlukları ve 6 ay sonunda tuber oluşumunun söz konusu olup olmadığı belirlenmiştir. Üç türün tohumlarının çimlendirildiği çalışmalardan elde edilen protokormlar bu çalışma için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

#### 3.3.1. *O. sancta* ile Yapılan Sürgün Oluşturma Çalışmaları

*Orchis sancta* ile yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre (Tablo 7), denenen tüm sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyicileri kontrole göre olumlu etki göstermiştir. Yapılan analizler sonucunda, fidelerin boylarının uzamasında en etkili bitki büyüme düzenleyicisinin TDZ olduğu belirlenirken, en zayıf etkiye sahip olanların ise 2-iP ve KİN olduğu, ayrıca 6-BA'nın kısmen 2-iP'ye ve KİN'e yakın etkiye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 29). Sonuçlar, ZEA'nın TDZ'den sonra en etkili bitki büyüme düzenleyicisi olduğunu göstermiştir (Tablo 7). Denenen 0,25 mg/L TDZ derişiminde ortalama 52,56 mm ile en yüksek uzama miktarı elde edilmiştir. En düşük uzama miktarı ise ortalama 24,78 mm uzama miktarı ile 0,25 mg/L 2-iP içeren ortamlarda ve 24,81 mm uzama miktarı ile 2,0 mg/L KİN ihtiva eden ortamlarda tespit edilmiştir. TDZ'nin düşük derişimlerde fidelerin boylarının uzamasında daha etkili olduğu, buna karşın, TDZ'nin derişimi arttıkça uzama miktarının azaldığı gözlenmiştir. Farklı derişimlerdeki ZEA ile desteklenen ortamlarda derişimin artırılmasının boy uzamasına olumlu etki yaptığı belirlenmiştir. Aynı şekilde, 6-BA ve 2-iP ile desteklenen ortamlarda da derişimi arttırılan bitki büyüme düzenleyicilerinin, boy uzunluğunun da artmasına neden olduğu gözlenmiştir. KİN ile desteklenen ortamlarda ise 0,5 mg/L derişiminde en uzun fide boyu elde edilmiştir. Bununla birlikte, artan derişimlerde ise boy uzunluğunun azaldığı belirlenmiştir (Şekil 30).

Farklı derişimlerde uygulanan sitokininlerin kök oluşumuna etkilerini gösterir veriler yine Tablo 7’de verilmiştir. Bu verilere göre kök uzaması üzerine denenen tüm bitki büyüme düzenleyicilerinin olumlu etkiye sahip olduğu söylenebilir. Genel olarak değerlendirildiğinde; 2-iP ile desteklenen ortamda gelişen fidelerin kök boylarının diğerlerine göre daha kısa, ZEA ve TDZ ile desteklenen ortamlarda ise daha uzun olduğu belirlenmiştir. Kök uzaması üzerine en olumlu etkiye sahip olan bitki büyüme düzenleyicisinin 0,25 mg/L derişimli ZEA olduğu ve kök uzunluğunun 28,86 mm’ye ulaştığı belirlenmiştir. En kısa kök uzunluğu ise 9,56 mm ile 0,25 mg/L 2-iP içeren ortamdan elde edilmiştir. ZEA ve TDZ ile desteklenen ortamda gelişen bitkilerin kök uzunluklarının, derişimin artmasıyla azaldığı; 6-BA ve 2-iP ile desteklenen ortamda, derişimin artmasıyla doğru orantılı olarak arttığı ve KİN ile desteklenen ortamda ise 0,5 mg/L’lik derişime kadar arttığı ve daha sonra artan derişimle azaldığı tespit edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin düşük derişimlerde kök oluşumu üzerine olumlu etki yaptığı, ancak yüksek derişimlerin kök sayısında azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. En yüksek kök sayısı ortalama 4,2 ile 0,25 mg/L 2-iP’den en düşük kök sayısı ise ortalama 2,0 adet ile 2,0 mg/L TDZ ihtiva eden ortamda bulunmuştur. 2,0 mg/L TDZ’li ortamdan elde edilen kök sayısı kontrol ile aynıdır.

Tablo 7’de verilen bir başka parametre de yaprak oluşumudur. Sitokininlerin etkileri karşılaştırıldığında, KİN ile desteklenen ortamda fidelerin ortalama yaprak sayılarının diğer ortamlarda gelişen fidelerinkine ve kontrole göre daha fazla olduğu belirlendi. TDZ içeren besi ortamlarında üretilen fidelerin yaprak sayıları kontrol grubuyla aynıdır.

Kültür ortamında 6 ay inkübe edilen *O. sancta* fidelerinin tuber oluşturma eğilimleri araştırıldı ve elde edilen sonuçlardan her bir ortamdaki tuber oluşum yüzdeleri Tablo 7’de verilmiştir. Tuber oluşturma yüzdesi bakımından ZEA’nın diğer bitki büyüme düzenleyicilerine göre daha üstün olduğu görülmüştür.



Şekil 29. *O. sancta* fidelerinin farklı bitki büyüme düzenleyicileri (0,25 mg/L derişiminde) varlığındaki görünümleri. Kültür ortamında yetiştirilen 75 günlük fidelere ait resimler. Bar: 1 cm.



Tablo 7. Sitokininlerin *O. sancta*'da sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri

BBD	Derişim (mg/L)	UM (mm) <sup>1</sup>	KU (mm) <sup>2</sup>	KS <sup>3</sup>	YS <sup>4</sup>	TO <sup>5</sup>	GM* (%)
TDZ	0,25	53,24±1,8 a	24,01±0,6b	2,8 defg	2,93abc	40,5	25,2±0,4
	0,5	50,63±0,9b	22,28±0,9c	2,8 defg	2,85bc	28,7	19,0±0,4
	1,0	44,81± 4,2c	17,95±0,6e	2,1 hı	2,78c	28,5	14,8±0,4
	2,0	44,03± 3,9c	12,75±0,6g	2,0 ı	278c	27,9	15,7±0,6
ZEA	0,25	30,88±1,8gh	28,86±0,7a	3,7 b	3,20abc	0	0±0,0
	0,5	35,52± 0,7f	23,65±0,9b	3,3 bcd	3,20abc	63,1	20,0±0,5
	1,0	39,86 ±2e	19,29±1,5d	3,2 cde	3,30abc	66,9	22,8±0,7
	2,0	42,75± 3,9d	17,21±0,8e	2,9 def	3,30abc	67,5	28,0±1,7
KIN	0,25	30,83±1,2gh	10,05±0,4jk	3,5 bc	3,46a	36,1	22,6±1,3
	0,5	32,24± 0,9g	11,55±0,8hı	3,5 bc	3,53a	36,0	26,2±1,1
	1,0	27,31± 0,8ij	10,20±0,8jk	3,0 def	3,53a	40,5	20,3±0,7
	2,0	24,81±1,8k	9,62±0,7k	2,3 ghı	3,40ab	27,5	14,0±0,7
6-BA	0,25	26,57±2jk	12,63±0,8gh	3,0 def	3,10abc	0	0±0,0
	0,5	29,15±2hı	13,41±0,4 g	2,8 defg	3,10abc	0	0±0,0
	1,0	30,74±2,4gh	13,86±0,5 g	2,7 efg	3,20abc	0	0±0,0
	2,0	31,31±2,1gh	15,31±0,9f	2,5fgh	3,10abc	50,2	16,7±0,9
2-iP	0,25	24,78± 2,4k	9,56±0,7k	4,2 a	3,20abc	40,5	14,1±0,4
	0,5	26,96±1,6ı	9,95±0,4jk	3,7 b	3,20abc	35,1	15,6±0,7
	1,0	28,00±1,0ij	10,83±0,3ıjk	2,8 defg	3,20abc	20,4	17,0±0,3
	2,0	31,20±1,2gh	11,13±1,1ij	2,2 hı	3,30abc	19,3	21,3±0,9
<b>Kontrol</b>		20,44±0,8l	8,31±0,5 l	2,0 ı	2,70c	0	0±0,0

<sup>1</sup> UM: Uzama miktarı. 2 aylık fidelere ait son boyları ile başlangıç boyları arasındaki farkları alındı ve bu farkların ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

<sup>2</sup> KU: Kök uzunluğu. 3 aylık fidelere ait köklerden en uzun boya sahip olanların ortalamaları alınarak kök uzunlukları ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

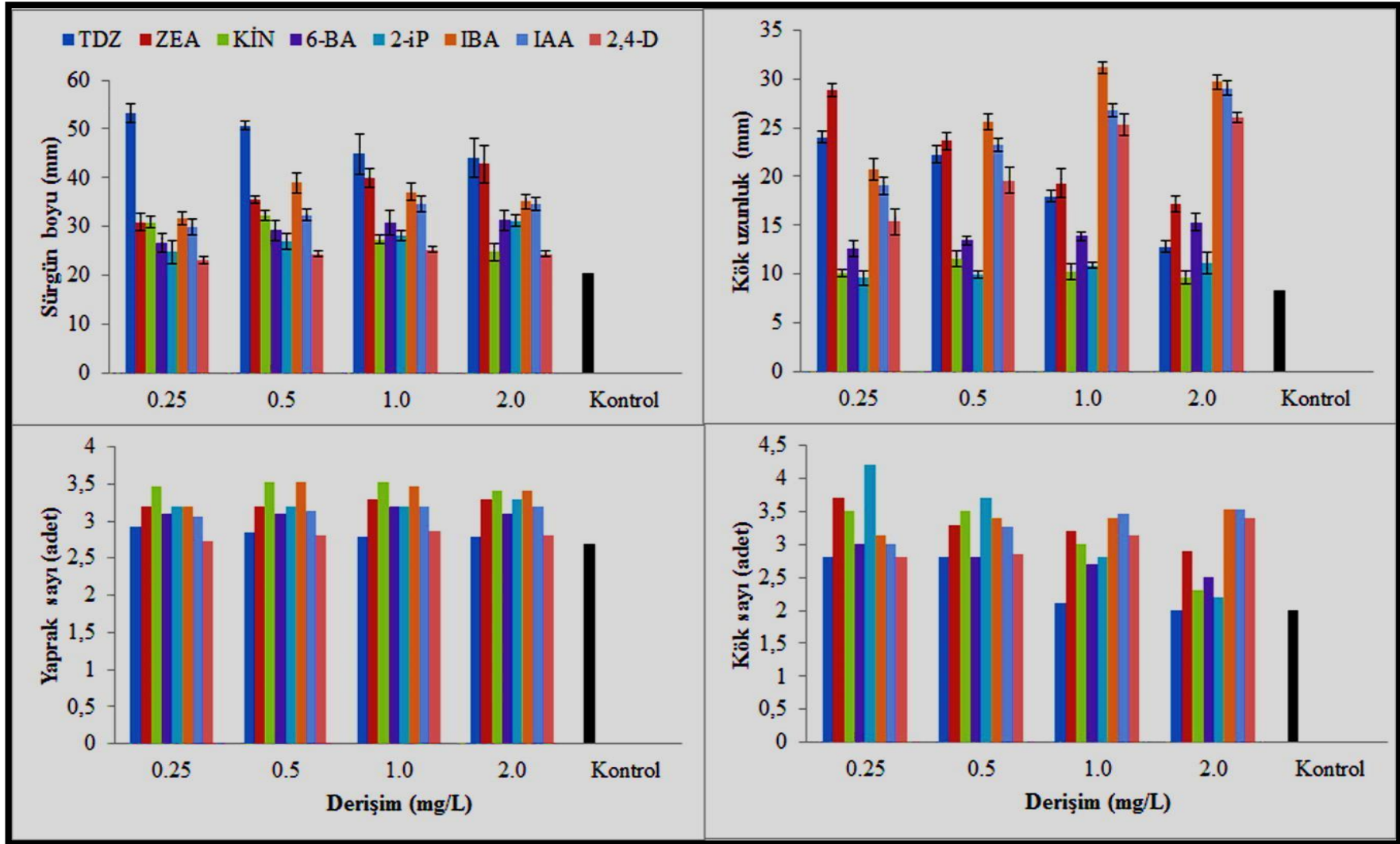
<sup>3</sup> KS: Kök sayısı. 3 aylık fidelere ait kök sayılarının ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

<sup>4</sup> YS: Yaprak sayısı. 3 aylık fidelere ait yaprak sayılarının ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 25'er örnekten ölçüm alındı.

<sup>5</sup> TO: Tuber oluşumu. 6 ay sonundaki tuber oluşum yüzdeleri

\* GM: Glukomannan miktarı.

Aynı sütundaki benzer harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre (P<0,05) farklı değildirlir



Şekil 30. Bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerinin *O. sancta*'da gözlemlenen sürgün oluşum parametrelerine etkisi

### 3.3.2. *S. vomeracea* ile Yapılan Sürgün Oluşturma Çalışmaları

Sitokininlerin (ZEA, TDZ, 6-BA, KİN ve 2-iP) kullanıldığı besi ortamlarında belirlenen sürgün uzama miktarları, kök uzunlukları, kök ve yaprak sayıları ile tuber oluşum yüzdeleri Tablo 8’de verilmiştir. Çalışılan bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerinin tamamının kontrole göre olumlu etki gösterdiği tespit edilmiştir.

En yüksek sürgün uzama miktarı 42,88 mm ile 0,25 mg/L TDZ içeren ortamda iken en düşük uzama miktarı 18,80 mm ile 0,25 mg/L 2-iP içeren ortamda gözlenmiştir. Kök uzamasında en etkili bitki büyüme düzenleyicisinin ZEA olduğu ve uygulanan tüm derişimlerde kök uzaması üzerine aynı düzeyde etki ettiği belirlenmiştir. En uzun kök 37,80 mm ile 0,5 mg/L ZEA içeren ortamda ölçülmüştür. En kısa kökler ise 2-iP’nin 1,0 mg/L ve 2,0 mg/L derişimlerinde sırasıyla; 17,99 mm ve 17,29 mm olarak belirlenmiştir. ZEA’nın 2,0 mg/L derişiminde en yüksek ortalama yaprak sayısı (5,18), 2-iP’nin 1,0 mg/L ve 2,0 mg/L derişimlerinde ise en düşük ortalama yaprak sayıları (2,43) gözlenmiştir. Ortalama 2,72 adet kök ile en düşük kök sayısı 2,0 mg/L TDZ içeren ortamdaki gözlenirken, ortalama 3,36 adet kök ile en fazla kök sayısı ile 2,0 mg/L ZEA içeren ortamdaki elde edilmiştir.

TDZ derişimlerinden elde edilen sürgün uzama miktarlarına bakıldığında artan derişimin sürgün uzamasını inhibe ettiği görülmüştür. Artan TDZ derişiminde elde edilen uzama miktarları sırasıyla; 42,88 mm, 31,94 mm, 24,46 mm ve 19,58 mm olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde kök uzunluğunun da artan TDZ derişimiyle azaldığı gözlenmiştir. Ortalama kök sayılarında azalış görülse de, yapılan istatistiksel analizler derişimler arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Çalışılan 0,25 mg/L, 0,5 mg/L ve 1,0 mg/L TDZ içeren ortamlar için ortalama yaprak sayıları arasında önemli bir fark olmamasına karşın 2,0 mg/L TDZ derişiminde daha düşük ortalama gözlenmiştir.

TDZ’nin aksine, artan ZEA derişiminin sürgün boyu, kök uzunluğu, ortalama kök sayısı ve yaprak oluşumunu olumlu yönde etkilediği görülmüştür (Tablo 8, Şekil 31).

KİN ile yapılan denemelerde artan derişimin sürgün uzunluğunda artışa neden olduğu fakat sonuçların birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Kök uzunlukları, yaprak sayıları ve kök sayıları bakımından da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sadece 0,25 mg/L KİN içeren ortamdaki elde edilen ortalama kök sayısı diğerlerine göre kısmen daha yüksektir.



Şekil 31. *S. vomeracea* fidelerinin farklı bitki büyüme düzenleyicileri (0,25 mg/L TDZ, 2,0 mg/L ZEA, 2,0 mg/L KİN, 2,0 mg/L 6-BA ve 2,0 mg/L 2-iP) varlığındaki görünüşleri. Kültür ortamında yetiştirilen 3 aylık fidelere ait resimler. Bar: 1 cm.

Elde edilen sürgün uzama miktarları, ortalama kök uzunlukları ve kök sayıları açısından artan 6-BA derişiminin olumlu etki gösterdiği ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı bulunmuştur.

2-iP ile yapılan çalışmalarda da artan derişimin sürgün uzunluğunda artışa neden olduğu fakat sonuçların birbirine yakın olduğu görülmüştür. Kök sayılarına ve yaprak sayılarına bakıldığında her bir derişimden elde edilen değerlerin benzer olduğu belirlenmiştir. Kök uzunlukları yönünden bakıldığında 0,25 ve 0,5 mg/L 2-iP içeren ortamdan elde edilen değerler kendi aralarında benzerlik göstermiştir. Aynı durum 1,0 ve 2,0 mg/L 2-iP içeren ortamlar için de geçerlidir ancak buradaki kök uzunlukları diğer gruba göre daha yüksektir. Ortalama yaprak sayısı 3,25 ile 3,33, ortalama kök sayıları ise 2,83 ile 2,92 olarak belirlenmiştir.

Tablo 8. Sitokininlerin *S. vomeracea*'de sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri

BBD	Derişim (mg/L)	UM <sup>1</sup> (mm)	KU <sup>2</sup> (mm)	KS <sup>3</sup>	YS <sup>4</sup>	TO <sup>5</sup>	GM* (%)
TDZ	0,25	42,88±1,8a	34,15±0,9b	3,73 def	3,18 ab	36,7	40,8±0,4
	0,5	31,94±1,7c	32,54±0,9c	3,66 def	2,90 ab	36,6	39,8±0,5
	1,0	24,46±1,5fg	30,64±0,8d	3,62 def	2,81 ab	28,6	22,3±0,5
	2,0	19,58±1,7hijk	28,90±1,1e	3,56 def	2,72 b	0	0±0,0
ZEA	0,25	20,25±1,6hij	37,50±0,9a	3,93 cde	2,90 ab	0	0±0,0
	0,5	24,18±1,6g	37,80±0,9a	4,33 bc	3,00 ab	53,5	35,8±0,7
	1,0	28,83±1,7d	37,66±0,7a	4,62 b	3,27 ab	55,5	41,0±0,6
	2,0	34,15±1,3b	37,78±0,5a	5,18 a	3,36a	57,3	44,6±0,3
KIN	0,25	19,08±1,1jk	23,65±0,9h	3,33 ef	2,86 ab	0	0±0,0
	0,5	19,88±1,2hijk	23,61±1,3h	3,26 f	2,92 ab	0	0±0,0
	1,0	20,19±1,5hij	23,51±1,1h	3,25 f	2,93 ab	39,1	22,8±0,9
	2,0	20,64±1,7hi	23,48±0,7h	3,25 f	3,00 ab	35,3	25,5±0,5
6-BA	0,25	24,59±1,6fg	25,21±1,1f	3,66 def	2,86 ab	36,3	28,4±1,1
	0,5	25,36±1,5efg	24,60±1,2fg	3,73 def	2,87 ab	39,4	30,4±1,0
	1,0	25,68±1,2ef	24,43±1,1g	3,81 cdef	2,93 ab	39,8	33,1±0,6
	2,0	26,12±1,4e	24,25±0,8gh	4,06 cd	2,93 ab	0	0±0,0
2-iP	0,25	18,80±1,2jk	18,50±1,1i	2,46 g	2,83 ab	0	0±0,0
	0,5	19,37±1,5ijk	18,13±0,7i	2,46 g	2,91 ab	0	0±0,0
	1,0	20,27±1,9hij	17,99±0,8j	2,43 g	2,92 ab	0	0±0,0
	2,0	20,96±2,2h	17,29±0,9j	2,43 g	2,90 ab	29,2	23,1±0,3
<b>Kontrol</b>	<b>0,0</b>	18,43±1,4k	18,52±1,2i	2,00 g	2,69 b	0	0±0,0

<sup>1</sup> UM: Uzama miktarı. 2 aylık fidelere ait son boyları ile başlangıç boyları arasındaki farklar alındı ve bu farkların ortalamaları alınarak  $\pm$  standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten alınan ölçümler kullanıldı.

