

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
2022-YL-049

**SALEP ORKİDELERİNİN *In vitro* ÇOĞALTIMINDA BAZI
BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN ETKİSİ**

**MERVE KABAKCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Uğur ŞİRİN**

AYDIN – 2022

TEŞEKKÜR

Başta tez konumun belirlenmesi sırasında ve konu belirleme aşaması sonrası bitkilerin tedarikleri, denemenin kurulumu gibi birçok noktada desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Uğur ŞİRİN hocama teşekkürleri bir borç bilirim. Aynı zamanda Prof.Dr. Mustafa Ercan ÖZZAMBAK, Prof. Dr. Engin ERTAN ve tüm Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü hocalarına ayrı ayrı teşekkür ederim. Diğer taraftan deneme kuruluşu sırasında her türlü desteğini esirgemeyen, Öğr. Gör. Dr. Leyla EKEN, Araş. Gör. Dr. Yunus KORKOM, Ziraat Yüksek Mühendisi Pelin ÇAMOĞLU KONAK, Ziraat Yüksek Mühendisi Ahmet VURAL, Ziraat Mühendisi Özgül ÖZSEMERÇİ, Ziraat Mühendisi Ozan UĞUR ve tüm Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü personel ve öğrencilerine teşekkür ederim. Son olarak ise Yüksek Lisans eğitimime başlamaya yardımcı olan maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan babam Tanju KABAKCI, annem Türkan KABAKCI ve kardeşim Pınar KABAKCI'ya sonsuz teşekkür ederim. Bu çalışma hepimizin...

Merve KABAKCI

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
RESİMLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	43
3.1. Materyal.....	43
3.1.1. Bitkisel Materyal	43
3.1.2. Kimyasal Materyaller	45
3.2. Yöntem	48
3.2.1. Besin Ortamı Hazırlanması ve Doku Kültürü Koşulları	48
3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu ve Eksplant Hazırlığı (Başlangıç Sterilizasyonu).....	49
3.2.2.1. Yumruların yüzey Sterilizasyonu	49
3.2.2.2. Sürgün Ucu, Yaprak, Çiçek ve Çiçek Sapının Yüzey Sterilizasyonu	50
3.2.3. Modifiye Edilmiş Sterilizasyon Uygulamaları	51
3.2.4. İkinci Modifiye Edilmiş Sterilizasyon Uygulamaları (ST)	54
3.2.5. Eksplantların Kültüre Alınması	55
3.2.5.1. Yumruların Kültüre Alınması.....	55

3.2.5.2. Sürgün Ucunun Kültüre Alınması	56
3.2.5.3. Çiçeklerin Kültüre Alınması.....	56
3.2.5.4. Çiçek Saplarının Kültüre Alınması.....	57
3.2.6. Çalışmada İncelenen Parametreler	57
3.2.6.1. Canlılık Oranı (%)	57
3.2.6.2. Enfeksiyon Oranı (%).....	57
3.2.6.3. Kallus Oluşturan Eksplant Oranı (%).....	58
3.2.6.4. Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%).....	58
3.2.6.5. Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (Adet).....	58
3.2.6.6. Kallus Oluşturan Eksplant Sayısı (Adet).....	58
3.2.6.7. Kararmış Eksplant Sayısı (Adet)	58
3.2.6.8. Canlı Eksplant Sayısı (Adet)	58
3.2.6.9. Enfeksiyonlu Eksplant Sayısı (Adet).....	59
3.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi	59
4. BULGULAR	60
4.1. Başlangıç Sterilizasyonu	60
4.2. Modifiye Edilmiş Sterilizasyon Uygulamaları	60
4.3. ST Sterilizasyon Denemesi Uygulamaları.....	100
5. TARTIŞMA.....	104
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	113
KAYNAKLAR.....	118
BİLİMSEL ETİK BEYANI	139
ÖZ GEÇMİŞ.....	140

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
2,4D	: 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
2iP	: 2-Isopentil Adenin
ABA	: Absisik Asit
AgNO₃	: Gmüş Nitrat
BA	: N6-Benzil Adenin
BAP	: 6-Benzil Amino Pürin
BL	: Brassinosteroid
EpiBL	: Epibrassinolide
g/l	: gram/litre
GA₃	: Giberellik Asit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H₂SO₄	: Sülfürik Asit
IAA	: Indol-3-Asetik Asit
IBA	: Indol Bütirik Asit
KC	: Knudson C
KIN	: Kinetin
mg/l	: miligram/litre
mg/ml	: miligram/mililitre
mm	: milimetre
mM	: milimolar
MS	: Murashige Skoog
NAA	: Naftalen Asetik Asit

NaCl	: Sodyum Klorür
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
NH₄NO₃	: Amonyum Nitrat
NS	: Nano Gümüş
ORC	: Orchimax
P	: Pikloram
SA	: Salisilik Asit
TDZ	: Thidiazuron
TiO₂	: Nano Titanyum Dioksit
VWD	: Van Waes Debergh
ZEA	: Zeatin
ZnSO₄	: Çinko Sülfat
µg	: mikrogram
µM	: mikromolar