<sup>2</sup> KU: Kök uzunluğu. 3 aylık fidelere ait köklerden en uzun boya sahip olanların ortalamaları alınarak kök uzunlukları  $\pm$  standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

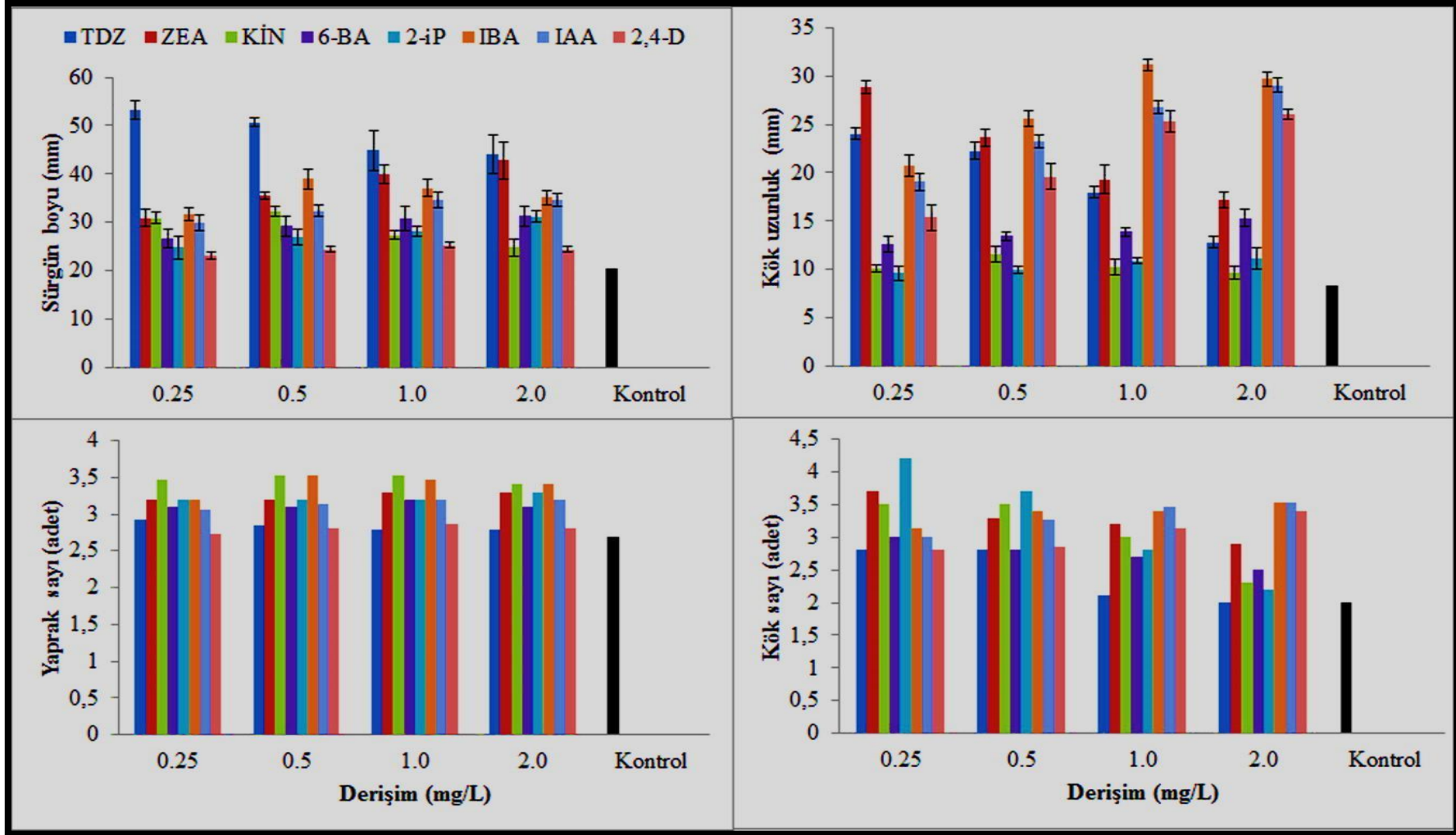
<sup>3</sup> KS: Kök sayısı. 3 aylık fidelere ait kök sayılarının ortalamaları alınarak  $\pm$  standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

<sup>4</sup> YS: Yaprak sayısı. 3 aylık fidelere ait yaprak sayılarının ortalamaları alınarak  $\pm$  standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 25'er örnekten ölçüm alındı.

<sup>5</sup> TO: Tuber oluşumu. 11 ay sonundaki tuber oluşum yüzdeleri

\* GM: Glukomannan miktarı.

Aynı sütundaki benzer harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ( $P<0.05$ ) farklı değildirlir



Şekil 32. Bitki büyüme düzenleyicisi derişimlerinin *S. vomeracea*'de gözlemlenen sürgün oluşum parametrelerine etkisi

### 3.4. Oksinlerin Sürgün Oluşumu ve Uzaması Üzerine Etkileri

Oksinlerin farklı derişimlerinin, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, kök sayısı ve yaprak sayısı gibi parametreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L derişimlerdeki IBA, IAA ve 2,4-D ile desteklenen Orchimax aktif kömürlü besi ortamında kültüre alınan protokormların 2 ay sonundaki sürgün uzama miktarları ve 3 ay sonundaki kök uzunlukları, kök sayıları ve yaprak sayıları değerlendirilmiştir. Kontrol grubu olarak bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen Orchimax aktif kömürlü besi ortamı kullanılmıştır. Her iki türden elde edilen sonuçlar Tablo 9 ve 10 ile Şekil 33'te verilmiştir.

#### 3.4.1. *O. sancta* ile Yapılan Sürgün Oluşturma Çalışmaları

Genel olarak IBA, IAA ve 2,4-D derişimlerinin sürgün uzama miktarları ve kök uzunlukları, kök sayıları ve yaprak sayıları bakımından kontrole göre olumlu etki göstermiştir. Sadece 0,25 mg/L 2,4-D içeren ortamdan elde edilen yaprak sayısı kontrole benzerlik göstermektedir. Buna göre; i) en yüksek sürgün uzama miktarı ve en fazla yaprak sayısı sırasıyla; 38,98 mm ve 3,5 adet değerleri ile 0,5 mg/L IBA ii) en yüksek ortalama kök uzunluğu 31,16 mm ile 1,0 mg/L IBA ve iii) en yüksek ortalama kök sayısı 3,5 ile 2,0 mg/L IAA içeren ortamlarda bulunmuştur.

Artan IBA derişiminin sürgün uzamasını azda olsa artırdığı ( $r^2=0,292$ ,  $P<0,05$ ) ve kök uzamasında da etkili olduğu ( $r^2=0,788$ ,  $P<0,01$ ) belirlenmiştir. IBA derişiminin artmasının kök sayısı ve yaprak sayısı üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür.

Benzer şekilde IAA derişim artışının sürgün uzaması ( $r^2=0,780$ ,  $p<0,01$ ) ve kök uzunluğuna ( $r^2=0,967$ ,  $P<0,01$ ) pozitif etki gösterdiği ve kök sayısında önemli derecede olmasada artışa neden olduğu, ancak yaprak sayısında artış ya da azalışa yol açmadığı saptanmıştır.

Gözlemlenen parametreler bakımından denenen diğer iki bitki büyüme düzenleyicisine göre daha düşük değerlerin ölçüldüğü 2,4-D'nin artan derişiminin kök uzunluğu ile arasında pozitif korelasyon ( $r^2=0,905$ ) belirlenmiştir. Artan 2,4-D derişimi sürgün uzamasında ve kök sayısında artışa neden olmuştur ancak yaprak sayısına herhangi bir etkisinin olmamıştır.

Tablo 9. Oksinlerin *O. sancta*'da sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri

BBD	Derişim (mg/L)	UM (mm) <sup>1</sup>	KU (mm) <sup>2</sup>	KS <sup>3</sup>	YS <sup>4</sup>	TO <sup>5</sup>	GM* (%)
IBA	0,25	31,76±1,3d	20,68±1,1g	4,1a	3,2abc	0	0±0,0
	0,5	38,98±2,1a	25,60±0,7de	4,3a	3,4ab	15,8	12,6±0,7
	1,0	37,07±1,8b	31,16±0,6a	4,4a	3,4ab	16,9	13,2±13,2
	2,0	35,06±1,4c	29,69±0,7b	4,5a	3,5a	16,8	15,0±0,4
IAA	0,25	29,83±1,6e	19,07±0,9h	3,0cd	3,0bcd	0	0±0,0
	0,5	32,38±1,2d	23,26±0,7f	3,2bcd	3,1abcd	0	0±0,0
	1,0	34,57±1,6c	26,77±0,7c	3,4bc	3,2abc	18,1	11,4±0,1
	2,0	34,58±1,3c	29,08±0,8b	3,5b	3,2abc	16,4	14,8±0,7
2,4-D	0,25	23,05±0,7g	15,34±1,3i	2,8d	2,7d	0	0±0,0
	0,5	24,28±0,6f	19,59±1,3h	2,8d	2,8cd	0	0±0,0
	1,0	25,26±0,7f	25,25±1,1e	3,1bcd	2,8cd	0	0±0,0
	2,0	24,38±0,7f	26,02±0,5d	3,4bc	3,1cd	0	0±0,0
<b>Kontrol</b>		20,44±0,8h	8,31±0,5j	2,0 d	2,70d	0	0±0,0

<sup>1</sup> UM: Uzama miktarı. 2 aylık fidelere ait son boyları ile başlangıç boyları arasındaki farklar alındı ve bu farkların ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

<sup>2</sup> KU: Kök uzunluğu. 3 aylık fidelere ait köklerden en uzun boya sahip olanların ortalamaları alınarak kök uzunlukları ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

<sup>3</sup> KS: Kök sayısı. 3 aylık fidelere ait kök sayılarının ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

<sup>4</sup> YS: Yaprak sayısı. 3 aylık fidelere ait yaprak sayılarının ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 25'er örnekten ölçüm alındı.

<sup>5</sup> TO: Tuber oluşumu. 6 ay sonundaki tuber oluşum yüzdeleri

\* GM: Glukomannan miktarı.

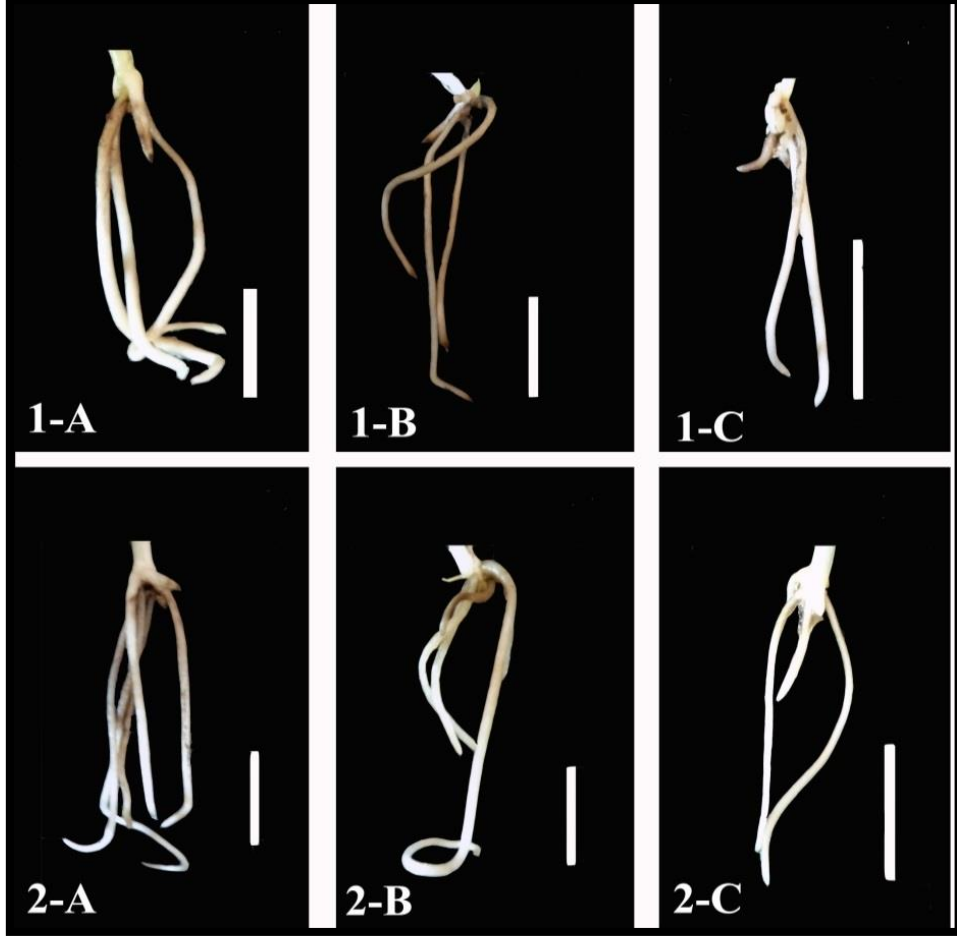
Aynı sütundaki benzer harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre (P<0.05) farklı değildirlir

### 3.4.2. *S. vomeracea* ile Yapılan Sürgün Oluşturma Çalışmaları

*Serapias vomeracea* türü ile yapılan çalışmalarda, denenen oksin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı derişimlerinin kontrole göre olumlu etki gösterdikleri belirlenmiştir. IBA'nın yüksek derişimleri sürgün uzamasına olumlu etki yaptı ve 2,0 mg/L IBA ile 31,92 mm sürgün uzunluğu elde edilmiştir. Bu derişimdeki yaprak sayısı da en yüksektir. Kök uzunluğuna en olumlu etkiyi 2,0 mg/L IAA derişimi göstermiştir (38,08 mm). 0,25 mg/L 2,4-D derişiminin, incelenen parametreler üzerinde en zayıf etkiye sahip



derişim olduğu belirlenmiştir. Bu ortamlardan elde edilen sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, kök sayısı ve yaprak sayısı sırasıyla 15,95 mm, 18,89 mm, 4,1 adet ve 3,0 adettir.



Şekil 33. *In vitro* koşullarda yetiştirilen (1): *O. sancta* ve (2): *S. vomeracea*'de kök oluşumu

Artan IBA, IAA ve 2,4-D derişimlerinin sürgün uzamasında olumlu etki (sırasıyla  $r^2=0,892$ ,  $r^2=0,968$  ve  $r^2=0,878$ ) gösterdikleri görülmüştür. Buna göre uygulanan tüm derişimlerden elde edilen ortalama sürgün uzama miktarları; IBA içeren ortamlarda 22,71 ila 31,92 mm; IAA içeren ortamlarda 19,86 ila 31,44 mm ve 2,4-D içeren ortamlarda 15,59 ila 22,20 mm arasında ölçülmüştür.

IBA, IAA ve 2,4-D derişimlerinin artışıyla kök uzunlukları arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir (sırasıyla  $r^2=0,863$ ,  $r^2=0,968$  ve  $r^2=0,940$ ). Yüksek derişimler kök uzamasında daha etkili olurken yaprak sayısı ve kök sayısı üzerine etkili olmamıştır.

Tablo 10. Oksinlerin *S. vomeracea*'de sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri

BBD	Derişim (mg/L)	UM <sup>1</sup> (mm)	KU <sup>2</sup> (mm)	KS <sup>3</sup>	YS <sup>4</sup>	TO <sup>5</sup>	GM* (%)
IBA	0,25	22,71±0,4f	28,95±0,6f	4,8abc	3,2bcde	0	0±
	0,5	28,69±0,4d	32,96±0,6d	5,0ab	3,6abc	36,8	33,8±1,0
	1,0	31,73±0,5ab	36,04±0,5b	5,2a	3,7ab	37,4	33,6±0,5
	2,0	31,92±0,7a	38,08±0,9a	5,2a	3,8a	39,6	35,0±0,3
IAA	0,25	19,86±0,7h	27,10±0,5g	4,5abcd	3,3abcde	0	0±0,0
	0,5	24,41±0,7e	31,38±0,6e	4,6abcd	3,4abcde	0	0±0,0
	1,0	29,16±0,6c	35,22±0,5c	4,9ab	3,5abcde	35,6	29,8±0,7
	2,0	31,44±0,5b	35,90±0,7b	5,0ab	3,6abcd	38,0	32,9±0,6
2,4-D	0,25	19,02±0,8h	18,89±0,4j	4,1d	3,0e	0	0±0,0
	0,5	19,13±0,7h	23,24±0,5i	4,2cd	3,1de	0	0±0,0
	1,0	22,18±0,5g	26,26±0,7h	4,4bcd	3,2cde	0	0±0,0
	2,0	22,20±0,5g	27,25±0,5g	4,5abcd	3,2cde	0	0±0,0
<b>Kontrol</b>		18,43±0,2i	18,52±1,2 j	2,00 e	2,69 f	0	0±0,0

<sup>1</sup> UM: Uzama miktarı. 2 aylık fidelere ait son boyları ile başlangıç boyları arasındaki farklar alındı ve bu farkların ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

<sup>2</sup> KU: Kök uzunluğu. 3 aylık fidelere ait köklerden en uzun boya sahip olanların ortalamaları alınarak kök uzunlukları ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

<sup>3</sup> KS: Kök sayısı. 3 aylık fidelere ait kök sayılarının ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

<sup>4</sup> YS: Yaprak sayısı. 3 aylık fidelere ait yaprak sayılarının ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 25'er örnekten ölçüm alındı.

<sup>5</sup> TO: Tuber oluşumu. 11 ay sonundaki tuber oluşum yüzdeleri

\* GM: Glukomannan miktarı.

Aynı sütundaki benzer harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre (P<0.05) farklı değildirler

### 3.5. *In vitro* Koşullarda Üretilen Tuberlerin Glukomannan İçeriğinin Belirlenmesi

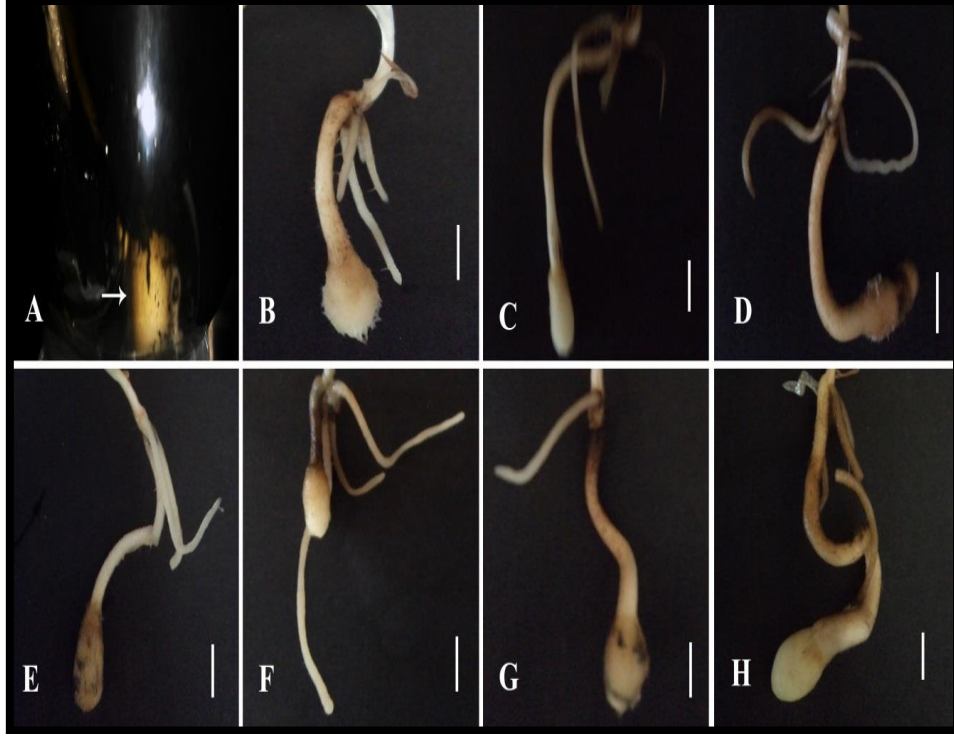
*In vitro* koşullarda yetiştirilen fidelerden elde edilen tuberlerin ihtiva ettikleri glukomannan miktarları fenol sülfürik asit yöntemiyle belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlar Tablo 7, 8, 9, 10'da verilmiştir. Buna göre, *O. sancta* ve *S. vomeracea*'de en yüksek tuber oluşum oranları %67,5 ve %57,3 değerleriyle 2,0 mg/L ZEA içeren ortamlarda belirlenmiştir (Şekil 34-H ve Şekil 35-B). Tuber oluşumunun en yüksek olduğu 2,0 mg/L ZEA ile desteklenen ortamlarda oluşan tuberlerin ihtiva ettikleri glukomannan

miktarlarının da en yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Elde edilen glukomannan miktarları *O. sancta*'da %28,0 ve *S. vomeracea*'de %44,6'dır. Doğal ortamda yetişen *O. sancta* tuberlerinin ihtiva ettikleri glukomannan miktarı %21,1, *S. vomeracea* tuberlerinin ihtiva ettikleri glukomannan miktarı ise %37,4 olarak tespit edilmiştir.

### 3.5.1. *O. sancta* Tuberlerinin Glukomannan Miktarları

Tablo 7'de görüldüğü gibi farklı derişimlerde TDZ içeren ortamlardan %40,5 - 27,9 oranlarında tuber oluşumu gözlenmiştir. Bu tuberlerin ise %25,2 - 15,7 oranlarında glukomannan içerdiği belirlenmiştir. ZEA uygulamasında (0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L) %63,1, 66,9 ve 67,5 oranlarında tuber oluşumuna rastlanırken, elde edilen glukomannan miktarları %20, 22,8 ve 28,0'dir. KİN'in farklı derişimleriyle desteklenen ortamların tümünde tuber oluşumu gerçekleşmiştir. Bu tuberlerdeki glukomannan miktarlarının %26,2 ile %14,0 arasında olduğu tespit edilmiştir. KİN gibi 2-iP'nin bütün derişimlerinde de tuber oluşmuştur. Tuberlerin %14,1 ile %21,3 oranlarında glukomannan içerdiği hesaplanmıştır. Sadece 6-BA'nın 2,0 mg/L bulunduran besi ortamlarında tuber oluşumu gözlenmiştir. Bu ortamdaki tuber oluşum oranı % 50,2, glukomannan miktarı 16,7'dir.

Oksin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden IBA'nın 0,25 mg/L derişimi hariç diğer derişimlerinde tuber oluşumu (%16 civarı) gözlenmiştir ve bu tuberlerinde %12 ila %15 aralığında glukomannan ihtiva ettiği belirlenmiştir. IAA ile desteklenen ortamlarda ise 1,0 ve 2,0 mg/L derişimlerinde tuber oluşumunun gerçekleştiği görülmüştür. Bu ortamlarda belirlenen tuber oluşum oranları %18,1 ve 16,4, glukomannan miktarları ise %11,4 ve 14,8'dir. 2,4-D'nin farklı derişimleriyle desteklenen ortamlarda tuber oluşumu görülmemiştir (Tablo 8).

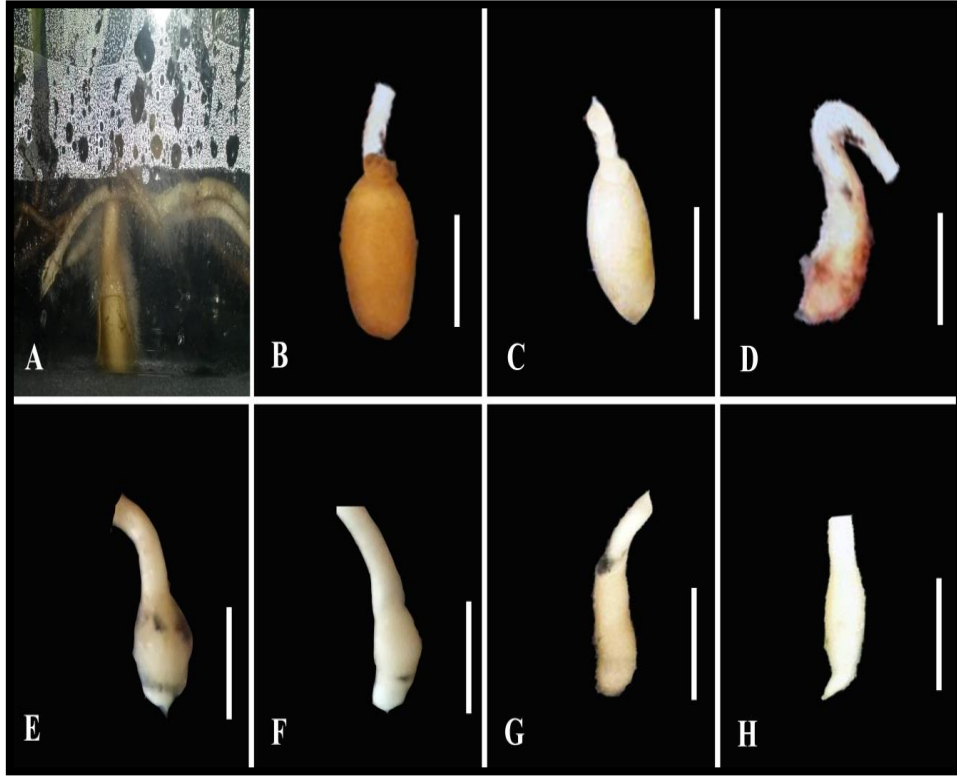


Şekil 34. *O. sancta*'da tuber oluşumu. A: oluşan tuberlerin besi ortamındaki görünümü, B: 0,25 mg/L TDZ, C: 2,0 mg/L IBA, D: 2,0 mg/L 2-iP, E: 2,0 mg/L 6-BA, F: 2,0 mg/L IAA, G: 0,5 mg/L KİN, H: 2,0 mg/L ZEA. Besi ortamında oluşan ve en yüksek glukomannan içeriğine sahip bireylere ait resimler

### 3.5.2. *S. vomeracea* Tuberlerinin Glukomannan Miktarları

*Serapias vomeracea*'nin tuber oluşum oranları ve glukomannan miktarlarına bakıldığında (Tablo 9), TDZ'nin 2,0 mg/L derişimi hariç diğer derişimleriyle desteklenen ortamlarda %36,7 ile %28,6 aralığında tuber oluşumu gözlenmiştir. Bu tuberlerin de %40,8 - %22,3 oranlarında glukomannan içerdiği tespit edilmiştir. ZEA'nın 0,25 mg/L haricindeki derişimleriyle desteklenen ortamların tuber oluşumunda etkili olduğu görülmüştür. Bu ortamlardaki tuber oluşum oranları sırasıyla %53,5 - %57,3 aralığında, glukomannan miktarları ise %35,8 - %44,6 aralığındadır. KİN'in 1,0 ve 2,0 mg/L derişimlerindeki tuber oluşum oranları %39,1 ve 35,3, glukomannan miktarları %22,8 ve 25,5'tir. 0,25, 0,5 ve 1,0 mg/L 6-BA içeren ortamlardaki fidelerin sırasıyla %36,3 - %39,8'inin tuber oluşturduğu ve bu tuberlerin %28,4 - %33,1 oranları aralığında glukomannan içerdikleri belirlenmiştir. 2-iP'nin sadece 2,0 mg/L derişimde tuber oluşumu görülmüştür. Bu ortamdaki tuber oluşum oranı %29,2, glukomannan miktarı %23,1'dir.

IBA'nın 0,25 mg/L derişiminin tuber oluşumunda etkisiz olduğu gözlenmiştir. Tuber oluşumu gözlenen ortamlardaki tuber oluşum oranları sırasıyla %36,8 - 39,6 ve glukomannan miktarları %33,8, %33,6 ve %35,0 olarak belirlenmiştir. IAA'nın denenen yüksek derişimlerinde (1,0 ve 2,0 mg/L) %35,6 ve %38,0 oranlarında tuber oluşumu gözlenmiştir. Bu ortamlardan elde edilen tuberlerin sırasıyla %29,8 ve %32,9 glukomannan içerdikleri belirlenmiştir. 2,4-D'nin tuber oluşumunda etkisiz olduğu görülmüştür. Farklı derişimlerdeki 2,4-D ile desteklenen ortamların hiçbirisinde tuber oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 10).

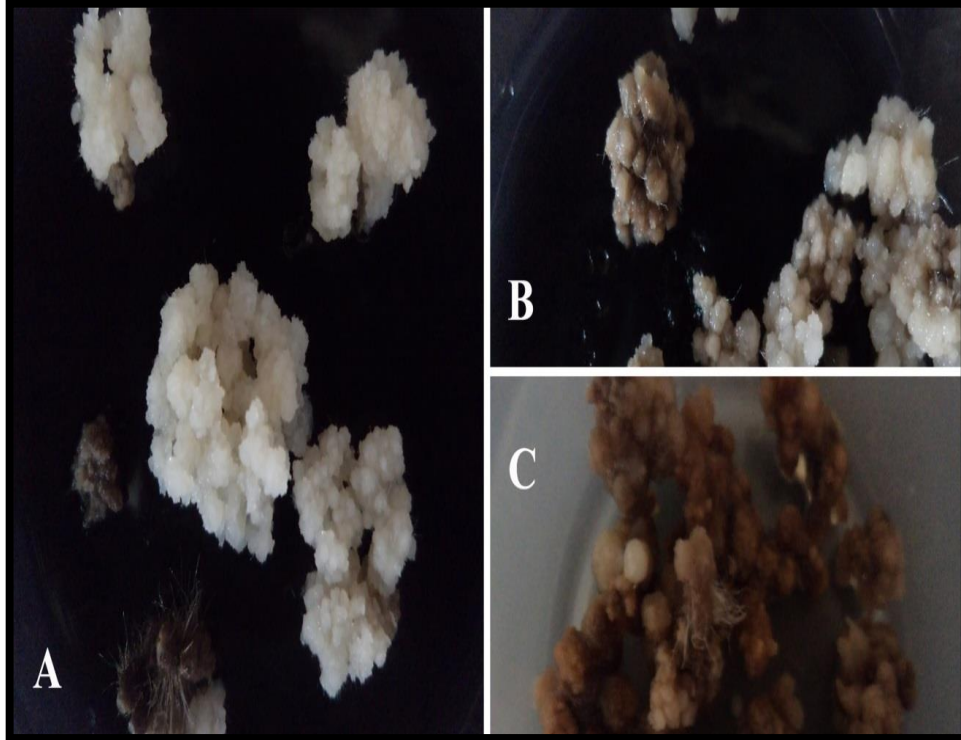


Şekil 35. *S. vomeracea*'de tuber oluşumu. A: oluşan tuberlerin besi ortamındaki görünümü, B: 2,0 mg/L ZEA, C: 0,25 mg/L TDZ, D: 2,0 mg/L IBA, E: 1,0 mg/L 6-BA, F: 2,0 mg/L IAA, G: 2,0 mg/L KİN, H: 2,0 mg/L 2-iP. Besi ortamında oluşan ve en yüksek glukomannan içeriğine sahip bireylere ait resimler

### 3.6. *O. sancta* ve *S. vomeracea*'nin Sentetik Tohumlarının Üretimi

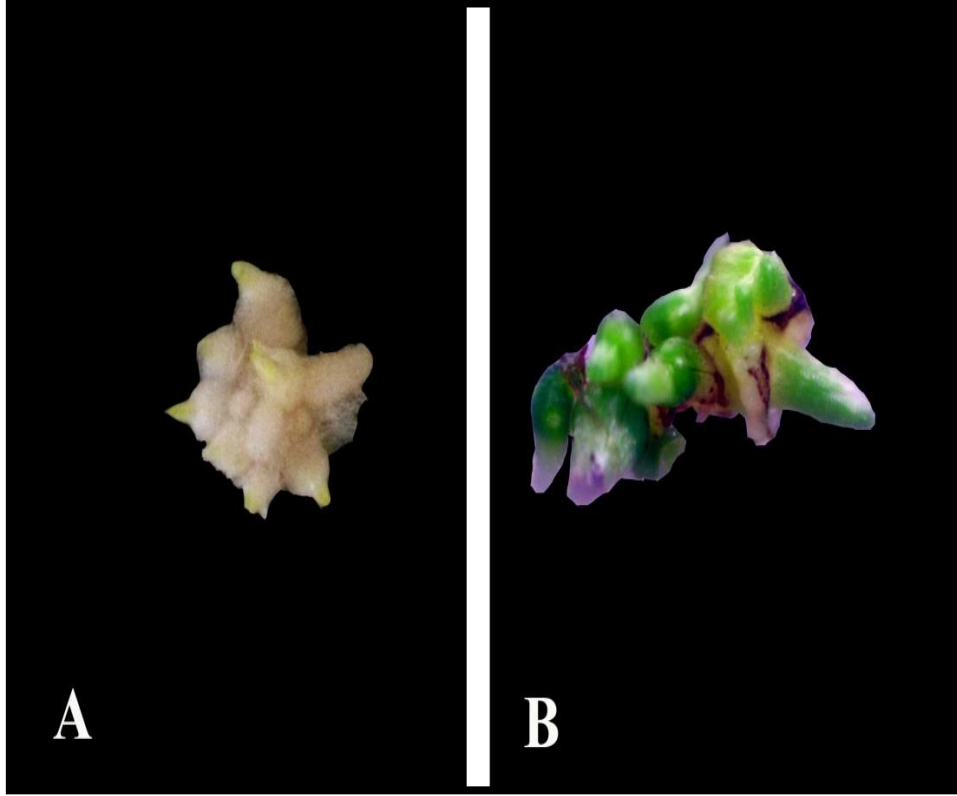
#### 3.6.1. Protokorm Benzeri Yapıların Oluşturulması ve İzolasyonu

Tek başına TDZ'nin 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L derişimleriyle ya da bu derişimlerin 1,0 mg/L IBA ile kombinasyonu ile desteklenen OM+ ortamlarından elde edilen, doğrudan protokorm benzeri yapı (PBY) oluşturma yüzdeleri ve eksplant başına oluşan PBY sayıları Tablo 11'de verilmiştir. PBY'lerin oluşturulması çalışmalarında, bazı eksplantlarda kallus oluşmuştur (Şekil 36). Kalluslardan daha fazla biyokütle elde etmek amacıyla, aynı besi ortamlarında alt kültürü yapılmıştır. Böylelikle, dolaylı PBY oluşturulması planlanmıştır. Ancak alt kültürlerin tamamının kararması nedeniyle sonuç elde edilememiştir (Şekil 34-C). Bu yüzden, PBY oluşturma çalışmaları kallus oluşumunu gerçekleştirmeksizin, kullanılan eksplantın belirlenen ortamlarda doğrudan farklılaştırılmasıyla yürütülmüştür (Şekil 37).



Şekil 36. *S. vomeracea*'de kallus oluşumu. (A) sağlıklı kallus, (B) yapılan altkültürden sonra kalluslarda kararma başlangıcı, (C) kararmış ve canlılığını yitirmiş kalluslar

PBY oluşumunun ve oluşan PBY'lerin sayısının kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin derişimleriyle ya da oluşturulan kombinasyonlarla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen OM+ ortamının kontrol grubu olarak kullanıldığı çalışmalarda, her iki türe ait eksplantlardan PBY oluşumu görülmemiştir.



Şekil 37. (A): *O. sancta* ve (B): *S. vomeracea*'de protokorm benzeri yapıların oluşumu

### 3.6.1.1. *O. sancta* ile Yapılan PBY Oluşturma Çalışmaları

TDZ'nin tek başına kullanıldığı denemelerde en yüksek protokorm oluşum yüzdesi %93 ile 1,0 mg/L TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. Bu ortamdan elde edilen eksplant başına oluşan protokorm sayısı 9,2 adet olarak belirlenmiştir. 0,1; 0,25; 0,5 ve 2,0 mg/L TDZ ile desteklenen ortamlardan elde edilen PBY oluşum yüzdeleri sırasıyla %16, %56, %91 ve %86, eksplant başına oluşan PBY sayısı ise ortalama 3,4; 4,2; 4,9 ve 9,1 adettir.

1,0 mg/L IBA ile kombine edilen ortamlarda PBY oluşum yüzdelerinin ve eksplant başına PBY sayısının, tek başına TDZ ile desteklenen ortamlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. 1,0 mg/L ve 2,0 mg/L TDZ'nin 1,0 mg/L IBA ile kombinasyonu

desteklenen ortamlara ekilen eksplantların tamamında (%100) PBY regenerasyonu gerçekleşmiştir. Bu ortamlardaki eksplant başına oluşan PBY sayısı sırasıyla 9,5 ve 12,0 adettir. 0,1; 0,25 ve 0,5 mg/L TDZ ile 0,5 mg/L IBA'nın kombine edildiği ortamlardaki PBY oluşum yüzdeleri sırasıyla %21, %71 ve %95 olarak belirlenmiştir. Bu ortamlardan elde eksplant başına oluşan PBY sayıları ise sırasıyla; 3,4; 5,4 ve 6,2 adettir.

### **3.6.1.2. *S. vomeracea* ile Yapılan PBY Oluşturma Çalışmaları**

Tek başına TDZ ya da 1,0 mg/L IBA ile kombinasyonuyla desteklenen ortamlardan elde edilen verilere göre en yüksek protokorm oluşum yüzdesi 0,5 mg/L ve 2,0 mg/L TDZ'nin 1,0 mg/L IBA ile kombine edildiği ortamlarda görülmüştür (%96). Bu ortamlardaki protokorm başına oluşan PBY sayısı sırasıyla 14,9 ve 14,4 adettir. TDZ'nin tek başına kullanıldığı ortamlardaki PBY oluşum yüzdeleri en düşük derişimden en yüksek derişime doğru sırasıyla %6, %26, %88 ve %48'dir. Yine bu ortamlardaki eksplant başına oluşan ortalama PBY sayıları 4,0; 5,6; 9,7; 14,7 ve 13,5 adet olarak belirlenmiştir (Tablo 11).

Genel olarak bakıldığında TDZ'nin IBA ile kombinasyonunun, PBY oluşum yüzdesini ve sayısını artırdığı görülmüştür. En yüksek PBY oluşum yüzdesi ve eksplant başına elde edilen PBY miktarının IBA ile kombine edilen ortamlarda olduğu gözlenmiştir. Tespit edilen PBY oluşum yüzdeleri artan TDZ derişimde sırasıyla %16, %66, %96, %88 ve %96'dır. Eksplant başına oluşan PBY sayıları ise sırasıyla ortalama 4,3; 6,8; 14,9; 14,0 ve 14,4 adettir (Tablo 11).



Tablo 11. *O. sancta* ve *S. vomeracea*'de protokorm benzeri yapı oluşum oranları ve eksplant başına oluşan ortalama PBY sayıları

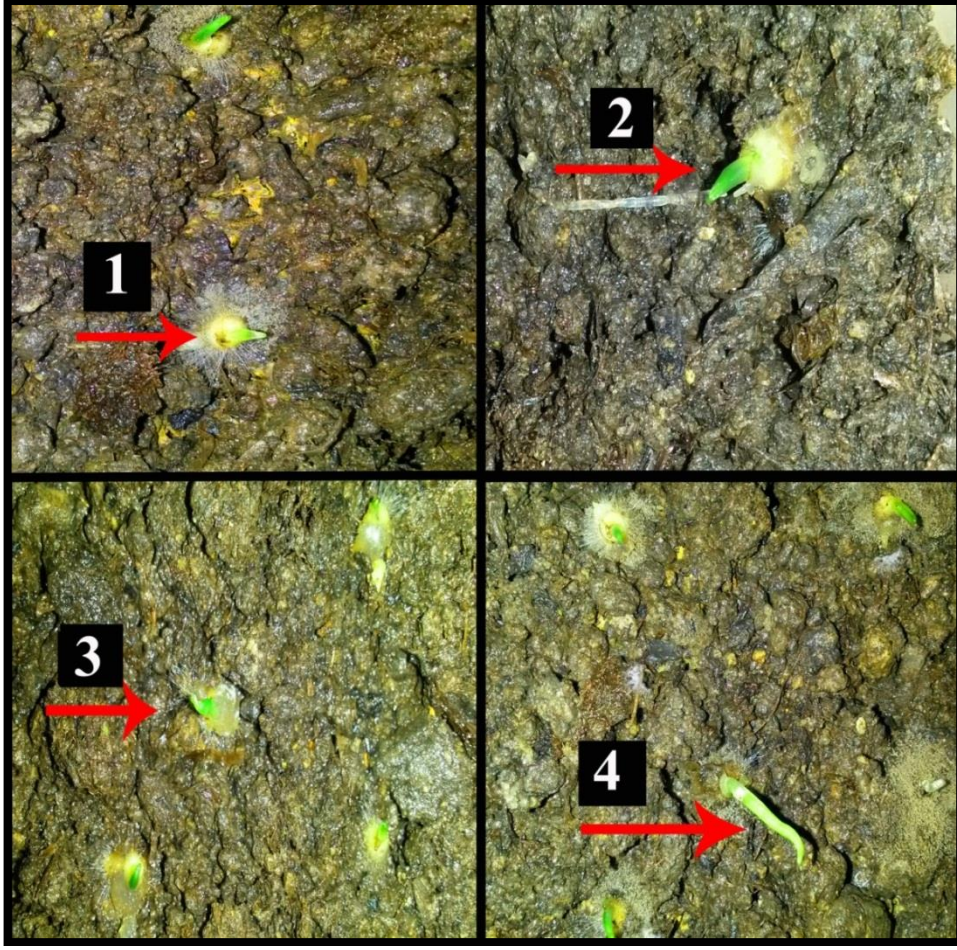
BBD	<i>O. sancta</i>			<i>S. vomeracea</i>	
	Derişim (mg/L)	PBY oluşumu (%)	PBY sayısı*	PBY oluşumu (%)	PBY sayısı*
TDZ	0,1	16	3,4f	6	4,0g
	0,25	56	4,2e	26	5,6f
	0,5	91	4,9d	88	9,7d
	1,0	93	9,2b	48	14,7a
	2,0	86	9,1b	81	13,5c
TDZ + IBA	0,1 + 1,0	21	3,4f	16	4,3g
	0,25 + 1,0	71	5,4d	66	6,8e
	0,5 + 1,0	95	6,2c	96	14,9a
	1,0 + 1,0	100	9,5b	88	14,0bc
	2,0 + 1,0	100	12,0a	96	14,4ab

Aynı sütundaki benzer harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ( $P < 0.05$ ) farklı değildirler

### 3.6.2. Sentetik Tohumların Farklı Ortamlarda Çimlendirilmesi

Belirlenen yapay endosperm ile kaplanan *O. sancta* ve *S. vomeracea* türlerine ait PBY'lerden oluşturulan sentetik tohumların 3 farklı kültür koşullarındaki çimlenme oranları ve çimlenen tohumların fideye dönüşüm oranları Tablo 12'de verilmiştir. Sentetik tohumların besi ortamında çimlendirilmesinde daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

*Orchis sancta* sentetik tohumlarının besi ortamında %81'inin çimlendiği belirlenmiştir. Besi ortamında çimlendirilen *O. sancta* sentetik tohumlarının, tamamı sağlıklı fidelere dönüşürken, sterilize torf ortamında ise %69'u çimlenmiştir (Şekil 38). Sterilize edilmeyen torf ortamına ekilen tohumların tamamı kontaminasyon (fungal) sonucu canlılıklarını yitirmiştir.