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3.1. Serada saksılara dikilen saleplerden bir görünüm.	44
Resim 3.2. Uygulamalarda kullanılan kimyasallar a) hazır MS ortamı b) benziaminopürin c) epibrassinolid ç) naftalen asetik asit d) salisilik asit e) titanyum dioksit.....	48
Resim 3.3. Salep yumrularının yüzey sterilizasyonu aşamaları a) çeşme suyu altında yıkama b) %70'lik etil alkolde bekletme c) %25'lik sodyum hipokloritte bekletme. .	50
Resim 3.4. a) Sterilizasyonu gerçekleşmiş yumrular b) kültüre alınmak üzere parçalara ayrılmış yumrular	56
Resim 4.1. S1 uygulamasında kültüre alınan yaprak eksplantlarının görüntüleri a) kültürün ilk günü b) kültürün 8. günü c) kültürün 15. günü.	63
Resim 4.2. S2 uygulamasında kültüre alınan yaprak eksplantlarının 8 gün sonraki kültür görüntüleri.....	64
Resim 4.3. S2 uygulamasında kültüre alınan yaprak eksplantlarının 15 gün sonraki kültür görüntüleri.....	65
Resim 4.4. S2 uygulamasının 23 gün sonraki kültür görüntüleri.....	66
Resim 4.5. S3 uygulamasında kültüre alınan eksplantların 8 gün sonraki kültür görüntüleri.....	68
Resim 4.6. S3 uygulamasında kültüre alınan eksplantların 23 gün sonraki kültür görüntüleri.....	68
Resim 4.7. S4 uygulamasının aşamaları a) steril saf su ile yıkama b) yumruların NaOCl çözeltisinde sterilizasyonu c) yaprakların NaOCl çözeltisinde sterilizasyonu d) eksplantların fungusitle muamelesi.....	69
Resim 4.8. S8 uygulamasının soldan sağa ilk kültüre alındığı gün ve 14 gün sonra görüntüsü.....	74
Resim 4.9. S8 uygulamasında 14. günde yumru eksplantında oluşan kallus gelişiminin görünümü.	74

Resim 4.10. S9 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların ilk günlük görünümü.	75
Resim 4.11. S9 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 14. günlük görünümü.	76
Resim 4.12. S9 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 18. günlük görünümü.	77
Resim 4.13. S9 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 22. günlük görünümü.	77
Resim 4.14. S9 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 29. günlük görünümü.	78
Resim 4.15. S9 uygulaması kallus oluşturan eksplantın aktarımından bir görüntü.	78
Resim 4.16. S10 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 14. günlük görünümü ve kallus oluşturan eksplant.	80
Resim 4.17. S10 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 22. günlük görünümü.	80
Resim 4.18. S10 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 29. günlük görünümü.	81
Resim 4.19. S10 uygulamasında kallus geliştiren eksplantın 29 gün sonraki görünümü.	81
Resim 4.20. S10 uygulamasında kallus gelişimi olan eksplantın aktarımı.	81
Resim 4.21. S11 uygulaması yapıp kültüre alınan eksplantların 18 gün sonraki görünümü.	85
Resim 4.22. S11 uygulamasında yapıp kültüre alınan eksplantların 26. gününde kallus oluşturan eksplantların görünümü.	86
Resim 4.23. S11 uygulaması yapıp kültüre alınan eksplantların 35 gün sonraki görünümü.	87
Resim 4.24. S12 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 47. günlük görünümü.	90
Resim 4.25. S12 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kallus oluşturan eksplantın 47 gün sonraki görünümü.	90

Resim 4.26. S12 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kallus oluşturan eksplantın 75 gün sonraki görünümü.	91
Resim 4.27. S12 uygulamasında kallus oluşturan eksplantın 75 gün sonraki görüntüsü.	91
Resim 4.28. S12 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kallus oluşturan eksplantın 90 gün sonraki görünümü.	91
Resim 4.29. S12 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kallus oluşturan eksplantın 102 gün sonraki görünümü.	92
Resim 4.30. S12 uygulamasında gelişimi gözlenen eksplantın aktarımından bir görüntü. ..	92
Resim 4.31. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 14. günkü görünümü.....	95
Resim 4.32. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kallus oluşturan eksplantın 14. günkü görünümü.....	95
Resim 4.33. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 22. günkü görünümü.....	96
Resim 4.34. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 29. günkü görünümü.....	97
Resim 4.35. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 57. günkü görünümü.....	98
Resim 4.36. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 73. günkü görünümü.....	98
Resim 4.37. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 84. günkü görünümü.....	99
Resim 4.38. S13 uygulamasında gelişen eksplantın aktarımından bir görüntü.	100
Resim 4.39. Farklı ST uygulamalarına bağlı olarak yaprak eksplantlarının görünümü.	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneme konularına ilişkin uygulama adları, uygulamaların içeriği ve uygulama dozları.....	48
Çizelge 3.2. Başlangıç sterilizasyonu aşamaları.	50
Çizelge 3.3. Modifiye edilmiş sterilizasyon uygulamaları ve aşamaları.....	52
Çizelge 3.4. ST sterilizasyon denemesinde yer alan uygulamalar ve aşamaları..	54
Çizelge 4.1. S1 uygulaması yapılıp kültüre alınan yaprak eksplantlarının canlılık ve enfeksiyon oranları.....	62
Çizelge 4.2. S2 uygulaması yapılıp kültüre alınan yaprak eksplantlarının canlılık ve enfeksiyon oranları.....	63
Çizelge 4.3. S3 uygulaması yapılıp kültüre alınan yumru eksplantlarının canlılık ve enfeksiyon oranları.....	67
Çizelge 4.4. S4 uygulaması yapılıp kültüre alınan yumru eksplantlardaki canlılık ve enfeksiyon oranları.....	70
Çizelge 4.5. S5 uygulaması yapılıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık ve enfeksiyon oranları.....	71
Çizelge 4.6. S6 uygulaması yapılıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık ve enfeksiyon oranları.....	72
Çizelge 4.7. S7 uygulaması yapılıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık ve enfeksiyon oranları.....	72
Çizelge 4.8. S8 uygulaması yapılıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.	73
Çizelge 4.9. S9 uygulaması yapılıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.	75
Çizelge 4.10. S10 uygulaması yapılıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.	79

Çizelge 4.11. S11 uygulaması yapıp kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.	83
Çizelge 4.12. S12 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.	88
Çizelge 4.13. S13 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.	94
Çizelge 4.14 ST uygulaması yapıp kültüre alınan yaprak eksplantlarının canlılık ve enfeksiyon oranları.....	101



ÖZET

SALEP ORKİDELERİNİN *In vitro* ÇOĞALTIMINDA BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN ETKİSİ

Kabakcı, M. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2022.