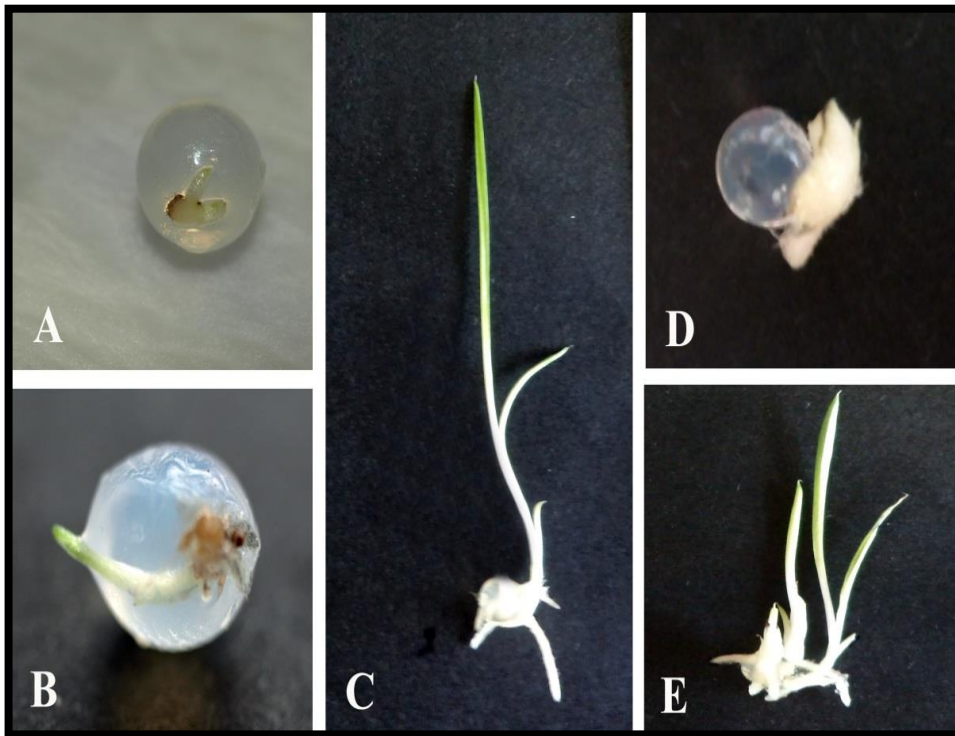


Şekil 38. (1,2): *S. vomeracea* ve (3,4): *O. sancta* sentetik tohumlarının steril torf ortamında çimlenmeleri

*Serapias vomeracea* sentetik tohumlarının %90'ı besi ortamında çimlenmiş ve çimlenen örneklerin tamamından fideler oluşmuştur. Sterilize torf ortamında sentetik tohumların %75'inin çimlendiği ve bu çimlenen örneklerin %60'ının daha sonra gelişimlerini sürdürerek fidelere dönüştüğü belirlenmiştir (Şekil 38). Oysa sterilize edilmeyen torf ortamında sentetik tohumların çimlenmediği, kısa bir süre sonra fungal bulaşma sonucu canlılıklarını yitirdikleri gözlenmiştir. Ayrıca bu türe ait sentetik tohumların besi ortamında çimlendirilmesi çalışmalarında, çimlenen örneklerin bazılarında 2'li ya da 3'lü sürgün oluşumu görülmüştür (Şekil 39). Çoklu sürgün oluşum oranı % 21 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 12. *O. sancta* ve *S. vomeracea*'ye ait sentetik tohumlarının çimlenme oranları

	<i>O. sancta</i>		<i>S. vomeracea</i>	
	Çimlenme oranı (%)	Fide oluşumu	Çimlenme oranı (%)	Fide oluşumu
Besi ortamı	81	100	90	100
Torf	0	0	0	0
Sterilize torf	69	63	75	60



Şekil 39. *S. vomeracea*'den elde edilen sentetik tohumların besi ortamındaki gelişimleri. A: *S. vomeracea*'ye ait sentetik tohum, B: Çimlenmeye başlayan sentetik tohum, C: Çimlenen sentetik tohumdan oluşan *S. vomeracea*'ye ait fide, D: Çimlenmeye başlayan ve çoklu sürgün oluşumuyla sonuçlanacak sentetik tohum, E: Çimlenen sentetik tohumdan çoklu sürgün oluşumu.

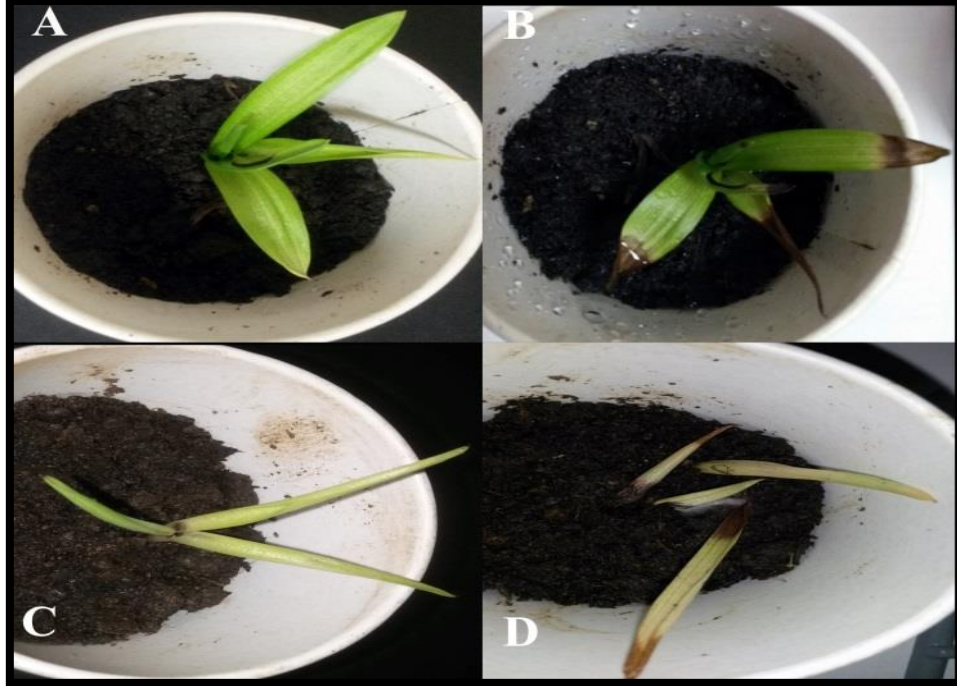
### **3.7. *İn Vitro* Koşullarda Oluşturulan Fidelerin Toprak Koşullarına Adapte Edilmesi**

#### **3.7.1. Deneme I: Sterilize Edilmeyen Toprak Koşullarına Adaptasyon**

##### **3.7.1.1. *O. sancta* ile Yapılan Adaptasyon Çalışmaları**

Besi ortamlarında gelişimleri tamamlanmış *O. sancta* fideleri, antimikrobiyal ajanlarla muamele edilen ve edilmeyen olmak üzere iki farklı toprak grubuna ekimleri yapılmıştır. Bu fidelerin 1. ve 2. ay sonundaki canlılık durumları ve oranları belirlenmiştir. Buna göre 1. ay sonunda %0,1 klorokresol ve %0,1 kloroksilenol ile muamele edilen fidelerin % 55'i torf ortamında canlılığını sürdürmüştür. Aynı uygulamadan geçen ve orman altı toprağına ekilen fidelerin ise canlılık oranı %26'dır. Antimikrobiyal kimyasal içermeyen her iki toprak tipinde de fideler yaşamamıştır. Zira ekilen fidelerin tamamında çürümeden kaynaklanan ölümler görülmüştür (Şekil 40).

Fideler, 1 ay kısmen hava alabilecek kapalı saksılar içerisinde bekletildikten sonra kapakları açılmış ve bu şekilde adaptasyonlarına devam edilmiştir. Yine 1 aylık süreç sonundaki gelişimleri gözlenmiştir. Kapakların açılmasıyla fidelerin tamamının kuruyarak canlılıklarını kayb ettikleri görülmüştür. *İn vitro* ortamda yetiştirilen *O. sancta* fidelerinin burada bahsedilen toprak koşullarına uyum sağlayamadığı sonucuna varılmıştır.

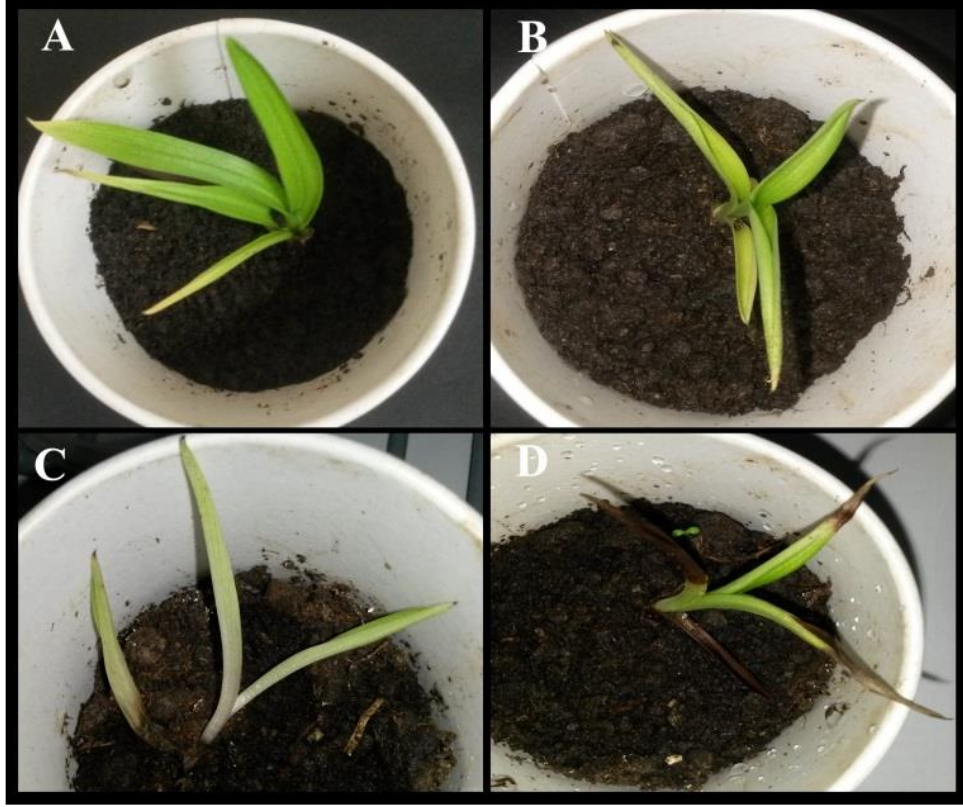


Şekil 40. Torf ortamına aktarılan *O. sancta* fidelerinin A ve C: 1. Ay, B ve D: 2. ay sonundaki görünüşleri

### 3.7.1.2. *S. vomeracea* ile Yapılan Adaptasyon Çalışmaları

*Serapias vomeracea* fidelerinin toprak koşullarına adaptasyonları için *O. sancta*'ya uygulanan yöntemin aynısı izlenmiştir. Buna göre 1. ay sonunda %0,1 klorokresol ve %0,1 kloroksilenol ile muamele edilen fidelerin % 48'i torf ortamında canlılığını sürdürmüştür. Aynı uygulamadan geçen ve orman altı toprağına ekilen fidelerin ise canlılık oranı %32'dir. Antimikrobiyal kimyasal içermeyen her iki toprak tipinde de fideler yaşamamıştır. Zira ekilen fidelerin tamamında çürümeden kaynaklanan ölümler görülmüştür (Şekil 41).

Fideler, 1 ay kısmen hava alabilecek kapalı saksılar içerisinde bekletildikten sonra kapakları açılmış ve bu şekilde adaptasyonlarına devam edilmiştir. Yine 1 aylık süreç sonundaki gelişimleri gözlenmiştir. Kapakların açılmasıyla fidelerin tamamının kuruyarak canlılıklarını kaybettiği görülmüştür. *In vitro* ortamda yetiştirilen *S. vomeracea* fidelerinin burada bahsedilen toprak koşullarına uyum sağlayamadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 41. Torf ortamına aktarılan *S. vomeracea* fidelerinin A ve B: 1. Ay, C ve D: 2. ay sonundaki görünüşleri

### 3.7.2. Deneme II: Sterilize Torf Ortamında Adaptasyon

Bir önceki denemede *in vitro* ortamlardan elde edilen fideler antimikrobiyal kimyasallarla muamele edildi ve toprak koşullarına ekimleri yapılmıştır. Fakat ilk bir aylık süre sonunda canlılıklarını devam ettiren fidelerin, kapakların açılmasıyla birlikte canlılıklarını yitirdikleri gözlenmiştir. Saksılarda meydana gelen bulaşma (kontaminasyon) kaynaklı fide ölümlerini engellemek için yeni bir deneme yapılmış ve bu denemede kullanılacak olan toprağın sterilizasyonu yapılmıştır. Otoklavda sterilize edilen topraklara ekilen fidelerin 1, 2 ve 3 aylık süre içindeki gelişimleri takip edilerek canlılık oranları belirlenmiştir.

Buna göre, *in vitro* ortamda yetiştirilen ve sterilize torf ortamına aktarılan *O. sancta* fidelerinin %100'ünün ilk ay sonunda canlı kaldıkları belirlenmiştir. Kapakların kısmen açılmasıyla 15 günlük inkübasyon sonunda fidelerin tamamının gelişimine devam ettiği görülmüştür. Kapakların tamamen açılmasının ardından 1 ay inkübe edilen fidelerin %13

'ünün canlılığını yitirdiği, %87'sinin ise gelişimine sağlıklı bir biçimde devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 42). Toprağa aktarılan örneklerde tuber oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 42. Sterilize torf ortamına aktarılan *O. sancta* fidelerinin 2 ay sonraki görünüşleri

*Serapias vomeracea* ile yapılan denemelerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kültür kaplarının kapaklarının tamamen açılmasına kadar geçen sürede, toprağa aktarılan fidelerde herhangi bir canlılık kaybı görülmemiştir. Kapakların tamamen açılmasının ardından fidelerin %9'unun canlılığını yitirdiği, %91'inin ise gelişimine devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 43). Yapılan bu denemede, toprak koşullarında gelişen örneklerde tuber oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 43. Sterilize torf ortamına aktarılan *S. vomeracea* fidelerinin 2 ay sonraki görünüşleri

#### 4. TARTIŞMA

İnsanoğlu bitkileri ya da bitkisel ürünleri değişik amaçlarla kullanır (ilaç, besin katkı maddeleri, parfüm ve kozmetik, zirai mücadele gibi). Bu bileşiklerin birçoğu, kimyasal olarak sentezi zor ya da üretilmeleri veya miktarlarının artırılması genetik mühendislik müdahaleleri ile dahi büyük çabalar gerektirir (Zhong vd., 2001). Ekonomik değer taşıyan bitkilerin ya da doğal ürünlerinin kaynak bitkiden doğrudan elde edilmesi her şeyden önce bu bitkiler üzerinde ekolojik tahribata neden olmaktadır. Bu tahribatın önlenmesi hususunda bitki biyoteknolojisinden yararlanma olanağı güncel bir yaklaşımdır. Bitki doku kültürü yöntemleri ile bitkilerin ya da doğal ürünlerinin (sekonder metabolitlerin) üretimi bitki biyoteknolojisinin ilgi çekici konularından birisidir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Bu çalışmada, doğal ortamlarında çoğalmaları bir hayli zor olan ve ekolojik tahribat sonucunda sayıları gittikçe azalan orkide (Orchidaceae) familyası üyelerinden *Orchis sancta* ve *Serapias vomeracea* türlerinin doku kültürü yoluyla çoğaltımının optimizasyonu, *in vitro* koşullarda çoğaltılan bitkilerden elde edilen tuberlerin glukomannan içeriklerinin belirlenmesi ve bitkilerin toprak koşullarına adaptasyonu ve sentetik tohumlarının üretimi ve çimlendirilmesi gerçekleştirildi. *In vitro* çimlendirme çalışmalarında farklı temel besi ortamlarının ve çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı derişimlerinin çimlenme ve protokorm oluşumu üzerine etkileri araştırıldı. Ayrıca farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün oluşumu üzerine etkileri araştırıldı. Bu tez çalışması, *in vitro* ortamda elde edilen tuberlerin glukomannan içeriklerinin belirlenmesi ve sentetik tohumlarının üretimi konularında bir ilk, *in vitro* asimbiyotik çimlendirme ve fidelerinin üretimi konularında ise yapılan ilk geniş kapsamlı çalışma niteliğindedir. Ayrıca, oluşturulan protokoller nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan diğer orkide türlerinin üretiminde de uygulanabilir ve ekolojik tahribatın önüne geçilebilir niteliktedir.

Orkide tohumları sert bir tohum kabuğuyla örtülüdürler. Tohumun çimlenebilmesi için bu sert tohum kabuğunun zayıflatılması büyük önem arz etmektedir. Tohumların yüzey sterilizasyonlarında kullanılan kimyasalların türü, derişimi ve muamele edilme süreleri, hem yüzey sterilizasyonunun hem de tohum kabuğunun zayıflatılması ve daha kolay çimlenmesi için önemlidir. Bu çalışmada, olgun *O. sancta* ve *S. vomeracea* tohumları için, ticari çamaşır suyu ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin farklı derişimleri kullanılarak, en uygun yüzey sterilizasyon yöntemi belirlenmiştir. Hidrojen peroksitle yapılan denemelerden elde



edilen canlılık oranlarının çamaşır suyu ile yapılan denemelerden elde edilenlere göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca hidrojen peroksitle yapılan çalışmalarda, %5'lik derişim dışındaki derişimlerle muamele edilip kültüre alınan tohumlarda kontaminasyona rastlanmamıştır. Özkoç ve Dalcı (1991) orkide tohumlarının sterilizasyonunda sodyum hipokloritin daha fazla kullanıldığını bildirmiştir. Ayrıca yüzey sterilizasyonunda kullanılacak olan kimyasalın, derişiminin ve uygulama süresinin önemli olduğunu ve bu yüzden sterilizasyon için en uygun parametrelerin belirlenmesi gerektiğini bildirmiştir. Vejsadova (2006), orkide tohumlarının yüzey sterilizasyonunda %7,2'lik kalsiyum hipokloritin kullanılmasının daha iyi sonuçlar vereceğini bildirmiştir. Bektaş ve arkadaşları (2013), *Orchis coriophora* türünün yüzey sterilizasyonunu 30 dakika % 20'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele ederek gerçekleştirmiş ve tohumların yüzey sterilizasyonu sonrası canlılık oranını %54 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmadaki sonuçlar, bizim çalışmamızda elde edilen verileri desteklemektedir. Çalışmamızda, *O. sancta* ve *S. vomeracea* olgun tohumlarına uygulanabilecek en uygun yüzey sterilizasyonu için kullanılan kimyasalın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve derişiminin %10 olduğu belirlenmiştir.