Amaç: Salep orkideleri *Orchidaceae* familyasına ait ve yumrulu bitkiler olmakla birlikte Türkiye'nin hemen her bölgesinde doğal olarak yetişmekte ve yumrularından salep elde edilmektedir. Bu nedenle her yıl milyonlarca salep yumrusu sökülerek tahrip edilmektedir. Ülkemizin iç piyasasında hem salep elde etmek hem de süs bitkisi olarak kullanılması amacıyla salep orkidelerinin yetiştirilmesi oldukça önemlidir. Bu bağlamda bu araştırmada, *Orchis* sp. ve *Ophrys* sp. cinslerine ait türlerin *In vitro* kültürde farklı bitki büyüme düzenleyiciler ve nano bileşiklerden Nano TiO₂ ilave edilen MS ortamında çoğaltımı ve bu eklenen bitki büyüme düzenleyicilerin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem: Çalışmada bitkinin toprak altı (yumru) ve toprak üstü (çiçek) organları eksplant olarak kullanılmıştır. Sürekli tekrarlayan kontaminasyon sorunlarından dolayı yüzey sterilizasyon yöntemine ilave olarak modifiye edilmiş yeni sterilizasyon protokoller denenmiştir. Çalışmada MS ortamına BAP (2 mg/l ve 4 mg/l), NAA (1 mg/l ve 2 mg/l), EpiBL (5 µM), SA (1mM), Nano TiO₂ (30 mg/l) ilave edilerek besin ortamları hazırlanmış ve eksplantlar bu ortamlarda kültüre alınmıştır.

Bulgular: Sterilizasyon yöntemlerinde en iyi sonuçlar modifiye edilen protokollerde fungusit uygulanan denemelerde elde edilmiştir. Araştırmada 4 mg/l BAP+ 2 mg/l NAA uygulamasında çeşitli dönemlerde kallus gelişimi meydana gelmiş ancak fenolik bileşiklerin etkisi ile eksplantlarda ve besin ortamında kararmalar oluşmuş ve bir süre sonra canlılık kayıpları meydana gelmiştir.

Sonuç: Doku kültüründe ciddi problem olan kontaminasyon için farklı sterilizasyon yöntemlerinin denenmesiyle salep orkidelerinde yüzey sterilizasyonu yöntemleri belirlenmiş olup, bitki büyüme ve düzenleyicilerin etkisi olarak BAP ve NAA içeren besin ortamlarında

başarı sağlanmıştır. Çalışmada yer alan diğer uygulamalarda kullanılan EpiBL, Nano TiO₂, SA gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla farklı dozlarda çalışmaların planlanması yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Orchis* sp., *Ophrys* sp., Karasal orkide, Doku kültürü, EpiBL, SA, BAP



ABSTRACT

EFFECT OF SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON *In vitro* PROPAGATION OF SALEP ORCHIDS.

Kabakcı, M. Aydın Adnan Menderes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Horticulture Program, Master's Thesis, Aydın, 2022.

Objective: Although salep orchids belong to the *Orchidaceae* family are tuberous plants, they naturally grow in almost every region of Turkey and salep is obtained from their tubers. For this reason, millions of salep tubers are removed and destroyed every year. It is very important to grow salep orchids in order to obtain salep and to use it as an ornamental plant in the domestic market of our country. In this context, we used *Orchis* sp. and *Ophrys* sp. In this study, it was aimed to reproduce the species belonging to the genus of different plant growth regulators and Nano TiO₂ in MS medium with *In vitro* culture and to determine the effect of these added plant growth regulators and nanocompounds.

Materials and Methods: In the study, subsoil (tubers) and aboveground (flower) organs of the plant were used as explants. Due to recurrent contamination problems, modified new sterilization protocols have been tried in addition to the surface sterilization method. In the study, nutrient media were prepared by adding BAP (2 mg/l and 4 mg/l), NAA (1 mg/l and 2 mg/l), EpiBL (5 µM), SA (1 mM), Nano TiO₂ (30 mg/l) to the MS medium and explants were cultured in these media.

Results: The best results in sterilization methods were obtained in trials where fungicide was applied in modified protocols. In the study, callus development occurred in various periods in the application of 4 mg/l BAP + 2 mg/l NAA, but with the effect of phenolic compounds, it was found in the explants and darkening occurred in the MS medium and after a while, vitality losses occurred.

Conclusion: Surface sterilization methods which is a serious problem in tissue culture, have been determined in salep orchids by trying different sterilization methods for contamination. Success has been achieved in MS medium containing BAP and NAA as the effect of plant

growth and regulators. It may be useful to plan studies at different doses in order to determine the effects of plant growth regulators such as EpiBL, Nano TiO₂, SA, which are used in other applications in the study.

Key Words: *Orchis* sp., *Ophrys* sp., Terrestrial Orchid, Tissue Culture, EpiBL, SA, BAP



1. GİRİŞ

Orchidaceae familyası tür sayısı bakımından oldukça geniş olmasından dolayı çiçekli bitkiler içinde en çeşitli familyalardan biri olarak kabul edilmektedir. Bilim insanları yaptığı çalışmalarla orkidelerin 120 milyon yıl öncesine kadar yeryüzünde olduklarını ortaya koymuşlardır (Ramírez vd., 2007). Bu familyanın yeryüzünde yaklaşık 600-800 cins ve 30-35 bin kadar tür barındırdığı bilinmektedir (Özkoç, 1991; Aytaş, 1994). Son zamanlarda gerçekleştirilen çalışmalarla birlikte bu familyaya 9 cinse ait 46 türün eklendiği ve 70 000' den fazla orkide hibridinin bulunduğu bildirilmiştir (Kreutz, 2000; İlçim, 2011). En soğuk ve en kurak iklim koşulları haricinde kuzeyde bulunan Alaska ve İsveç, güneyde bulunan Tierra del Fuego ve Macquarie Adaları'na kadar çok geniş yayılım gösteren orkidelerle neredeyse yeryüzünün her yerinde karşılaşmak mümkündür (Baskin ve Baskin, 1998; Dressler, 1981; Koopowitz, 2001). Farklı yaşam şekilleri ile orkideler, tropik ve subtropik bölgelerde yaygın olarak yayılış göstermekle birlikte en fazla orkide çeşitliliği ise Neotropik bölgede bulunmaktadır (Pridgeon, 1995; Cribb vd. 2003). Brezilya'daki Atlantik ormanı, Dünyada bulunan biyoçeşitliliğin büyük bir bölümünü oluşturur ve orkideler için ciddi anlamda önemli bir ekosistemdir (Stehmann vd., 2009). Bu bağlamda, Barthlott vd. (1996) ve Myers vd. (2000) göre tropiklerin geri kalan kısmındaki dağılım ise bitki biyoçeşitliliğinin yüksek olduğu alanlarda, türlerin sıcak noktalara yakınlığı ile türlerin fazla oluşu arasında paralel bir ilişki bulunmakla birlikte Kolombiya ve Ekvador'un da içerisinde bulunduğu And Bölgesi (Andes region), orkide çeşitliliği açısından dünyadaki en zengin yerlerin başında gelir. Diğer önemli alanlar ise Orta Amerika, Madagaskar, Hint-Çin, Güneybatı Çin, Sumatra, Borneo, Yeni Gine ve Güneybatı Avustralya'nın ılıman dağlarıdır (Cribb vd., 2003).

Orta kuşak orkideleri bakımından zengin ülkelerden biri olan Türkiye'de en son yapılan araştırmalara göre 150 civarında orkide türü yetişmektedir (Renz ve Taubenheim, 1984; Kreutz, 1998; Sezik, 2002). *Orchidaceae* familyası Türkiye'nin hemen her bölgesinde yetişmekle birlikte ülkemizde bulunan orkide türleri arasında endemizm oranı yüksektir. Türkiye'de geofit bitkiler grubu içerisinde yer alan doğal olarak yetişen orkideler 23 cinse ait 49 adet hibriti bulunmakla birlikte toplam 204 orkide türünün varlığı bildirilmekte ve bu

orkidelerin %31.8'i Türkiye'de endemik olarak bilinmektedir (İlçim, 2011; Petrou vd. 2016).

Orkideler çok yıllık otsu bitkilerdir ve bu orkide türlerinin yaklaşık %70'i epifit, %25'i toprakta ve %5'i toprak altında, kayaların üzeri, çürüyen bitki üzerlerinde gibi şekillerde yaşamlarını sürdürmektedirler (Sezik, 1984; Renz ve Taubenheim, 1984; Güler vd. 2008). Orkide türlerinin birçoğu yumruludur ve bu yumrular arasında salep orkideleri de yer almaktadır (Sezik, 2002).

Türkiye'de doğal olarak yetişen salep orkideleri orman, maki, çayır, zeytin ve tarım alanlarında, orman ve maki içi açıklıklarda yaygın şekilde yetişmektedir. Genellikle gölgelik alanlarda yetişen bitkiler olduklarından dolayı ışık ihtiyacı yüksek değildir. Türkiye'de salep orkidelerinin en yoğun bulunduğu bölgeler ve bu salep orkidelerinin ticari olarak bilinen isimleri; Kastamonu salebi (Kastamonu, Sinop), Muğla salebi (Muğla, Antalya, Silifke), Maraş Salebi ve Çayır salebi (Kahramanmaraş, Gaziantep ve Hatay çevresi) ve Van Salebi (Elazığ, Van, Muş ve Bitlis çevresi) ve Akdağ madeni salebi (Yozgat ve Akdağ madeni civarı) olduğu bildirilmiştir. Türler bazında bakıldığında ise Kastamonu salebi (*Orchis pinetorum*, *O. purpurea*, *Dactylorhiza romana*, *O. pallens*, *Anacamptis pyramidalis*, *O. simia*, *O. tridentata*), Muğla salebi (*Barlia robertiana*, *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza romana*, *Orchis italica*, *O. tridentata*, *O. pinetorum*, *O. simia*), Maraş Salebi ve Çayır salebi (*Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza romana*, *Himantoglossum affine*, *Ophrys holoserica*, *Orchis anatolica*, *O. morio*, *O. pinetorum*, *O. spitzelii*, *O. tridentata*, *O. laxiflora*), Van Salebi (*Dactylorhiza romana ssp. georgia*, *Orchis pinetorum*, *O. anatolica*, *O. coriophora*, *O. simia*, *O. tridentata*, *O. spitzelii*, *O. collina*, *Ophrys transhyrcana*, *Ophrys reinholdi ssp. strausii*, *Anacamptis pyramidalis*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *Ophrys holocericea*, *Ophrys phrygia*, *Ophrys schulzi*, *O. pseudolaxiflora*, *Ophrys papilionacea*, *Comperia comperiana*), Akdağ madeni salebi (*Dactylorhiza romana ssp. romana*, *D. romana*, *Platanthera chlorantha*, *Orchis pinetorum*, *O. purpurea*, *O. tridentata*, *Anacamptis pyramidalis*, *Comperia comperiana*, *Himantoglossum affine*) olarak belirtilmiştir (Sezik, 1967; Sezik, 1969; Sezik ve Özer, 1983; Sezik, 1991; Sezik vd. 2007).