Orkide tohumları endosperm bulundurmazlar ve bu yüzden doğal ortamlarda çimlenebilmek için mikorizal funguslarla simbiyotik ilişki kurarlar. Funguslar embriyonun çimlenebilmesi için enerji sağlarlar. *In vitro* koşullarda orkide tohumların çimlenebilmek için gereksinim duydukları besinler ortama eklenerek bu zorunluluk ortadan kaldırılmış olur. Çalışmamızda, *O. sancta* ve *S. vomeracea* olgun tohumları farklı içeriğe sahip temel besi ortamlarında (Bölüm 2, Tablo 4) çimlendirilmiş ve bu ortamlardan OM+ ortamında daha yüksek oranlarda (sırasıyla %62,46 ve %73,74) ve kısa sürelerde (sırasıyla 15 ve 20 gün) çimlendikleri görülmüştür. Denenen besi ortamlarında KCM ve LM ortamları benzer etki göstermiş ve her iki türe ait en düşük çimlenme oranları ve en uzun çimlenme süreleri bu ortamlarda tespit edilmiştir. Doğal ortamlarında orkide tohumlarının %5'ten daha azı çimlenebilmektedir ve çimlenebilmek için en azından uygun iklim koşulları oluşuncaya kadar beklemektedirler. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda OM+ besi ortamından hem çimlenme oranı hem de çimlenme süresi bakımından çok yüksek değerler alınmıştır. Bektaş ve arkadaşlarının (2013) *Orchis coriophora* türünde yaptıkları çalışmada da bizim çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilmiş ve en yüksek çimlenme oranını Orchimax aktif kömürlü besi ortamından (OM+) elde etmişlerdir.

Çalışma kapsamında denenen besi ortamlarından OM ve OM+ ortamları inorganik azot kaynağının yanı sıra organik azot kaynağı da (tripton) ihtiva etmektedir. Bu

ortamlardaki çimlenme oranlarının diğer ortamlardan daha yüksek olmasının nedeni olarak ihtiva ettikleri organik azot kaynağı gösterilebilir. Daha önce yapılan çalışmalarda inorganik azot kaynağı içermeyen besi ortamlarında ya da inorganik azot kaynağının yanında organik azot kaynağı içeren besi ortamlarında orkide tohumlarının daha yüksek oranlarda çimlendiği bildirilmiştir (Stewart ve Kane, 2006). Hatta çeşitli kaynaklarda, inorganik azotun varlığı orkide tohumlarının çimlenmesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Raghavan ve Torrey, 1964; Van Waes ve Debergh; 1986 Malmgren, 1992). Özkoç ve Dalcı (1993), *S. vomeracea* subsp. *laxiflora* tohumlarının inorganik azot bulunmayan ortamda daha yüksek oranda çimlendiğini bildirmişlerdir. Literatürde ulaşılan bu raporlar, bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.

En yüksek çimlenme oranının tespit edildiği OM+ ortamı, organik azot kaynağının yanı sıra OM ortamından farklı olarak 2 mg/L aktif kömür içermektedir. Bu iki ortam arasındaki çimlenme oranlarının farklılık, OM+ ortamının ihtiva ettiği aktif kömürden kaynaklanmaktadır. Aktif kömürün, kültür ortamına ekilen tohumlar için karanlık bir ortam sağladığı ve bunun sonucu olarak ta çimlenmeyi artırdığı düşünülmektedir. Paek ve Murthy (1977), aktif karbonun ortama ışık girişini engelleyerek köklenmeyi artırdığı tespit bildirmişlerdir. Ayrıca aktif karbon ilavesinin kültür ortamındaki pH seviyesini artırdığı ve pH seviyesinin kültüre alma süresince sabit kalmasını sağladığı, azot alınımını artırarak büyümeyi teşvik ettiği tespit edilmiştir (Eymar vd., 2000). Bunların aksine, ortama ilave edilen aktif karbonun çimlenme oranını azalttığı da bildirilmiştir (Waes, 1987).

Çalışmamızda, tüm besi ortamlarının pH değerleri 5,7-5,8 aralığına ayarlanmıştır ve kültüre alınan örnekler  $23 \pm 2$  °C sıcaklıkta 16/8 saat fotoperiyodunda inkübe edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, tohumların çimlenmesi için belirlenen optimum pH ve inkübasyon sıcaklığının bizim çalışmamızla benzer olduğu görülmektedir. Bir çalışmada, ılıman kuşak orkidelerinin çimlenebilmeleri için en uygun pH değerinin 5,8 olduğu kaydedilmiştir (Van Waes ve Deberg, 1986). Sıcaklığın orkide tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişimi üzerindeki etkisiyle ilgili yapılan çalışmalarda en uygun sıcaklığın 20- 25 °C olduğu, bunun yanı sıra 6-40 °C'de bile çimlenmenin olabileceği bildirilmiştir (Arditti, 1967a, 1979). *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) P.F. Hunt&Summerh. türünün çimlenme koşullarının belirlendiği bir çalışmada ise maksimum çimlenmenin 23,5 °C'de olduğu rapor edilmiştir (Rasmussen vd, 1990). Bizim çalışmamızın aksine, Mead ve Bulard (1975) yaptıkları çalışmada, orkide tohumlarının çimlenebilmesi için en iyi aydınlatma koşulunun karanlık ortam olduğunu bildirmişlerdir. Valletta ve arkadaşları

(2008), *Orchis mascula* türünün tohumlarının çimlenmesi için 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyodunun en uygun rejim olduğunu, sürekli karanlık rejimde inkübe edilen tohumlarda çimlenme gözlenmediğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda denenilen 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyodunda tohumların oldukça yüksek oranlarda çimlendiği görülmüştür. Bu sebepten dolayı tohumların, karanlık koşullarda çimlendirmesi denenmemiştir.

Mevcut çalışmada, *O. sancta* türüyle yapılan çimlendirme çalışmalarında en yüksek çimlenme %62,46'lık değerle OM+ ortamında tespit edilmiştir. Yine aynı ortamda, *S. vomeracea* türüne ait tohumların %73,74'ünün çimlendiği belirlenmiştir. Önal (1999), *O. sancta* ile yaptığı çalışmada, %10 patates özütü içeren Knudson C (KCM) ortamında tohumların tamamının (%100) çimlendiğini bildirmiştir. Yine aynı çalışmada, %10 ve %20 muz özütü eklenen Knudson C ortamında *S. vomeracea* tohumlarının %40'ının çimlendiğini belirtmiştir. *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* türü ile yapılan başka bir çalışmada, inorganik azot içermeyen Van Waes ve Debergh ortamında çimlenme oranının %50,3 olduğu rapor edilmiştir (Özkoç, 1991). Bu raporlarla buradaki çalışmadan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, *O. sancta*'nın daha düşük oranda çimlendiği, *S. vomeracea*'nin daha yüksek oranlarda çimlendirildiği görülmektedir. Bizim çalışmamız kapsamında tohumlara uygulanan canlılık testleri, *O. sancta* ve *S. vomeracea* tohumlarının tamamının canlı olmadığını göstermiştir ve canlılık oranları göz önünde bulundurularak yapılan çimlenme oranı hesaplamalarında, çalışılan her iki türe ait canlı tohumların tamamının çimlenmediği belirlenmiştir.

Çimlenen orkide tohumları daha sonra gelişerek protokorm olarak adlandırılan yapıya dönüşürler. Protokormlar da farklılaşarak kök ve sürgün kısımlarını meydana getirirler. *In vitro* ortamda çimlenen tohumların tamamı protokorma dönüşmemekte ve bunun sonucunda yeni orkide fidelerinin oluşumu gerçekleşmemektedir. Çalışmamızda, *O. sancta* ve *S. vomeracea* türlerine ait tohumların farklı besi ortamlarında çimlendikten sonra protokorma dönüşme kabiliyetleri belirlenmiştir. Buna göre, hem *O. sancta* hem de *S. vomeracea*'de en yüksek protokorm oluşum oranı OM+ ortamında gözlenmiştir (sırasıyla %74,42 ve %75,54). Tespit edilen bu oranlar, çimlenen tohumların ne kadarının bitkiye dönüşebileceğinin göstergesidir. Yaptığımız çalışmalar göstermektedir ki, oluşan her protokorm bitkiye dönüşmese de, herhangi bir olumsuz koşul oluşmadığı sürece, her protokorm yeni bir (nadiren birden fazla) bitki oluşturma kapasitesine sahiptir. Çalışmamızda, protokormların tamamının bitkiye dönüştüğü belirlenmiştir (bulgu olarak

verilmedi). Literatürde, *O. sancta* ve *S. vomeracea*'nin protokorm oluşturma kabiliyetlerine dair herhangi bir rapora rastlanmamıştır. Ancak, farklı orkide türlerinde yapılan çalışmalar mevcuttur. Bir çalışmada, Van Waes ve Debergh ortamında çimlendirilen *D. nieschalkiorum* türünde protokorm oluşum oranının % 13,11 olduğu bildirilmiştir (Gümüş vd, 2008). Kitsaki ve arkadaşları (2004), ise *Ophrys spruneri* türünün olgun tohumlarından, hindistan cevizi sütü ile zenginleştirilmiş modifiye Malmgren temel besi ortamında, %52'lik değerle en yüksek protokorm oluşum oranını elde etmişlerdir. Oluşan protokormları taze besi ortamına aktarmışlar ve protokormların tamamının bitkiye dönüştüğünü bildirmişlerdir.

Orkidelerin doğada çimlenebilmek için mikorizal funguslarla simbiyotik ilişki kurdukları bilinmektedir. Literatürde bu simbiyotik ilişkide fungusların tohumların çimlenmesi için sitokininleri ürettikleri ve böylece tohumların çimlenebildiği belirtilmiştir (Crafts ve Miller, 1974). Çalışmamızda, *O. sancta* ve *S. vomeracea* türlerinin *in vitro* çimlendirilmesinde besi ortamının etkisinin yanı sıra sitokinin ve oksin gruplarından çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı derişimlerinin etkileri de araştırıldı. Artan ZEA, 6-BA, IBA, IAA ve 2,4-D derişimlerinin, *O. sancta* tohumlarının çimlenmesini teşvik ettiği, TDZ'nin artan derişiminin ise çimlenmeyi inhibe ettiği gözlenmiştir. *Serapias vomeracea* ile yapılan denemelerde ise ZEA, 6-BA, IBA ve IAA derişimlerinin artışının çimlenmeyi teşvik ettiği, TDZ'nin yüksek derişimlerinin çimlenme oranında azalmaya neden olduğu ve 2,4-D derişiminin artışının çimlenmeye etkisinin olmadığı belirlenmiştir. *Orchis sancta* ile yapılan denemelerde, denenen her ortamın kontrole göre olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek çimlenme oranları %81,18 ve %81,15'lik oranlar ile sırasıyla 1,0 ve 2,0 mg/L ZEA içeren ortamlarda tespit edilmiştir. *Serapias vomeracea* türünde ise, 1,0 ve 2,0 mg/L 6-BA içeren ortamların çimlenmede (sırasıyla %83,81 ve %84,03) daha etkili olduğu görülmüştür. 6-BA, IBA ve IAA'nın denenen en düşük derişimleri (0,1 mg/L) ve 2,4-D'nin 0,1; 0,25 ve 2,0 mg/L derişimleri kontrole yakın etki göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre, hem *O. sancta* hem de *S. vomeracea* tohumlarının çimlenmesi üzerinde sitokininlerin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Karasal orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine en olumlu etkiye sahip hormonların, sitokininler olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen, bitki hormonlarının çimlenme üzerindeki etkilerinin oldukça farklı olabileceği belirlenmiş, aynı bitki hormonunun bir orkide türünde olumlu etki yaparken, diğerlerinde olumsuz etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Arditti ve Harrison, 1977). Godo ve arkadaşları (2010), karasal orkidelerin *in vitro* ortamlarda çimlendirilmesinde, sitokininler

kadar olmasa da, oksinlerin de etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Sitokininlerin, absisik asidin çimlenme üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırarak, tohum çimlenmesini teşvik ettiği bildirilmiştir (Black vd., 1974). Nikolić ve arkadaşları (2007), çeşitli sitokininlerin ve sitokinin benzeri kimyasalların (TDZ) *Lotus corniculatus* L. (gazel boynuzu) türünün genç ve yaşlı tohumlarının çimlenmesi üzerine etkilerini araştırmışlar ve artan sitokinin derişimlerinin çimlenmeyi olumlu yönde etkilediğini belirtmişlerdir. Liua ve arkadaşları (2013), oksinlerin ABA'yı aktif hale getirerek tohum dormansisini kontrol ettiğini bildirmişlerdir. Bunun aksine, *Orchis coriophora* türünün *in vitro* çimlendirildiği bir çalışmada, bir oksin olan IAA'nın çimlenmeyi diğer oksinlere ve sitokininlere göre daha fazla teşvik ettiği tespit edilmiştir (Bektaş vd., 2013).

Yamazaki ve Miyoshi (2006), orkide tohumlarının çimlenme sürecinin, "çimlenme öncesi, çimlenme, protokorm, rizoid ve sürgün" aşamalarından oluştuğunu belirtmişlerdir. Çimlenme süreci sonrasında oluşan protokormlar daha sonra fideleri oluşturacak olan yapılardır. Fakat kültür ortamlarında çimlenen tohumların tamamı protokormlara dönüşmemektedir. Daha önce de belirtildiği gibi kültür ortamlarında herhangi bir olumsuzluk oluşmadığı sürece, oluşan protokormların her biri yeni bir fide oluşturmaktadır (Steaward ve Mapes, 1971). Bu bakımdan, çimlenen tohumlardan oluşan protokormların oranının belirlenmesi, çimlenen bireylerden ne kadarının fidelere dönüşeceğinin göstergesidir. Çalışmamızda, 60 gün sonundaki çimlenme oranları belirlenen *O. sancta* ve *S. vomeracea* tohumları, aynı ortamlarda gelişmelerine devam ettirilerek, ekimden 90 gün sonra protokorm oluşum oranları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *O. sancta* türünde besi ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicilerinin derişimlerinin artırılması protokorm oluşumu olumlu yönde etkilemektedir. *Serapias vomeracea* türünde ise, 2,4-D hariç diğer tüm bitki büyüme düzenleyicilerinin artan derişimlerinin pozitif etkilerinin olduğu gözlenmiştir. En yüksek protokorm oluşum oranları, *O. sancta*'da %81,06'lık değerle 2,0 mg/L ZEA içeren ortamda, *S. vomeracea*'de %89,91 ve %89,15'lik değerlerle 2,0 mg/L ZEA ve 1,0 mg/L TDZ içeren ortamlardan elde edilmiştir. 1,0 mg/L ve 2,0 mg/L 2,4-D içeren ortamların protokorm oluşumunu inhibe ettiği, elde edilen protokorm oluşum oranlarının (sırasıyla %73,55 ve %73,12) kontrolden (%75,54) daha düşük olduğu belirlenmiştir. Literatürde, besi ortamına bitki büyüme düzenleyicilerinin eklenmesinin, protokorm oluşumunu teşvik ettiğine dair rapor mevcuttur ancak kullanılan bitki büyüme düzenleyicisinin türü, derişimi ve elde edilen protokorm oluşum oranı hakkında bilgi verilmemiştir (Bektaş vd., 2013).

Temel besi ortamları bitki dokularını canlı ve sağlıklı tutacak şekilde tasarlanır. Kültüre alınan eksplantların gelişimsel programını yönlendirmek için bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duyulur. Büyüme düzenleyicileri, doku kültürü şartlarını iyileştirmek adına üzerinde en çok durulan parametredir. Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokininler önemli rol oynamaktadır. Bilindiği gibi sitokinin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokinin oranının yüksek olması kök oluşumunu, oksin ve sitokinin oranlarının eşit olması ise kallus oluşumunu desteklemektedir (Werbrouck ve Debergh, 1994). Doku kültürü çalışmalarında kullanılan oksin ve sitokinin etkileri, üzerinde çalışılan türlere göre değişmektedir. Bu çalışmada, *in vitro* ortamlarda çimlendirilen *Orchis sancta* ve *S. vomeracea* tohumlarından meydana gelen protokormlar kullanılarak fideler oluşturuldu. Fide oluşumunda, tek başlarına 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L derişimlerdeki sitokininlerin (TDZ, ZEA, KİN, 6-BA ve 2-iP) ve oksinlerin (IBA, IAA ve 2,4-D), sürgün boyu, yaprak sayısı, kök uzunluğu ve sayısı üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre sitokininlerden TDZ ve ZEA'nın, oksinlerden IBA'nın sürgün uzamasında daha etkili olduğu görülmüştür. *Orchis sancta*'da, en yüksek sürgün uzaması 53,24 mm ile sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden 0,25 mg/L TDZ içeren ortamda tespit edilmiştir. Oksinlerden 0,5 mg/L IBA içeren ortamdaki uzama miktarının (38,98 mm) en fazla olduğu belirlenmiştir. *Serapias vomeracea*'de ise sitokininlerde en yüksek sürgün uzama miktarı 42,88 mm ile 0,25 mg/L TDZ içeren ortamda, oksinlerde 31,92 mm ile 2,0 mg/L IBA içeren ortamda ölçülmüştür. Genel olarak 1,0-2,0 mg/l sitokinin çoğu sistemde yeterli olduğu ve yüksek düzeylerinin adventif sürgün oluşumunu arttırma eğiliminde olduğu, doğal oksin olan IAA ortamda çok az stabil olduğundan, sentetik oksinlerin daha çok tercih edildiği bildirilmiştir. Bunların sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan oranları 0,1-1,0 mg/L olarak belirlenmiştir (Skoog ve Miller, 1957; Werbrouck ve Debergh, 1994).

Bu çalışmada, *O. sancta* ve *S. vomeracea* sürgün boylarının uzamasında TDZ'nin düşük derişimlerinin denenen diğer bitki büyüme düzenleyicilerinin derişimlerine göre daha etkili olduğu görülmüştür. Literatürde, TDZ'nin düşük derişimlerinin (0,001-1,0 mg/L) sürgün oluşumunda daha etkili olduğu, yüksek derişimlerinin adventif sürgün ve kallus oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Chang ve Chang, 2000). TDZ'nin orkidelerde sürgün oluşumu ve çoğaltımı üzerine olumlu etkilerinin olduğu, daha önce yapılan çalışmalarda sunulmuştur (Chen ve Piluek 1995; Nayak vd. 1997; Chen vd. 2004;

De Melo Ferreira vd. 2006). TDZ'nin tek başına kullanılmasının 6-BA'ya göre daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Ernst, 1994; Chang ve Chang, 1998).

Çalışma kapsamında, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin incelendiği parametrelerden birisi de yaprak sayısındaki artıştır. Çimlenen tohumlardan meydana gelen ve yaprak ihtiva etmeyen protokormlardan, denenen ortamlardaki, 90 gün sonunda oluşan ortalama yaprak sayıları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *O. sancta*'da ortalama 3,53 adet yaprak oluşumuyla 1,0 ve 2,0 mg/L KİN içeren ortamların, *S. vomeracea* türünde ise ortalama 3,8 adet ile 2,0 mg/L IBA içeren ortamın yaprak oluşumunda daha etkili oldukları belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda, KİN'in ya da IBA'nın bitkilerde yapraklanma oluşumunu artırdığına dair herhangi bir rapora rastlanmamıştır. Ancak, sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinin genel fizyolojik etkileri arasında sürgün oluşumunun teşvik edilmesi ve yaprak absisyonunu engellemek olduğu bilinmektedir (Gaspar vd., 1996; Haberer ve Kieber, 2002). Ayrıca, 2,0 mg/L ZEA ile 0,5 mg/L IBA'nın kombine edilmesinin yaprak oluşumunu daha fazla teşvik ettiği bildirilmiştir (Cüce vd., 2013). Cüce ve arkadaşlarının raporuna benzer olarak, çalışmamızda *S. vomeracea* fideleri, sitokinlerle desteklenen ortamlarda, en fazla yaprak oluşumunu ortalama 3,36 adet ile 2,0 mg/L ZEA içeren ortamlarda göstermiştir.