Orkideler gösterişli ve güzel görünümlerinden dolayı süs bitkisi olarak kullanımlarının yanı sıra gıda, güzel koku eldesi amacıyla parfüm ve ilaç hammaddesi olarak tıbbi alanlarda kullanıldıkları bilinmekle birlikte sektörde değerli bir yere sahiptir. Ülkemizde genellikle kış aylarında tüketimi oldukça yüksek olan "salep" orkide yumrularından elde edilmektedir.

İbn-i Sina, tıbbi ve aromatik bir bitki olarak kullanılan salebin iştah açan ve felci önleyen etkisinden bahsetmiştir. Yumruların elde edilen salepte bulunan ‘‘glikomannan’’ maddesinin tat, kıvam ve aroma vermesi sayesinde Maraş dondurmasının geç erimesini ve sertliğini sağlamasıyla birlikte dünyada ve ülkemizde gıda olarak, dondurma yapımında kullanımı ve tıbbi alanlarda kullanımı açısından salep orkidelerine talep her geçen yıl artmaktadır (Sezik, 1984). Ancak yumrulu orkide cinslerinin hepsi salep eldesi için uygun olmamakla birlikte ülkemizde *Aceras*, *Anacamptis*, *Barlia*, *Comperia*, *Dactylorhiza*, *Himantoglossum*, *Neotinea*, *Ophrys*, *Orchis* ve *Serapias* cinslerine ait 120 kadar tür orkide türü salep eldesi için kullanılmaktadır (Sezik vd., 2007).

Her geçen gün salep tozuna artan talebin avantajlarının yanısıra dezavantajları da bulunmaktadır. 1 kg salep tozu eldesi için binlerce salep yumrusu gerekmektedir. Bu durum devamında bitki kaynaklarının doğal olarak varolması nedeniyle sınırsız ve bitmeyecek gibi görülmesine karşın bilinçsiz yapılan bitki tahribatlarından dolayı, nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıyadır. Doğadan toplanılan salep yumruları fazla miktarlarda olduğundan dolayı Türkiye'nin salep zenginliğini tehlikeye atmaktadır. Salep eldesi amacıyla endemik orkide türleri fazlaca sayıda uzun yıllar doğadan toplanmış ve bu durumda türlerin nesilleri tükenme durumu ile karşı karşıya kalmıştır (Özhatay vd., 1997). Salep orkideleri; şiddetli sökülme ile doğrudan, çiçeklenme aşamasında yapılan sökülme ile tohum oluşturmaya izin verilmeden dolaylı bir şekilde tahrip edilmektedir. Yumruları sürekli sökülen orkideler bir türlü tohum oluşturmamakta, nitekim tohumlarının çimlenmesi hem uzun sürmekte hem de mikorizal bir ilişkiye ihtiyaç duymaktadır. Bu bağlamda tohum oluşturmaları ve bu tohumların çimlenmeleri çeşitli dış etkenlere bağlı olan ve bitki oluşumu çok uzun yıllar alan orkideler maalesef farklı nedenlerle doğadan sökülme yapılarak nesli tükenme tehlikesi altına girerek tahrip edilmektedir.

Salep orkidelerinin üretiminin yapılmaması ile birlikte dünya genelinde artan talep önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Talepten dolayı oluşan yoğun sökülme nedeniyle salep biyoçeşitliliği azalmaya başlamış, nesilleri tehlike altına girmiştir. Yabani hayvan ve bitki türlerinin uluslararası ticaretinde nesillerinin tehlikeye girmesini önlemeyi amaç edinen CITES sözleşmesinin listesinde yer alan ve korumaya alınan bazı orkidelerin toplanmasına kesinlikle izin verilmemekle birlikte bazı türler sınırlandırılmıştır. Fakat tüm yasaklama ve sınırlamalara karşın Türkiye'de her yıl tonlarca taze salep yumrusu toplanmakta ve salep üretilmektedir. CITES yönetmeliğinde yurt dışına yumru, toz veya başka bir şekilde satışı yasaklanan salep orkidelerinin doğadan toplanarak yurt içinde ticaretinin yapılmasına bir

yasak getirilememiştir. Bu durum her yıl milyonlarca salep orkidesinin doğal ortamlarından sökülerek popülasyonlarının azalmasına hatta yok olmasına neden olmaktadır. Herhangi önlem alınmadan doğadan sökümü gerçekleştirilen birçok bitki türünün içinde salepin yeri oldukça önemli olmasına rağmen ülkemizde iç piyasa ve dışa satım amacıyla günümüzde sayılarının çok azaldığı belirtilmektedir (Baytop ve Sezik, 1968). Özhatay (2000) Salep eldesi amacıyla 1 kg kuru yumru elde etmek için doğadan 1000-4350 adet arasında yumru sökülmesi gerektiğini belirlemiş ve bu amaçla her yıl doğadan 10-20 milyon adet orkide yumrusunun sökülerek tahribata neden olduğunu bildirmiştir. Hagsater vd. (1996) kontrolsüzce sökümden dolayı nesli tehlikede olan ve kültüre alınmaya uygun orkide türleri için veri oluşturulması, bu orkidelerin yok olma tehlikesinden dolayı eğitim programları oluşturulması ve bu eğitim programlarına teşvik sayesinde orkide türlerinin üretiminin sağlanması hakkında çözüm niteliğinde olabilecek önerileri bildirmişlerdir.

Orchidaceae familyasına dahil salep bitkisi vejetatif ve generatif olarak çoğaltılabilmektedir. Ancak salep orkidelerinin tohumlar hem oldukça küçük hem de endospermli bulunmamakta, bu sebeple tohumları çimlenme aşamasında mikorizal funguslara ihtiyaç duymakta ve çimlenme sonrası gelişmiş bir bitki haline gelebilmeleri uzun zaman almakta ve bitki oluşturabilme süreleri ortalama 2- 16 yıl olmakla birlikte türden türe değişkenlik göstermektedir (Arditti, 1967; Sezik, 1984). Bu sebeple orkidelerin mikorizal şekilde çimlenmesiyle ilgili yapılan çalışmalar bulunmaktadır (Arditti vd., 1996). Pierik (1987) Knudson'un *In vitro* koşullarda orkidelerin özellikle *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum* ve diğer pek çok orkidenin çimlendirilebileceğini gösterdiği çalışmaları olduğunu belirtmiştir. Çimlenmenin olabileceği bulgularından sonra farklı orkide türlerinde en iyi çimlenmeyi sağlayan besin ortamı kombinasyonları ortaya konmuştur (Arditti, 1967; 1982; Fast 1980; Arditti ve Ernst, 1982). Doku kültürü teknikleri generatif yöntemlerle kolay çoğaltılamayan bitkilerin üretimi, hastalıklardan arı bitki üretimi, ıslah amaçlı çalışmalar, dayanıklı bitki genotiplerinin korunması, bitki gen kaynaklarının muhafazası, hücre ve dokulardan yeni bitki meydana getirme, yeni meydana gelen bitkide homojenite, seçilen belirli ve üstün özelliklere sahip bitkilerin hızlı üretimi gibi avantajlarıyla oldukça önemlidir (Babaoğlu vd., 2001). Bu sayede laboratuvar koşullarında simbiyotik ve asimbiyotik olarak orkide çimlendirme çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. Ülkemizde de salep orkidelerinin tohum çimlendirilmesi üzerine *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur (Özkoç, 1991; Gönülşen, 1983). Ancak, salep orkidelerinde tohumların küçük olması nedeniyle generatif yolla üretilmesinin zor olduğunu ve farklı

vegetatif organlarla *In vitro* koşullarda üretilebileceği belirtilmiştir (Gönülşen, 1983). *In vitro* koşullarda yapılan vejetatif üretimde farklı yöntemler mevcuttur. Bunun üzerine doğal olarak yetişen *Orchis laxiflora*, *O. sancta*, *S. vomeraceae*, *Ophrys bornmuelleri*, *Orchis anatolica* ve *O. coriophora* türlerinde embriyo kültüründe olumlu sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Gönülşen vd. 1995; Önal, 1997). Bununla beraber, sürgün ucu kültürü (Gönülşen vd. 1995; Çağlayan vd. 1997), embriyo kültürü (Çağlayan vd. 1998; Özsavcı, 1995) gibi farklı yöntemler de kullanılabilir.

In vitro üretimde en önemli faktörler; üretimde kullanılan bitki türü, eksplant tipi, sterilizasyon yöntemi, bilgi ve tecrübe ile elbette en önemlisi besin ortamları ile bu ortamlar içerisine ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileridir. Salep orkidelerinde *In vitro* kültürde kullanılan farklı besin ortamlarının etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda yapılmıştır (Özsavcı, 1995; Kısakürek vd. 2009; Çığ, 2012). *In vitro* ortamda kültüre alma çalışmalarında besin ortamına bitki büyüme düzenleyicileri eklenerek besin ortamı kombinasyonları oluşturulabilmektedir. Bitki büyüme düzenleyiciler içinde yer alan oksin, gibberellin, sitokinin, inhibitörler ve etilen grubu genel olarak hücre bölünme, hücre uzaması, hücre farklılaşma, cinsiyet belirleme, organ oluşumu, metabolizma oluşumu, biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı dayanıklılığı teşvik etmektedir (Eken ve Şirin, 2016). Sitokininler, karasal orkide tohumlarının çimlenmesi üzerinde en etkili hormonlar oldukları belirlenmiş olmasına rağmen, bitki büyüme düzenleyicilerin tohum çimlenmesi üzerindeki etkilerinin oldukça farklı sonuçlar oluşturabileceği vurgulanmış ve bu bağlamda aynı bitki büyüme düzenleyicinin bir orkide türünde pozitif etkisi olabileceğinin yanında diğer orkide türlerinde negatif etkiye neden olabileceği belirtilmiştir (Arditti ve Harrison, 1977). Örneğin besin ortamlarına ilave edilen GA₃ hormonu *Orchis laxiflora* Lam. türünde olumsuz etki yaparken (Gümüş ve Ellialtıoğlu, 2005; Gümüş ve Ellialtıoğlu, 2011), *Dactylorhiza nischalkiorum*'da ise olumlu etki yapmıştır (Gümüş, 2009). *Orchis laxiflora* türünde yumru oluşumu açısından MS ortamında en etkin BAP ile NAA kombinasyonun da sağlanırken, en az etkili olarak 2,4D ve IBA elde edildiği belirtilmiştir (Ekinoğlu, 2017).