Bu araştırmada, sitokin ve oksinlerin farklı derişimlerinin, *O. sancta* ve *S. vomeracea*'de kök uzunluğu ve sayısı üzerine etkileri belirlenmiştir. *Orchis sancta* ile yapılan çalışmalarda en fazla kök uzaması 31,16 mm ile 1,0 mg/L IBA ile desteklenen ortamda gözlenmiştir. *Serapias vomeracea*'de ise kök uzamasını en fazla teşvik eden ortamın 2,0 mg/L IBA içeren ortam olduğu belirlenmiştir. Bu ortamdaki kök uzama miktarı ortalama 38,08 mm olarak hesaplanmıştır. Denenen ortamlardaki kök oluşum sayılarına bakıldığında *Orchis sancta* türünde IBA'nın tüm derişimlerinden yüksek ortalamalar elde edilmiştir. En yüksek ortalama kök sayısı, 4,5 adet ile 2,0 mg/L IBA içeren ortamda hesaplanmıştır. *Serapias vomeracea* ile yapılan çalışmalarda ise en yüksek ortalama kök sayısı 5,2 adet ile 1,0 ve 2,0 mg/L IBA içeren ortamlarda tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında oksinlerin, sitokinlere göre kök uzunluğu ve sayısı parametrelerinde daha verimli sonuçlar verdiği görülmüştür. Literatürde, kök oluşumu için oksinlerin ortamda bulunması gerektiği ve oksinlerin kök oluşumunu teşvik ettiği ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Bhojwani ve Razdan, 1983; Preece ve Sutter, 1991; Mansuroğlu ve Gürel, 2001; Aktar vd., 2007; Diaz ve Álvarez, 2009).

Artan IAA ve IBA derişiminin köklenmeyi ve kök uzunluğunu artırdığı rapor edilmiştir (Diaz ve Álvarez, 2009). Yapılan bir çalışmada, IBA'nın farklı derişimlerinin *Dendrobium Sw.* orkidesinin köklenmesi üzerine etkileri araştırılmış ve denenen bütün derişimlerin incelenen parametrelerde kontrole göre olumlu etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Kök uzunluğu, kök sayısı bakımından en etkili derişimin 1,0 mg/L olduğu bildirilmiştir (Aktar vd., 2007). Prasad ve arkadaşlarının (2004) çalışmalarında farklı derişimlerde oksin; IAA, IBA ve NAA ve kombinasyonlarını içeren MS ortamında köklendirilmeye alınan *Cryptolepis buchanani* Roem&Shult'ın sürgünlerinin % 80'i 1,0 mg/L IBA içeren MS ortamında köklendiği bildirilmiştir. Hossain ve arkadaşları (2003), *Zyziphus jujuba* türünde IAA, IBA ve NAA'nın kök oluşumuna etkilerini araştırmışlar ve en iyi sonucu 1,0 mg/L IBA içeren ortamdan elde ettiklerini bildirmişlerdir. Verilen bu raporlar, bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.

Araştırmamızda, oksin ve sitokininlerin sürgün oluşumuna etkileri, 16/8 aydınlık/karanlık fotoperiyot rejime ayarlanmış inkübasyon koşullarında kültüre alınan örneklerden belirlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer olarak, 16/8 aydınlık/karanlık rejimin sürgün oluşumunda diğer rejimlere göre daha uygun olduğu ve meydana gelen sürgünlerin daha uzun, köklerin sayı olarak fazla olduğu bildirilmiştir (Dutra vd., 2008).

Ilıman kuşak veya karasal orkidelerin toprakaltı organları; tuber (kök tuberi), kök ve rizom olarak farklılık göstermektedir. Tuberler genellikle iki tane olup bunlar birbirine yapışık durumdadır. Birisi yetiştiği yıla ait olan genç tuber, diğeri ise bir önceki yıla ait tuberdir (Şekil 1). Eski tuberdeki mevcut depo maddeleri geliştirmekte olan bitki tarafından kullanılır. Orkidelerin tuberleri, gelecek yıl yeni bitkinin oluşması (vejetatif çoğalma) için gereklidir (Sezik, 1984).

Ayrıca bazı orkide tuberlerinden ekonomik öneme sahip, salep hammaddesi elde edilmektedir. Salebin etken maddesi orkidelerin tuberlerinde depoladıkları glukomannanlardır. Glukomannan su, ayran ya da süt içerisinde şişer ve viskoz bir çözelti meydana getirirler. Salebin kalitesi elde edildiği türe göre değişmektedir ve ortalama % 40 civarı ya da üzerinde glukomannan içeren türlerden kaliteli salep elde edilir (Sezik, 1984).

Oksin ve sitokininlerin sürgün oluşumuna etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda incelenen parametrelerden bir tanesi de, türlerin tuber oluşturma oranlarının belirlenmesi olmuştur. Çalışılan iki türün tuberlerinin oluşması için gereken sürelerin farklı olduğu görülmüştür. *Orchis sancta*'nın 6 aylık fidelerden, *S. vomeracea*'nin ise 11 aylık fidelerden tuber oluşum oranları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *O. sancta*'da en yüksek



tuber oluşum oranı %66,95 ve %67,50 değerleri ile sırasıyla 1,0 ve 2,0 mg/L ZEA içeren ortamlarda tespit edilmiştir. *Serapias vomeracea* türünde ise en yüksek tuber oluşum oranı %57,3'lük değerle 2,0 mg/L ZEA içeren ortamda gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, ZEA, özellikle 1,0 ve 2,0 mg/L derişimleri, *O. sancta* ve *S. vomeracea*'nin tuberlerinin oluşumunda diğer denenen bitki büyüme düzenleyicilerine göre daha etkilidir. Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak, Pedroso ve Pais (1992), MS ortamında *Orchis papilionacea* L. türünde tuber (minituber) oluşumunu araştırmış ve sonuç olarak ortama eklenen ZEA'nın, tuber oluşumunda en etkili bitki büyüme düzenleyicisi olduğunu belirlemişlerdir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlardan, tuber oluşumunda, sitokinilerin (özellikle ZEA ve TDZ) oksinlerden daha verimli olduğu görülmüştür. Sitokininlerden 6-BA'nın (2,0 mg/L derişimi hariç) *O. sancta*'nın tuberlerinin oluşmasında, 2-iP'nin de (2,0 mg/L derişimi hariç) *S. vomeracea*'nin tuberlerinin oluşmasında etkisiz kaldığı gözlenmiştir. Literatürde de sitokinilerin ve giberellinlerin tuber oluşumunu düzenleyen en önemli kimyasallar olduğuna dair bilgiler mevcuttur (Jackson, 1999; Sarkar, 2008). Giberellinlerin tuber oluşumunu inhibe ettiği, sitokininlerin ise hücre bölünmesini tetikleyerek tuber oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir (Vreugdenhil ve Sergeeva, 1999; Fernie ve Willmitzer, 2001).

Çalışılan her iki türe ait fidelerin 2,4-D'nin farklı derişimlerini içeren ortamların hiçbirinde tuber oluşturmadığı gözlenmiştir. Sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, yaprak ve kök sayısı gibi incelenen parametrelerden elde edilen sonuçlara bakıldığında, 2,4-D içeren ortamlardaki verilerin düşük değerlerde, hatta bazen kontrolden de düşük olduğu görülmektedir. Depo organı olan tuberlerinin oluşması ya da tuberlerde depo maddelerinin birikmesi, bitkinin yeşil kısımlarında fotosentez sonucu meydana metabolitlere bağlıdır. Fonnesbech (1972), *Cymbidium* orkidelerinde yaptığı çalışma sonucunda, klorofil sentezine zarar verdiği ve anormal büyüme sonuçları verdiği için 2,4-D'nin kullanılmasının uygun olmadığını belirtmiştir.

Chang ve Chang (2000), *Cymbidium sinense* (And.) Willd. türünde TDZ'nin rizom oluşumuna etkisini araştırmış ve düşük derişimlerde ortama eklenen TDZ'nin rizom oluşumunu teşvik ettiğini, yüksek derişimlerin ise eksplantı sürgün oluşumuna yönlendirdiğini belirlemişlerdir. Yüksek sitokinin aktivitesinden dolayı TDZ'nin düşük derişimlerinin kullanılmasının daha olumlu etkilerinin olacağı ya da bir oksinle kombine edilerek kullanılmasının gerektiği bildirilmiştir (Huetteman ve Preece, 1993). Ayrıca, BA

ile desteklenen besi ortamların orkidelerde rizom oluşumunu teşvik ettiğine dair bilgi mevcuttur (Paek ve Yeung, 1991).

Oksinlerin de orkidelerde rizomların oluşumunu teşvik ettiğine dair çalışmalar mevcuttur. *Cymbidium densiflorum* Griff. (Shimasaki ve Uemoto, 1990) ve *Cymbidium forrestii* (Paek ve Yeung, 1991) türlerinde, oksinlerin, bu türlere ait rizomların oluşmasını ve dallanmasını teşvik ettiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda, tuber oluşumu gerçekleşen ortamlardan elde edilen tuberlerin ihtiva ettikleri glukomannan miktarları belirlemiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı derişimleriyle desteklenen ortamlardan elde edilen tuberlerin, glukomannan içerikleri farklılık göstermiştir. *O. sancta*'da en yüksek glukomannan miktarı %28,0 ile 2,0 mg/L ZEA içeren ortamda oluşan tuberlerden, *S. vomeracea*'de en yüksek glukomannan miktarı %44,6 ile 2,0 mg/L ZEA içeren ortamda oluşan tuberlerden elde edilmiştir. 0,25 mg/L TDZ, 1,0 ve 2,0 mg/L ZEA ve 0,25 ve 0,5 mg/L KİN ile desteklenen ortamlarda oluşan *O. sancta* fidelerinden elde edilen tuberler ile 0,25 ve 0,5 mg/L TDZ ve 1,0 ve 2,0 mg/L ZEA ile desteklenen ortamlarda oluşan *S. vomeracea* fidelerinden elde edilen tuberlerin içerdiği glukomannan miktarları, doğal ortamlardan alınan örneklerin glukomannan miktarlarından daha yüksek bulunmuştur.

Farklı bitkilerin glukomannan içeriklerinin belirlendiği çalışmalar literatürde mevcuttur (Chua, vd., 2012; Tekinşen ve Güner, 2010; Farhoosh ve Riazi, 2007; Sezik, 1967). Çalışmamız kapsamında değerlendirdiğimiz *O. sancta* ve *S. vomeracea* türlerini de içine alan salep orkidelerinin, glukomannan içeriklerinin belirlenmesiyle ilgili tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmada, Türkiye'de doğal olarak yetişen 10 farklı salep orkidesinin glukomannan içerikleri belirlenmiş, *S. vomeracea* ssp. *orientalis*'in glukomannan içeriğini %44,8 olarak tespit etmişlerdir (Tekinşen ve Güner, 2010). *Orchis sancta* tuberlerinin %15 civarında glukomannan içerdiği bilinmektedir (Sezik, 1967).

Chua ve arkadaşları (2012), *Amorphophallus konjac* (konja bitkisi) bitkisinin tuberlerindeki glukomannan miktarını 3 farklı yöntemle belirleyerek, yöntemlerin karşılaştırmasını yapmışlardır. Sonuç olarak ta 3,5-DNS yönteminin ve fenol-sülfürik asit yönteminin glukomannan içeriklerinin belirlenmesinde daha verimli olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da glukomannan içerikleri fenol sülfürik asit yöntemiyle belirlenmiştir ve literatürde daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu yöntemle, *O. sancta*'nın doğal ortamlarda yetişen örneklerindeki glukomannan miktarı %21,1, *S. vomeracea*'nin doğal ortamlarda yetişen

örneklerindeki glukomannan miktarı %37,4 olarak belirlenmiştir. Bu veriler, Tekinşen ve Güner (2010)'in ve Farhoosh ve Riazi (2007)'nin raporlarıyla benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda, sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyicileriyle (özellikle ZEA ve TDZ) desteklenen ortamlarda oluşan tuberlerin içerdikleri glukomannan miktarlarının yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu duruma sitokininlerin tuber oluşumundaki olumlu etkileri bilinmektedir (Jackson, 1999; Vreugdenhil ve Sergeeva, 1999; Chang ve Chang, 2000; Fernie ve Willmitzer, 2001; Sarkar, 2008). Çalışmamızda, yüksek glukomannan miktarlarını tespit ettiğimiz ortamlarda, oluşan tuberlerin daha olgun olduğu ve bunun sonucunda da glukomannan miktarının yüksek çıktığı düşünülmektedir. Glukomannan miktarlarının yüksek olduğu ortamlardaki, sürgün oluşum parametreleri sonuçlarına bakıldığında, yapraklanma ve sürgün uzunluklarının yüksek olduğu görülmektedir. Yapraklanmanın ve sürgün uzunluğunun düşük değerlerde olduğu ortamlardaki tuber oluşum oranının ve tuberlerin içerdikleri glukomannan miktarlarının düşük olduğu görülmektedir. Bitkinin yeşil kısımlarını oluşturan bu parametrelerin yüksek oluşunun, daha fazla fotosentez ürününün ortaya çıkmasını ve dolayısıyla depo maddelerinin daha fazla ve daha hızlı bir şekilde üretilmesini ve sonuç olarak tuberin daha erken olgunlaşmasını sağladığı düşünülmektedir. Oksinlerle desteklenen bazı ortamlarda da bu parametreler yüksek çıkmış fakat tuber oluşumundan ziyade daha fazla sayıda ve uzunlukta köklerin oluşumuna neden olmuştur. Bu ortamlarda oluşan fotosentez ürünlerinin, kök oluşumu için gereken enerjinin sağlanmasında kullanılabileceği akla gelmektedir.

Tuberlerinin ekonomik değer taşıması nedeniyle, doğadan bilinçsiz ve kontrolsüz sökülen salep orkidelerinin sayıları giderek azalmakta ve hatta bazılarının soyu tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan türler arasındadır. Bu türlerin tarımının yapılmasının kolay olmadığı göz önünde bulundurulunca, akla ilk olarak bitki biyoteknolojisi yöntemleriyle üretim gelmektedir. Son yıllarda, sentetik tohum üretim teknolojisinin gelişmesi, birçok tarım ve süs bitkisinin üretiminde alternatif ve etkili bir yol olarak düşünülmektedir (Redenbaugh vd., 1988). Orkidelerin sentetik tohumları protokorm benzeri yapıların (PBY) alginat ile kaplanması ile oluşturulur. Protokorm benzeri yapılar sürgün ve kök oluşturma kabiliyetine sahip birçok meristematik hücre merkezinin birleşiminden oluşan yapılardır (Da Silva vd., 2000).

Çalışmamızda, *O. sancta* ve *S. vomeracea* sentetik tohumlarının üretiminde kullanılacak olan PBY'ler, tek başına TDZ (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 mg/L) ya da aynı

derişimlerin 1,0 mg/L IBA ile kombinasyonuyla desteklenen ortamlarda oluşturulmuştur. TDZ'nin, orkidelerin rejenerasyonundaki olumlu etkileri bildirilmiştir (Ernst, 1994; Chen ve Piluek, 1995; Nayak vd., 1997; Chang ve Chang, 1998). Literatürde, TDZ'nin bazı orkide türlerinin PLB'lerinin oluşturulmasındaki etkilerinin (teşvik edici) araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur (Gray vd., 1992; Chen ve Chang, 2000; Da Silva vd., 2000; Lin, 2000; Park vd., 2003; Singh vd., 2003; Roy vd., 2007). Singh ve arkadaşları (2003), *Cajanus cajan* türünde, TDZ'nin düşük derişimlerinin çoklu sürgün oluşumunu teşvik ettiğini, yüksek derişimlerinin ise somatik embriyogenezi teşvik ettiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda, her iki tür içinde geçerli olmak üzere, denen tüm ortamlarda PBY oluşumu gözlenmiştir. Ancak, farklı ortamlardan alınan % PBY oluşumu ve eksplant başına oluşan PBY miktarları farklılık göstermektedir. *Orchis sancta* protokormlarından en yüksek PBY oluşumu 1,0 ve 2,0 mg/L TDZ ile 1,0 mg/L IBA içeren ortamlarda gözlenmiştir. Bu ortamlara aktarılan protokormların tamamında (%100) PBY oluşumu gözlenmiştir. Eksplant başına oluşan en yüksek PBY miktarı ise 12,0 adet ile 2,0 mg/L TDZ ve 1,0 mg/L IBA içeren ortamda tespit edilmiştir. *Serapias vomeracea* ile yapılan denemelerde ise, 1,0 mg/L IBA ile 0,5 ve 2,0 mg/L TDZ içeren ortamlardaki %PBY oluşumunun (%96) en yüksek değerler olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında TDZ derişimlerinin 1,0 mg/L IBA ile desteklenmesi, hem PBY oluşuma hem de eksplant başına oluşan PBY miktarına olumlu etki göstermiştir. Chen ve Chang (2000), *Oncidium Sw.* orkidelerinde TDZ'nin NAA ile kombinasyonunun kullanılmasının somatik embriyo oluşumunu artırdığını rapor etmişlerdir. BA, KİN, 2-iP ve TDZ'nin, 2,4-D ile kombine edildiği ortamlardaki somatik embriyo oluşumunun karşılaştırıldığı bir çalışmada, TDZ'nin 2,4-D ile kombinasyonun diğer bitki büyüme düzenleyicileriyle yapılan kombinasyonlara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (Gray vd., 1992). Cui ve arkadaşları (2008), tek başına 9,08 ve 13,62 mikromolar derişimlerdeki TDZ'nin ya da NAA ve 2,4-D ile kombinasyonlarının, *Syngonium podophyllum* türünde PBY oluşumunu artırdığını tespit etmişlerdir. Verilen literatür bilgilerinde de görüldüğü gibi oksin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden en sık kullanılan bitki büyüme düzenleyicisinin 2,4-D olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda, sürgün oluşumu çalışmalarında, 2,4-D'nin incelenen parametreler üzerinde genelde etkisiz (bazen inhibe edici) etkisi görülmüştür. Bu yüzden 2,4-D yerine daha olumlu etkiler gösteren IBA kullanılmıştır.

TDZ'nin tek başına kullanılmasının kallus oluşumunu engellediği, oksinle kombine edildiğinde kallus oluşumunun teşvik edildiği bildirilmiştir. TDZ'nin 2,4-D ile kombinasyonunun kallus oluşumunu artırdığı bildirilmiştir (Lin vd., 2000). *In vitro* kültürlerde protokorm benzeri yapılar kallus bağımlı ya da doğrudan oluşabilmektedirler. PBY'lerin kallus aşamasını geçirmeksizin doğrudan protokormlardan oluşması genetik stabilitenin korunması bakımından önemlidir (Lee ve Philips, 1988). Bizim çalışmamızda da bu rapora benzer olarak PBY'ler doğrudan protokormlardan oluşturulmuştur. Dolaylı yoldan (kallus üzerinden) PBY oluşturma çalışmaları denenmiş fakat oluşan kallus yapılarının altkültür yapıldıktan sonra kararlılıklarını yitirmeleri nedeniyle başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Ayrıca, yapılan literatür taramalarında salep orkidelerinin (*Orchis*, *Serapias*, *Dactylorhiza*, *Ophrys*.. vb. cinsleri) PBY'lerinin oluşturulmasıyla ilgili rapora rastlanmamıştır. Bu bakımdan yapılan bu çalışma, *O.sancta* ve *S. vomeracea* türlerinin PBY'lerinin oluşturulması konusunda ilk bulgular olarak değerlendirilebilir.

*Orchis sancta* ve *S. vomeracea*'nin sentetik tohumları, oluşturulan PBY'lerin, Orchimax besi ortamının içerikleri (CaCl<sub>2</sub> hariç) ile desteklenen ve 2,0 mg/L ZEA ve 1,0 mg/L IBA içeren, %3'lük sodyum alginat ile kaplanıp ve 75 mM CaCl<sub>2</sub> içerisinde katılaştırılmasıyla oluşturuldu. Literatürden elde edilen bilgilerden, sentetik tohumların oluşturulmasında, kaplama matriksinin hazırlanmasında kullanılan sodyum alginat ve CaCl<sub>2</sub> miktarlarının, sırasıyla %3-4 ve 75 ve 100 mM olduğu bildirilmiştir (Rao ve Singh, 1991; Buyukalaca vd., 1995; Saiprasad ve Polisetty, 2003; Aquea vd., 2008; Daud vd., 2008; Geetha vd., 2009; Sarmah vd., 2010; Nor Asmah vd., 2011). Verilen bu değerlerde hazırlanan kaplama matriksi, sentetik tohumun daha yüksek oranlarda ve daha erken çimlenmesini sağlamaktadır (Saiprasad ve Polisetty, 2003). Yüksek oranlarda (%5-7) sodyum alginat kullanılarak kaplanan sentetik tohumların çok viskoz olduğu ve sürgün ve bu nedenle kök oluşumunu engellediği belirlenmiştir (Rao ve Singh, 1991; Ghosh ve Sen, 1994; Timbert vd., 1995). Ayrıca, Onishi ve arkadaşları (1994), viskoz kaplama matriksinin oksijen alınımını engellediğini ve sonuç olarak embriyonun büyümesini engellediğini rapor etmişlerdir.

Oluşturulan sentetik tohumların, besi ortamlarındaki ve toprak koşullarındaki çimlenme kabiliyetlerine bakıldığında, *O. sancta* sentetik tohumlarının besi ortamında %81'inin çimlendiği ve çimlenen tüm örneklerin fideye dönüştüğü belirlenmiştir. Sterilize torf ortamında ise %69'unun çimlendiği ve çimlenen örneklerin %63'ünün fideye dönüştüğü gözlenmiştir. *Serapias vomeracea* sentetik tohumlarının ise besi ortamında

%80'inin, sterilize torf ortamında %75'inin çimlendiği belirlenmiştir. Besi ortamlarında ve sterilize torf ortamlarında çimlenen sentetik tohumların fideye dönüşme oranları sırasıyla %100 ve %60 olarak tespit edilmiştir. Sterilize edilmeyen torf ortamlarında, *O. sancta* ve *S. vomeracea* sentetik tohumları fungal kontaminasyon sonucunda canlılıklarını yitirmişlerdir. *Orchis sancta* ve *S. vomeracea*'nin PBY'lerinden oluşturulan sentetik tohumların, doğal olarak yetişen ve araştırmamızda *in vitro* koşullarda çimlendirilen zigotik embriyolardan (doğal tohumlardan) daha yüksek oranlarda çimlendiği gözlenmiştir. Sürgün oluşturma çalışmalarında gözlemlenen protokormların tamamının fidelere dönüşmesine benzer olarak besi ortamlarında çimlendirilen *O. sancta* ve *S. vomeracea*'nin sentetik tohumlarının tamamının fidelere dönüştüğü görülmüştür. Sterilize torf ortamında ise çimlenen sentetik tohumların bir kısmının fide oluşum aşamasına geçemediği gözlenmiştir. Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak Saiprasad ve Polisetty (2003), *Dendrobium*, *Oncidium* ve *Cattleya* orkidelerinin sentetik tohumlarının MS ortamında tamamının çimlendiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı çalışmada, 3 türe ait sentetik tohumları, tek başına odun kömürü parçalarını ya da odun kömürü parçalarıyla briket parçalarını aynı anda içeren saksılarda tamamının çimlendirmişlerdir. Yine benzer bir çalışmada, *Pinus radiata*'ya ait sentetik tohumların besi ortamında %73'ünün çimlendiği, çimlenen bu örneklerin de %66'sının fidelere dönüştüğü bildirilmiştir (Aquea vd., 2008).

*In vitro* koşullarda üretilen fidelerin dış koşullara aktarılmasında iki farklı yol izlenmiştir. Denem I'de, toprak koşullarına aktarılan *O. sancta* ve *S. vomeracea* fidelerinin tamamı canlılıklarını kaybetmişlerdir. Deneme II'den *in vitro* koşullarda yetiştirilen *O. sancta* ve *S. vomeracea* fidelerinin, dış koşullara aktarılması çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sterilize torf ortamında, aşamalı olarak adaptasyon çalışmaları bu türler için uygun aklimatizasyon yöntemi olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasından elde edilen sonuçlara bakıldığında, *O. sancta*'nın fidelerinin %87'sinin, *S. vomeracea*'nin fidelerinin %91'inin dış koşullarda gelişimlerine devam ettikleri belirlenmiştir. Bongers (1993), *in vitro*'da üretilen orkide fidelerinin dış koşullara aktarılması sırasında kayıpların fazla olduğunu bildirmiştir. Besi ortamlarından alınan fidelerin, antifungallerle muamele edilmesinin, olası fungal kontaminasyonları engelleyebileceğini belirtmiştir. Bu raporun aksine, bizim çalışmamızın Deneme I basamağında, fideler antifungallerle muamele edilerek toprak koşullarına aktarılmış fakat başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Deneme

II'de ise kullanılacak toprağın sterilize edilmesiyle fungal kontaminasyonlar engellenmiş ve böylelikle fideler yeni ortamlarına daha kolay adapte olmuşlardır.

Çağlayan ve arkadaşları (1998), *in vitro* koşullarda ürettikleri *O. anatolica* ve *O. coriophora* fidelerini torf ortamına aktarmışlar ve 10 hafta sonundaki canlılık oranlarını %20 olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda sterilize edilen torf ortamına aktarılan fidelerin 10 hafta sonundaki canlılık oranlarının Çağlayan ve arkadaşlarının (1998) elde ettikleri oranlardan çok yüksektir. Kishor ve arkadaşları (2006), 2:1 oranlarında Briket parçaları:Kömür ve aynı zamanda ortamın su tutma kapasitesini artırmak için yosun içeren ortamlara aktarılan, *in vitro* ortamlarda üretilen orkide fidelerinin %80'inin yaşamlarına devam ettiklerini belirlemişlerdir.

Özkaynak ve Samancı (2005), aklimatizasyon çalışmalarında başarıyı artırmak için, fideler henüz *in vitro* ortamda iken; ortama CO<sub>2</sub> ilavesi, havalandırılmalı kültür kabı kullanımı, şekersiz besi ortamı kullanımı, ışık şiddetinin artırılması, soğutma gibi uygulamaların yapılması gerektiğini rapor etmiştir. Ayrıca, *ex vitro* aşamada da, ortam şartlarının bilgisayarlı sistemlerle kontrolü, koruyucu maddelerin kullanılması, farklı ışık ve CO<sub>2</sub> yoğunlukları gibi uygulamaların kullanılabilmesini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, *in vitro* koşullarda yetişen *O. sancta* ve *S. vomeracea* fidelerinin toprak koşullarına adaptasyonu başarıyla sağlanmıştır. Ancak, bu adaptasyonun başlangıç aşamasında yer alan sterilize toprak koşullarının oluşturulmasının, büyük çaplı üretimlerde (özellikle tarım alanlarında) uygulanabilirliğinin zor olduğu gözükmektedir. Bu nedenle, Özkaynak ve Samancı (2005)'nin belirttiği gibi bilgisayar kontrollü (nem, sıcaklık ve ışık şiddetinin kontrolü) ve özellikle koruyucu maddelerin kullanıldığı *ex vitro* sistemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

## 5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, *O. sancta* ve *S. vomeracea* türlerinin *in vitro* koşullarda üretimi, *in vitro*'da oluşan tuberlerinin ihtiva ettiği glukomannan miktarlarının belirlenmesi ve fidelerin dış koşullara adaptasyonu, sentetik tohumlarının üretimi ve çimlendirilmeleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bizim çalışmamız, *O. sancta* ve *S. vomeracea* türlerine bitki biyoteknolojisi yöntemlerinin uygulandığı en kapsamlı çalışmadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların özetleri aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- Yapılan yüzey sterilizasyon yöntemi denemelerinden, *O. sancta* ve *S. vomeracea* tohumlarının %10'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edilmesinin en etkili yüzey sterilizasyonu yöntemi olduğu belirlenmiştir.
- *Orchis sancta* ve *S. vomeracea* tohumlarının çimlenmesinde ve protokormlarının oluşturulmasında en etkili besi ortamının Orchimax Aktif Kömürlü Ortam (OM+) olduğu belirlenmiştir.
- Artan ZEA, 6-BA, IBA, IAA ve 2,4-D derişimlerinin, *O. sancta*'nın olgun tohumlarının çimlenmesini teşvik ettiği, TDZ'nin artan derişiminin ise çimlenmeyi inhibe ettiği gözlenmiştir.
- *Serapias vomeracea* ile yapılan denemelerde ise ZEA, 6-BA, IBA ve IAA derişimlerinin artışının çimlenmeyi teşvik ettiği, TDZ'nin yüksek derişimlerinin çimlenme yüzdesinde azalmaya neden olduğu ve 2,4-D derişiminin artışının çimlenmeye etkisinin olmadığı belirlenmiştir.
- *Orchis sancta*'da besi ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicilerinin derişimlerinin artırılması protokorm oluşumu olumlu yönde etkilemektedir.
- *Serapias vomeracea*'de, 2,4-D hariç diğer tüm bitki büyüme düzenleyicilerinin artan derişimlerinin protokorm oluşturma yüzdelere pozitif etkilerinin olduğu gözlenmiştir.
- Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre sitokininlerden TDZ ve ZEA'nın, oksinlerden IBA'nın sürgün uzamasında daha etkili olduğu belirlenmiştir.
- *Orchis sancta* ve *S. vomeracea*'de en yüksek sürgün uzaması 0,25 mg/L TDZ içeren ortamlardan elde edilmiştir.
- *Orchis sancta*'da 1,0 ve 2,0 mg/L KİN içeren ortamlarının, *S. vomeracea*'de 2,0 mg/L IBA içeren ortamların yaprak oluşumunda daha etkili oldukları belirlenmiştir.



- *Orchis sancta* ile yapılan çalışmalarda en fazla kök uzaması 1,0 mg/L IBA ile desteklenen ortamda, *S. vomeracea*'de ise 2,0 mg/L IBA içeren ortamda belirlenmiştir.
- En yüksek kök oluşum sayıları *O. sancta*'da 2,0 mg/L IBA içeren ortamda, *S. vomeracea*'de ise 1,0 ve 2,0 mg/L IBA içeren ortamlarda olduğu tespit edilmiştir.
- Her iki türün tuberlerinin oluşması için gereken sürelerin farklı olduğu görülmüştür.
- Her iki türde de en yüksek tuber oluşum oranları 2,0 mg/L ZEA içeren ortamda tespit edilmiştir.
- Her iki türde de 2,4-D'nin farklı derişimlerini içeren ortamların tuber oluşumunda etkili olmadığı belirlenmiştir.
- Özellikle ZEA ve TDZ desteklenen ortamlarda oluşan tuberlerin içerdikleri glukomannan miktarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.
- *Orchis sancta* protokormlarından en yüksek PBY oluşumu 1,0 ve 2,0 mg/L TDZ ile 1,0 mg/L IBA içeren ortamlarda gözlenmiştir. Eksplant başına oluşan en yüksek PBY miktarı ise 2,0 mg/L TDZ ve 1,0 mg/L IBA içeren ortamda tespit edilmiştir. *Serapias vomeracea* ile yapılan denemelerde ise, 1,0 mg/L IBA ile 0,5 ve 2,0 mg/L TDZ içeren ortamlardaki %PBY oluşumunun en yüksek değerler olduğu belirlenmiştir.
- *O. sancta* sentetik tohumlarının besi ortamında %81'i, *S. vomeracea* sentetik tohumlarının ise %80'i çimlenmiştir ve çimlenen tüm örneklerin fideye dönüştüğü belirlenmiştir.
- *O. sancta* sentetik tohumlarının sterilize torf ortamında ise %69'unun çimlendiği ve çimlenen örneklerin %63'ünün fideye dönüştüğü gözlenmiştir. *Serapias vomeracea*'de ise %75'inin çimlendiği ve %60'ının fideye dönüştüğü tespit edilmiştir.
- Sterilize edilmeyen torf ortamlarında, *O. sancta* ve *S. vomeracea* sentetik tohumları fungal kontaminasyon sonucunda canlılıklarını yitirmişlerdir.
- Sterilize torf ortamında (Deneme II), aşamalı olarak yapılan adaptasyon çalışmaları bu türler için uygun aklimatizasyon yöntemi olarak belirlenmiştir.

## 6. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, *O. sancta* ve *S. vomeracea* olgun tohumları asimbiyotik olarak *in vitro* koşullarda başarıyla çimlendirilmiştir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda, bu türlere ait tohumlar *in vitro* simbiyotik çimlendirilebilir. Ayrıca çalışmada eksplant olarak kullanılan olgun tohumların yerine olgunlaşmamış tohumların çimlenme kabiliyetleri, farklı fotoperiyodik rejimlerdeki ve inorganik azot ve organik azot bakımından farklı içeriklere sahip yeni besi ortamlarındaki olgun ve olgunlaşmamış tohumların çimlenme kabiliyetleri de araştırılabilir. Yapılacak olan bu çalışmalardan elde edilecek sonuçlar ile bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, bu türlerin optimum koşullarda çimlendirilme protokolleri oluşturulabilir.

*Orchis sancta* ve *S. vomeracea* bitkilerinin çeşitli kısımlarından alınan eksplantlardan (tuber, protokorm, yaprak, kök gibi) kallus kültürleri oluşturulabilir ve bu kallus kültürleri üzerinden dolayı organogenezle çok sayıda fide oluşturma çalışmaları denenebilir. Ayrıca, özellikle protokorm ve tuberlerden oluşturulacak kallus kültürlerinden elde edilecek ürünlerin glukomannan içerikleri belirlenebilir, verimli sonuçlar alınması halinde tam bir bitki üretimi olmaksızın salep üretimi gerçekleştirilebilir.

*In vitro* koşullarda üretilen ve toprak koşullarına adapte edilen *O. sancta* ve *S. vomeracea* fidelerinin kitlesel üretimi yapılabilir, sera ya da tarla koşullarına aktarılabilir ve bu ortamlarda üretimleri gerçekleştirilebilir. Ekolojik tahribata neden olan salep orkidelerinin doğadan sökümü yerine kurulacak bir sanayi kuruluşunda ya da büyük ölçekli laboratuvarlarda bu türlerin ya da ürünlerinin kitlesel üretimi gerçekleştirilebilir.

Doğal ortamlarındaki sayıları gittikçe azalan türlerden olan *O. sancta* ve *S. vomeracea*'nin doğal habitatlarındaki sayılarını artırmak için *in vitro* ortamlarda üretilen fideleri, sentetik tohumları ya da tuberleri uygun şartlar oluşturularak bu ortamlara aktarılabilir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan birçok salep orkidesinin *in vitro* koşullarda fidelerinin ve sentetik tohumlarının üretimi ve toprak koşullarına adaptasyonu gerçekleştirilebilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Aka-Kacar, Y., Yılmaz, N., 2001. Yalcın-Mendi, Y., Kuden, A. ve Cetiner, S., *In vitro* Besi Ortamında Kullanılan Değişik Katılaştırıcı Maddelerinin ve Farklı pH Düzeylerinin Bazı Kiraz (*Prunus avium* L.) Anaçlarının Çoğaltılması Üzerine Etkileri. I. Sert Çekirdekli Meyveler Sempozyumu, Yalova, Bildiriler Kitabı 161-166.
- Akgül, A., 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:15, s. 446, Damla Matbaacılık, Konya.
- Aktar, S., Nasiruddin, K. M. ve Huq, H., 2007. *In Vitro* Root Formation in *Dendrobium* Orchid Plantlets with IBA., Journal of Agriculture and Rural Development, 5, 48-51.
- Andersen, F. T. ve Rasmussen, H. N., 1996. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. and Dijst, G. (eds.), *Rhizoctonia* species, Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Patology, and Disease Control. 379-390, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Anderson, A. B., 1996. The reintroduction of *Platanthera ciliaris* in Canada. In: Allen, C. (eds.), North American native terrestrial orchids propagation and production. North American Native Terrestrial Orchid Conference. Germantown, Maryland, 73-76.
- Andronova, E. V. ve Ivashenko, Z. V., 2007. Viability of different plant offsprings of *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae) after transfer from *in vitro* culture to nature, Botanicheskii Zhurnal, 92, 10, 1544-1554.
- Aquea, F., Poupin, M. J., Matus, J. T., Gebauer, M., Medina, C. ve Arce-Johnson, P., 2008. Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiata*, Biotechnology Letters, 30, 1847-1852.
- Arditti, J. ve Ghani, A. K., 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications, New Phytologist, 145, 367-421.
- Arditti, J. ve Harrison, C. R., 1977. Vitamin requirements and metabolism in orchids. In: Arditti, J. (eds.), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. Cornell Univ. Press, New York, 157-175.
- Arditti, J., 1967. Factors affecting of orchid seeds, Botanical Review, 33, 1-97.
- Arditti, J., 1979. Aspects of the physiology of orchids. In: Woolhouse H. W. (eds.), *Advances in Botanical Research*. 7, Academic Pres, New York, 422-697.
- Arditti, J., Michaud, D. ve Olivia, A. P., 1981. Seed Germination of North American Orchids. I. Native California and Related Species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera*, Botanical Gazette, 142, 4, 442-453.

- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M. A., 2001. Doku Kültürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.), Bitki Biyoteknolojisi I - Doku Kültürü ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 262-281.
- Bailes, C., Clements, M., Cribb, P. J. ve Muir, H., 1986. The cultivation of European orchids, Kew Magazine, 3, 8-13.
- Bektaş, E., Cüce, M. ve Sökmen, A., 2013. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey, Turkish Journal of Botany, 37, 336-342.
- Bhojwani, S. S. ve Razdan, M. K., 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. 502, Elsevier Science Pub. Co., Amsterdam.
- Bin, L., Yongcheng, M. ve Bijun, X., 2002. Study on HPLC determination of konjac glucomannan in konjac flour, Science and Technology of Food Industry, 28, 82-84.
- Black, M., Bewley, J. D. ve Fountain, D., 1974. Lettuce seed germination and cytokinins: their entry and formation, Planta, 117, 2, 145-152.
- Bongers, W., 1993. Überführung asymbiotisch vermehrter terrestrischer Orchideen in "natürliche" Kultursubstrate, Erschienen in Die Orchidee, 44, 6, 302-304.
- Bournman, C. H., 1994. Micropropagation and Somatic embryogenesis. In: Hayward, M.D., Bosemark, N.O. and Romgaso, I. (eds.), Plant Breeding; Principles and Prospects. Chapman and Hall, London, 246-260.
- Buyukalaca, S., Mavituna, F. ve Gomez-Guillamon, M. L., 1995. Artificial seeds of pepper somatic embryos, Acta Horticulturae, 412, 106-110.
- Chang, C. ve Chang, W.C., 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*, Plant Cell Reports, 17, 251-255.
- Chen, J. T ve Chang, W. C., 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae), Plant Science, 160, 2160, 87-93.
- Chen, T. Y., Chen, J. T. ve Chang, W. C., 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 76, 11-15.
- Chen, Y. ve Piluek, C., 1995. Effects of thidiazuron and N, 6-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis*, Plant Growth Regulation. 16, 99-101.
- Chua, M., Chan, K., Hocking, T. J., Williams, P. A., Perry, C. J. ve Baldwin, T. C., 2012. Methodologies for the extraction and analysis of konjac glucomannan from corms of *Amorphophallus konjac* K. Koch., Carbohydrate Polymers, 87, 2202-2210.

- Compton, M. E. ve Preece, J. B., 1986. Exudation and explant establishment, International Association for Plant Tissue Culture and Newsletter, 50, 9-18.
- Crafts, C. B. ve Miller, C. O., 1974. Detection and identification of cytokinins produced by mycorrhizal fungi, Plant Physiology, 54, 586-588.
- Cüce, M., Bektas, E. ve Sokmen, A., 2013. Micropropagation of *Vaccinium arctostaphylos* L. via lateral-bud culture, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 37, 40-44.
- Cui, J., Liu, J., Deng, M., Chen, J. ve Henny, R. J., 2008. Plant Regeneration through Protocorm-like Bodies Induced from Nodal Explants of *Syngonium podophyllum* 'White Butterfly', Hortscience, 43, 7, 2129-2133.
- Çağlayan, K., Özavcı, A. ve Eskalen, A., 1998. Doğu Akdeniz Bölgesinde Yaygın olarak yetişen bazı salep orkidelerinin embryo kültürü kullanılarak *in vitro* koşullarda çoğaltılmaları, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 22, 2, 187-191.
- Da Silva, A. L. S., Moraes-Fernandes, M. I. ve Ferreira, A. G., 2000. Ontogenetic events in androgenesis of Brazilian barley genotypes, Revista Brasileira de Biologia, 60, 315-319.
- Daud, N., Taha, R. M. ve Hasbullah, N. A., 2008. Artificial seed production from encapsulated micro shoots of *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African violet), Journal of Applied Sciences, 8, 24, 4662-4667.
- Davis, P.H., 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Island, 8, 349, Univ. Press, Edinburg.
- De Melo Ferreira, W., Barbante Kerbauy, G. ve Pimentel Costa, A. P., 2006. Micropropagation and genetic stability of *Dendrobium* hybrid (Orchidaceae), In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 42, 568-571.
- Debnath, S. C. ve McRae, K. B., 2001. *In vitro* culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.): the influence of cytokinins and media types on propagation, Small Fruits Review, 1, 3-19.
- Debnath, S. C. ve McRae, K. B., 2005. A one-step *in vitro* cloning procedure for cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.): the influence of cytokinins on shoot proliferation and rooting, Small Fruits Review, 4, 57-75.
- Díaz, M. S. S. ve Álvarez, C. C., 2009. Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like bodies derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid, In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 45, 162-170.