Süs bitkilerinde de kullanılan oksin, sitokinin, gibberellik asit gibi klasik olarak bilinen bitki büyüme düzenleyicilerin yanı sıra son zamanlarda bitki hormonu olarak kabul edilen salisilatlar, brassinosteroidlerin kullanımına talep artmaya başlamıştır. Bu bileşikler; güzel koku salgılama, hastalık ve böcek zararlarına karşı dayanıklılığı artırma, çiçeklenmeyi teşvik etme, kokulu bitkilerin çiçeklenmesi ve kök oluşumunu hızlandırmada kullanılabilir (Eken ve Şirin, 2016). Brassinosteroidler yaygın olarak bitkilerde

bulunan ve büyüme ile gelişim süreçlerinde önemli rol oynayan pleiotropik etkileri olan benzersiz bir endojen bitki büyüme düzenleyici sınıfını oluşturur (Sasse, 1997; Clouse ve Sasse, 1998; Malabadi ve Nataraja 2007). Brassinosteroidler bitkide birçok fizyolojik işlemi teşvik eder; fotosentetik ve enzimatik aktiviteyi, hormonal dengeyi, hücre bölünmesi ve uzaması, kök gelişimi, hücrel farklılaşma, vasküler farklılaşma, polen tübü büyümesi, apikal dominansının sürdürülmesi, çiçeklenme, stres toleransının artırılması üzerine etkilidir (Rao vd. 2002; Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006; Clouse ve Sasse, 1998; Sasse, 2003; Amzalling ve Vaisman, 2006; Ashraf vd. 2010; Surgun vd. 2012). Brassinolide'nin *Petunia hybrida*'nın yaprak protoplastlarında hücre bölünme oranını arttırdığı (Oh ve Clouse, 1998), 24-EpiBL'nin tatlı biber ve karnabaharda organogenesisi (Franck-Duchenne vd. 1998; Sasaki, 2002; Malabadi ve Nataraja 2007), çin lahanası protoplastlarında ise 2, 4-D ve kinetin ile hücre bölünmesini desteklediği (Nakajima vd., 1996) bildirilmiştir.

Benzer şekilde, bitki büyüme düzenleyici benzeri bir madde olan salisilik asit (SA) bitkilerde yaygın olarak bulunmakta ve bununla birlikte bitki büyüme ve gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Raskin, 1995; Klessig ve Malamy, 1994). Bitkilerde sonradan kazanılmış sistemik dayanıklılığı teşvik etmekte ve farklı abiyotik stres koşulları altındaki bitkiyi strese karşı korumaktadır. Salisilik asidin farklı bitki büyüme düzenleyicilerle kombinasyonu önemlidir. Özellikle oksinlerle birlikte kombinasyonu sağlandığında köklenme üzerine son derece etkili olmasının yanısıra *In vitro* kültürde oksinden önce uygulanması ile köklenmeye olan etkisinin en yüksek düzeyde olduğu ortaya koyulmuştur (Van der Krieker vd., 1997). Ayrıca salisilik asidin çiçeklenmeyi teşvik eden etkisinin olduğuna dair ilk bulgu, tütün doku kültürlerinde saptanmış (Lee ve Skoog, 1965), tütünün kallus kültürlerinden çiçek tomurcuğu oluşumunun gerçekleştiği belirtilmiştir (Eberhard vd., 1989).

Bununla birlikte nano bileşiklerde çalışmalarda farklı amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır. Son yapılan çalışmalarda da nano bileşiklerin tohum çimlenmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Dehkourdi ve Mosavi, 2013; Zheng vd. 2005) ancak bu çalışmalar son derece sınırlıdır. *Spinacia oleracea* L. tohumlarına TiO₂ uygulanmış ve ışık emilimini artırarak fotosentezi desteklediği, ıspanakta yaşlı tohumların canlılığını ve klorofil biyosentezini arttırdığı bildirilmiştir (Zheng vd. 2005; Hong vd. 2005; Zheng vd. 2008; Mingyu vd. 2007). TiO₂ uygulamalarının kuraklık stresi altındaki bitkilerde stresin etkilerinin azaltılabileceği düşünülmüş ve kuraklık stresine maruz bırakılan *Linum usitatissimum* bitkisine TiO₂ uygulandığında stresin etkilerinin azaldığı bildirilmiştir

(Aghdam vd., 2016). Bunu yanısıra bakteriyel kontaminasyon, bitki doku kültürü prosedürlerinde ciddi bir sorundur. TiO_2 bitki doku kültüründeki bakteriyel kontaminantları uzaklaştırmak için yararlı bir materyal olabileceği önerilebilmektedir (Safavi, 2014).