- Dutra, D., Johnson, T. R., Kauth, P. J., Stewart, S. L., Kane, M. E. ve Richardson, L., 2008. Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 94, 11-21.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Erik, S. ve İlarıslan, R., 1989. Türkiye'nin Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitkileri. Türkiye Tabiatı Koruma Derneği. Yayın no: 18, Ankara.
- Erdem, H. E., 2004. Biyolojik Çeşitliliğinin Ekonomik Değerinin Belirlenmesi: Yabani Orkide Örneği, Yüksek Lisans Tezi, E.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ernst, R., 1994. Effect of thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 39, 273–275.
- Eymar, E., Alegre, J., Toribio, M. ve Lo' pez-Vela, D., 2000. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 63, 57-65.
- Farhoosh, R. ve Riazi, A., 2007. A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature, Food Hydrocolloids, 21, 660–666.
- Fernie, A. R. ve Willmitzer, L., 2001. Update on tuber formation, dormancy and sprouting: molecular and biochemical triggers of potato tuber development, Plant Physiology, 127, 1459-1465.
- Fonnesbech, M., 1972. Growth hormones and propagation of *Cymbidium in vitro*, Physiologia Plantarum, 27, 310-316.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penei, C., Greppin, H., Reid, D. M. ve Thorpe, T. A., 1996. Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture, In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 32, 272-289.
- Geetha, R., Gopal, G. V. ve Niranjan, M. H., 2009. *In vitro* response of encapsulated shoot tips of *Spilanthes acmella*, Journal of Basic Applied Biology, 3, 82-86.
- Ghosh, B. ve Sen, S., 1994. Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* 'Baker', Plant Cell Reports, 13, 381-385.
- Godo, T., Komori, M., Nakaoki, E., Yukawa, T. ve Miyoshi, K., 2010. Germination of mature seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an endangered terrestrial orchid, by asymbiotic culture *in vitro*, In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 46, 323-328.
- Gönülşen, N., Önal, K., Ercan, N., Yıldızgördü, K., Şekeroğlu, E., Biçici, M. ve Eskalen, A., 1996. Ege ve Doğu Akdeniz Bölgelerinde Doğal Yayılış Gösteren Orchidaceae Familyasına Ait Bazı Türlerin *İn vitro* ve *İn vivo* Koşullarda Üretimleri Üzerinde Araştırmalar, TÜBİTAK Proje No: TBGAG- 52.

- Gray, D. J., McColley, D. W. ve Compton, M. E., 1992. Effects of cytokinins, genotype and other factors on somatic embryogenesis from cotyledons of *Cucumis melo*, In Vitro Cellular and Developmental Biology, 28, 101.
- Gümüş, C., 2009. Batı Karadeniz Bölgesi'nde Salep Elde Edilmesinde Kullanılan Bazı Orkide Türlerinin (Orchidaceae) Çoğaltım Yöntemleri Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gümüş, C., Sezik, E. ve Ellialtıoğlu, Ş., 2008. Batı Karadeniz Bölgesi'nde yetişen ve salep elde edilen bazı orkide (Orchidaceae sp.) türlerinin doku kültürü ile çoğaltılması üzerinde bir araştırma. III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi. Kasım, İzmir, Bildiriler Kitabı 179-187.
- Haberer, G. ve Kieber, J. J., 2002. Cytokinins: New Insights into a Classic Phytohormone. Plant Physiology, 128, 354-362.
- Hadley, G., Orchid Mychorriza. In: Arditti J. (eds.), *Orchid Biology, Review and Perspectives*. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY, 1982.
- Hartman, H. T. ve Kester, D. E., *Plant Propagation - Principels and Practices*. Prentice-Hall. Inc., New Jersey, 1975.
- Harvais, G. ve Hadley, G., 1967a. The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza, New Phytologist, 66, 205-215.
- Harvais, G. ve Hadley, G., 1967b. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures, New Phytologist, 66, 217-230.
- Harvais, G. ve Pekkala, D., 1982. Vitamin production by a fungus symbiotic with Orchids, Canadian Journal of Botany, 60, 2547-2555.
- Hazarika, B. N., 2003. Acclimatization of tissue cultured plants, Current Science, 85, 1704-1712.
- Hijner, J. A. ve Arditti, J., 1973. Orchid Mychorriza: Vitamin Production and requirements by the symbionts, American Journal of Botany, 60, 8, 829-835.
- Hossain, S. N., Munshi, M. K., Islam, M. R., Hakim, L. ve Hossain, M., 2003. *In vitro* Propagation of Plum (*Zyziphus jujuba* Lam.), Plant Tissue Culture and Biotechnology, 13,1, 81-84.
- Huei-Lan, K., Jen-Tsung, C. ve Wei-Chin, C., 2005. Efficient Plant Regeneration Through Direct Somatic Embriyogenesis from Leaf Explant of *Phalaenopsis* Little Steve, In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 41, 453-456.
- Huetteman, C. A. ve Preece, J. E., 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 33, 105-119.

- Jackson, S. D., 1999. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato, Plant Physiology, 119, 1-8.
- Kamemoto, H., Amore, T. D. ve Kuehnle, A. R., 1999. Breeding *Dendrobium* Orchids in Hawaii. 176, University of Hawai'i Press, Hawaii.
- Kasperek, M. ve Grimm, V., 1999. European trade in Turkish salep with special reference to Germany, Economic Botany, 53, 396-406.
- Kishor, R., Valli Khan, P.S. ve Sharma, G.L., 2006. Hybridization and *in vitro* culture of an orchid hybrid *Ascocenda* 'Kangla', Scientia Horticulturae, 108, 66-73.
- Kitsaki, C. K., Zygouraki, S., Ziobora, M. ve Kintzios, S., 2004. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae), Plant Cell Reports, 23, 5, 284-290.
- Kreutz, C. A. J., Die Orchideen in der Türkei, 1998.
- Kuo, H. L., Chien, J. T. ve Chang, W. C., 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explant of *Phaloenopsis* Little steve, In Vitro cellular and developmental Biology-Plant, 41, 453-456.
- Lauzer, D., St-Arnaud, M. ve Barabe, D. 1994. Tetrazolium staining and *in vitro* germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae), Lindleyana, 9, 3, 197-204.
- Lee, S. K. ve Phillips, R. L., 1988. The chromosomal basis of somaclonal variation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 39, 413-437.
- Lin, Y. H., Chang, C. ve Chang, W. C., 2000. Plant regeneration from callus culture of a *Paphiopedilum* hybrid, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 62, 21-25.
- Liu, T. G., Wang, Y., Xia, J. ve Li, B., 2005. Influence of purification method on the structure and properties of konjac glucomannan, Chemistry and Industry of Forest Products, 25, 71-75.
- Liu, X., Zhang, H., Zhao, Y., Feng, Z., Li, Q., Yang, H. Q., Luan, S., Li, J. ve He, Z. H., 2013. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in *Arabidopsis*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 110, 38, 15485-15490.
- Malmgren, S., 1992. Large-scale asymbiotic propagation of *Cypripedium calceolus* -plant physiology from a surgeon's point of view, Bot. Gard. Microprop. News., 1, 59-63.
- Mansuroğlu, S. ve Gürel, E., 2001. Mikroçoğaltım. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.), Bitki Biyoteknolojisi I - Doku Kültürü ve Uygulamaları. 262-281, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.



- Mansuroğlu, S. ve Gürel, E., 2001. Mikrocoğaltım. Babaoğlu, M. Gürel, E. ve zcan, S. (Edt.), Bitki Biyoteknolojisi I - Doku Kültürü ve Uygulamaları. 374, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Mead, J. W. ve Bulard, C., 1975. Effects of vitamins and nitrogen sources on asymbiotic germination and development of *Orchis laxiflora* and *Ophrys sphegodes*, New Phytologist, 74, 1, 33-40.
- Medina, R. D., Flachslanđ, E. A., Gonzalez, A. M., Terada, G., Faloci, M. M. ve Mroginski, L. A., 2009. *In vitro* tuberization and plant regeneration from multinodal segment culture of *Habenaria bractescens* Lindl., an Argentinean wetland orchid, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 97, 91-101.
- Meiners, J., Schwab, M. ve Szankowski, I., 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species, Plant Cell Tissue Organ Culture, 89, 169-176.
- Mikkelson, A., Maaheimo, H. ve Hakala, T. K., 2013. Hydrolysis of konjac glucomannan by *Trichoderma reesei* mannanase and endoglucanases Cel7B and Cel5A for the production of glucomannooligosaccharides, Carbohydrate Research, 372, 60-68.
- Mitchell, R. B., 1989. Growing Hardy Orchids from Seeds at Kew, The Plantsman, 2, 3, 152-169.
- Monier, M., 1990. Induction of embriyogenesis in callus culture. In: Pollard, J.W., Walker, J.M. (eds.), Plant Cell and Tissue Culture. 141-148, Humana Press, New Jersey.
- Nayak, N. R., Rath, S. P. ve Patnaik, S. N., 1997. *In vitro* propagation of three epiphytic orchids. *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) Fisch. and *Dendrobium moschatum* (Buch-Ham) Sw. through thidiazuron-induced high frequency shoot proliferation, Scientia Horticulturae, 71, 243-250.
- Nikolić, R., Mitić, N., Źivković, S., Grubišić, D. ve Nešković, M., 2007. Tokinins and Urea Derivatives Stimulate Seed Germination in *Lotus corniculatus* L., Archives of Biological Science, 59, 2, 125-128.
- Nor Asmah, H., Nor Hasnida, H., Nashatul Zaimah, N. A., Noraliza, A. ve Nadiah Salmi, N., 2011. Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of *in vitro*-derived *Acacia* hybrid shoot and axillary buds, African Journal of Biotechnology, 10, 40, 7820-7824.
- Onishi, N., Sakamoto, Y. ve Hirosawa, T., 1994. Synthetic seed as an application of mass production of somatic embriyos, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 39, 137-145.
- Ostrolucká, M. G., Libiaková, G., Ondrušková, A. ve Gajdošová, A., 2004. *In vitro* *Vaccinium*, Acta Universitatis Latviensis, 676, 207-212.
- nal, K., 1999. Ege Blgesinde Doğal YayılıŖ Gösteren Orchidaceae familyasına ait bazı türlerin *in vitro* koŖullarda üretimleri üzerinde araŖtırmalar, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 23, 5, 1057-1064.

- Özkaynak, E. ve Samancı, B., 2005. Mikroçoğaltımda Alıştırma, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19, 36, 28-36.
- Özkoç, İ., 1991. *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Briq. subsp. *laxiflora* (Soo) Gözl et. Reinhard ve *Orchis laxiflora* Lam. (Orchidaceae) Tohumlarının Simbiyotik ve Asimbiyotik Kültürlerde Çimlenme ve Gelişimi Üzerinde Araştırılması, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Özkoç, İ. ve Dalcı, M., 1991. Bazı orkide türlerine ait tohumların çimlenmesi üzerinde yüzey sterilizasyonunda kullanılan sodyumhipokloritin etkisi, Ondokuz Mayıs Üniv. Fen Dergisi, 3, 1, 116-122.
- Özkoç, İ. ve Dalcı, M., 1993. Germination of the seeds of *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Briq. subsp. *laxiflora* (Soo) Gözl et. Reinhard (Orchidaceae) through asymbiotic culture techniques, Doğa Türk Biyoloji Dergisi, 17, 5-11.
- Paek, K. Y. ve Murthy, H. N., 1977. Temperate Oriental *Cymbidium* species. In: Kull, T., Arditti, J. (eds.), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. VIII. Edition, 287, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Paek, K. Y. ve Yeung, E. C., 1991. The effects of 1-naphthaleneacetic acid and N<sup>6</sup>-benzyladenine on the growth of *Cymbidium forrestii* rhizomes *in vitro*, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 24, 65-71.
- Park, S. Y., Murthy, H. N. ve Paek, K. Y., 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*, Plant Science, 164, 919- 923.
- Parlak, S. ve Tutar, M., 2011. Karaburun Yarımadası'nda yayılış gösteren salep orkideleri ve bazı toprak özellikleri, Ziraat Mühendisliği, 357, 24-29.
- Pedroso, M. C. ve Pais, M. S., 1992. Minituber Production from Immature Seed Suspension Culture of *Orchis papilionacea*, In Vitro Cellular and Developmental Biology, 28, 183-186.
- Pospisilova, J., Ticha, I., Kadlecek, P., Haisel, D. ve Plzakova, S., 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions, Biologia Plantarum, 42, 481-497.
- Prasad, P. J. N., Chakradhar, T. ve Pullaiah, T., 2004. Micropropagation of *Cryptolepis buchanani* Roem. & Schult, Taiwania, 49, 1, 57-65.
- Preece, J. E. ve Sutter, E. G., 1991. Acclimatization of micropropogated plants to the green house and field. In: Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. (eds.), *Micropropagation Technology and Application*. 71-95, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Raghavan, V. ve Torrey, J. G., 1964. Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*, American Journal of Botany, 51, 264-274.

- Rao, P. V. L. ve Singh, B., 1991. Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *Solanum melongena* L., Plant Cell Reports, 10, 7-11.
- Rasmussen, H., Anderson, T. F. ve Johansen, B., 1990. Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus, Plant Cell and Environment, 13, 2, 171-177.
- Redenbaugh, K., Fujii, J. A. ve Slade, D., 1988. Encapsulated plant embryos. In: Mizrahi, A. (eds.), *Biotechnology in Agriculture Advances in Biotechnological Processes*. 9, Alan R Liss Inc., New York, 225-248.
- Redenbaugh, K., Paasch, B., Nichol, J., Kessler, M., Viss, P. ve Walker, K., 1986. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos, BioTechnology, 4, 797-801.
- Roy, J. ve Banerjee, N., 2002. Rhizome and shoot development during *in vitro* propagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.). Schltr., Scientia Horticulturae, 94, 181-192.
- Roy, J., Naha, S., Majumdar, M. ve Banerjee, N., 2007. Direct and callus-mediated protocormlike body induction from shoot-tip of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 90, 31-39.
- Saiprasad, G. V. S. ve Polisetty, R., 2003. Propagation of Three Orchid Genera Using Encapsulated Protocorm-Like Bodies, In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 39, 42-48.
- Sarkar, D., 2008. The signal transduction pathways controlling in plant tuberization in potato: an emerging synthesis, Plant Cell Reports, 27, 1-8.
- Sarmah, D. K., Borthakur, M. ve Borua, P. K., 2010. Artificial seed production from encapsulated PLBs regenerated from leaf base of *Vanda coerulea* Griff. ex. Lindl. an endangered orchid, Current Science, 98, 5, 686-690.
- Seeni, S. ve Latha, P. G., 1992. Foliar regeneration of the endangered Red Vanda. *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae), Plant Cell Tissue and Organ Culture, 29, 167-172.
- Seeni, S. ve Latha, P. G., 2000. *In vitro* multiplication and ecorehabilitation of the endangered Blue Vanda, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 61, 1-8.
- Sezik, E., 1984. Orkidelerimiz. s. 166, Sandoz Kültür Yayınları, No:6.
- Sezik, E., 1967. Türkiye'nin salepgilleri ticari salep çeşitleri ve özellikle Muğla salebi üzerinde araştırmalar, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul.
- Sheelavanthmath, S. S., Murthy, H. N., Hema, B. P., Hahn, E. J. ve Paek, K. Y., 2005. High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*, Scientia Horticulturae, 106, 395-401.

- Shimasaki, K. ve Uemoto, S., 1990. Micropropagation of a terrestrial *Cymbidium* species using rhizomes developed from seeds and pseudobulbs, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 22, 237-244.
- Simson, M. G., 2006. Plant Systematics. Elsevier Academic Press, California.
- Singh, D., Sahoo, L., Sarin, N. B. ve Jaiwal, P. K., 2003. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp) N, Plant Science, 164, 341-347.
- Skoog, F. ve Miller, C. O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*, Symposia of the Society for Experimental Biology, 11, 118-130.
- Steward, F. C. ve Mapes, M. O., 1971. Morphogenesis and plant propagation in aseptical cultures of *Asparagus*, Botanical Gazette, 133, 70-79.
- Stewart, L. S. ve Kane, M. E., 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 86, 2, 147-158.
- Tekinsen, K. K ve Güner, A., 2010. Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some Orchidaceae species, Food Chemistry, 121, 468-471.
- Timbert, R., Barbotin, J. N., Kersulec, A., Bazinet, C. ve Thomas, D., 1995. Physicochemical properties of the encapsulation matrix and germination of carrot somatic embryos, Biotechnology and Bioengineering, 46, 573-578.
- Valletta, A., Attorre, F., Bruno, F. ve Pasqua, G., 2008. *In vitro* asymbiotic germination of *Orchis mascula* L., Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 142, 3, 653-655.
- Van Waes, J. M. ve Debergh, P. C., 1986. *In vitro* germination of some Western European Orchids, Physiologia Plantarum, 67, 253-261.
- Vejsadova, H., 2006. Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured *in vitro*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 48, 1, 109-113.
- Vreugdenhil, D. ve Sergeeva, L. I., 1999. Gibberellins and tuberization in potato, Potato Research, 42, 471-481.
- Waes, J. V., 1987. Effect of Activated Charcoal on *In Vitro* Propagation of Western European Orchids. Symposium on *In Vitro* Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants, Eylül, Gembloux, Belgium, ISHS Acta Horticulturae 212.

- Warren, R., 1981. Orchids from seed-Part II: Sowing the seed, The Orchid Review, 89, 149-151.
- Werbrouck, S. P. O. ve Debergh, P. C., 1994. Applied aspects of plant regeneration (micropropagation). In: Dixon, R.A and Gonzales, R.A. (eds.) Plant Cell Culture - A Practical Approach. 127-135, Oxford University Press, New York.
- Wotavova-Novotna, K., Vejsadova, H. ve Kindlmann, P., 2007. Effects of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species, Biologia Plantarum, 51, 1, 198-200.
- Yamazaki, J. ve Miyoshi, K., 2006. *In vitro* Asymbiotic Germination of Immature Seed and Formation of Protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae), Annals of Botany, 98, 1197-1206.
- Yuan, Z. H., Wu, D. C., Li, X. Y. ve Wu, H., 2003. Effect of ultrasonic waves on extracting Konjac Glucomannan, Journal of Fourth Military Medical University, 24, 238-241.
- Zhao, P., Wu, F., Feng, F. S. ve Wang W. J., 2008. Protocorm-like body (PLB) formation and plant regeneration from the callus culture of *Dendrobium candidum* Wall ex Lindl., In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 44, 178-185.
- Zhong, J. J., Chen, H. ve Chen, F., 2001. Production of rosmarinic acid, lithospermic acid B, and tanshinones by suspension cultures of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in bioreactors, Journal of Plant Biotechnology, 3, 107-112.

## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Trabzon'un Beşikdüzü ilçesinde doğdu. İlköğretimini Beşikdüzü Merkez İlköğretim Okulunda tamamladı. Orta öğretimini Vakfikebir Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2002-2003 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fatih Eğitim Fakültesi, Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanı, Biyoloji öğretmenliği Bölümü'nde lisans öğrenimine başladı ve 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Anabilim dalında Tezli Yüksek Lisans eğitimine başladı ve 2010 yılında Tezli Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Anabilim dalında Doktora eğitime başladı. 2009-2010 yılları arasında T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Teknogirişim Sermayesi Destekli ve 2010- 2012 yılları arasında Kosgeb, Ar-Ge İnovasyon Destekli Projelerde Yürütücü olarak görev aldı.