Tüm bitki türleri için evrensel bir mikroçoğaltım yöntemi olmaması ile birlikte her bitki türü ve çeşidi için özel bir sistemin optimize edilmesi gerekir. Yapılan çalışmalara bakıldığında bitki türü, kullanılan eksplant tipi, besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyiciler ve bunların konsantrasyonları farklı sonuçlar vermiştir. Bu bağlamda; bu çalışmada salep orkidelerinden seçilen türlerin *In vitro* koşullarda üretimi için kullanılacak besin ortamlarına ilave edilen farklı bitki büyüme düzenleyici ve bunların konsantrasyonları ile nano titanyum dioksitin (TiO_2) yumru oluşumu ve sürgün gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Orchidaceae familyası, yeryüzünde en geniş yayılıma sahip olmakla birlikte neredeyse otuz bin türü içinde barındıran familyalardan birisidir (Özkoç 1991, Arditti ve Ghani, 2000). Yeryüzünde orkideler yayılış gösterdiği belirli bir bölge olmadan karşımıza çıkmakta kutuplar ve çöllere dışında hemen her yerde orkide türleriyle karşılaşılabilir (Bozyel, 2014; Sandal, 2009). Gösterişli çiçekleri ile süs bitkisi olarak peyzaj alanlarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Kendilerine özgü çiçek yapıları ile dikkat çeken *Orchidaceae* familyası lif şeklinde, yumrumsu veya iplik şeklinde köke sahip olmakla birlikte farklı yaşam formları (Epifit, Litofitler, Terrestrial, Çürükçüller ya da saprofitler) olan taksonların yer aldığı çok yıllık otsu bitkilerdir. Epifit orkideler (tropik orkide), havai kökleriyle başka bitkilere tutunarak hayatını süren, fotosentez yapabilen, genellikle tropikal iklim, doğal alan veya yeterli iklimlendirmeye sahip seralarda yetiştirilebilen gösterişli çiçekleriyle dikkat çektiğinden dolayı daha çok süs bitki olarak tercih edilen orkidelerdir ve *Orchidaceae* familyasının %70 ini oluştururlar (Sezik, 1984; Renz ve Taubenheim, 1984). Litofitler, taş ya da kayalar üzerinde yaşamını süren türler olarak bilinir ve orkidelerin %5 ini oluştururlar. Çürükçüller ya da saprofitler, yeşil rengi olmayan ve canlı olmayan veya çürümekte olanların üzerinde yetişen orkidelerdir (Sezik vd., 2007). Terrestrial (karasal orkide), toprakta kök salarak toprağa bağlı olarak yaşarlar ve orkidelerin %25 ini oluştururlar. Bu orkideler ‘‘orta kuşak orkideleri’’ olarak ya da ‘‘ılıman kuşak orkideleri’’ olarak adlandırılmaktadır ve genellikle Avrupa, Akdeniz, Kafkasya ve Asya’da geniş yayılım göstermektedirler (Sezik, 1967; Sezik, 1984; Sezik vd. 2007). Ülkemizde orkide denildiğinde özellikle salep elde edilmesinde kullanılan ‘‘karasal orkideler’’ (terrestrial orchids) akla gelmektedir. Türkiye’nin coğrafi özelliklerinin sağlamış olduğu ekolojik durumu sayesinde salep orkideleri bakımından oldukça zengindir. Ayrıca bunların %13’ünün endemik, yani sadece Türkiye topraklarında yetişebilen türler olduğu bazı kaynaklar tarafından söylenmektedir (Erdem, 2004). Orta kuşak orkideleri, bitkisel yapı olarak yumru veya rizom taşımakta olmalarının sayesinde otsu olan yapılarına çok yıllık bitki olma özelliği kazandırmışlardır (Deniz, 2009). Yurdumuzda kendiliğinden yetişen karasal orkideler daha küçük çiçekleri olması ile birlikte yumrulu bitkilerdir ve bu yumrulardan salep elde edilmektedir. Ülkemiz orta kuşak orkideleri bakımından zengin ülkelerden biri olmakla birlikte, belirlenen toplam 150 adet orkide türünün (Erdem, 2004),

yaklaşık 120 tanesinden salep elde edilmektedir (Sezik vd., 2007). Salep orkidelerinin yoğun olarak bulunduğu bölgeler; Kuzey Anadolu (Kastamonu ve çevresi), Güney Anadolu (Muğla, Antalya ve Silifke çevresi), Güneydoğu Anadolu (Kahramanmaraş, Adıyaman ve Malatya çevresi), Doğu Anadolu (Van, Muş ve Bitlis çevresi) ve Doğu Akdeniz Bölgesi olduğu bilinmektedir (Sezik, 1967; Baytop ve Sezik, 1968; Sezik, 1984). Bu bağlamda Türkiye yüzyıllardır en kaliteli saleplerin üretildiği zengin topraklara sahiptir. Ülkemizde kendiliğinden doğal olarak yetişen orkidelerin yumruları uzun yıllardır salep eldesi amacıyla, hem yurt içinde kullanılmış hem de ihraç edilmiştir. Başta Almanya olmakla birlikte Avrupa'ya uzun yıllar boyunca ihracat yapılmıştır. Doğu Avrupa, Afganistan, Buhara ve Hindistan gibi birçok alanda doğal olarak yetişen salebin asıl üretim yeri her zaman ülkemiz olmuştur (Kasperek ve Grim, 1999; Kreutz, 2002; Whigham ve Willems, 2003; Işın, 2008; Hossain, 2011).

Salep antik zamanlardan beri farklı amaçlarla kullanılan orkideler, Dünya'da gıda (*Barlia*, *Dactylorhiza*, *Comperia*, *Coeloglossum*, *Epipactis*, *Goodyear*, *Gymnadenia*, *Himantaglossum*, *Limodorum*, *Listera*, *Neotinea*, *Neottia*, *Ophrys*, *Orchis*, *Platanthera*, *Serapias*, *Spiranthes*, *Aceras*, *Anacamptis*, *Cephalanthera*), parfüm olarak (*Traunsteinera*), tıbbi tedaviler amacıyla (*Orchis punctulata*) ve süs bitkisi (*Dendrobium*, *Vanda*, *Cymbidium*, *Paphiopedilum*, *Oncidium*, *Phalaenopsis*, *Cattleya*) olarak sektörde değerli bir yere sahiptir (Sandal, 2009). *Materia Medica* adlı eserin yazarı olan ünlü hekim Dioscorides salebin güç veren etkilerinden eserinde bahsetmiştir. Bunun yanında salep tıp dünyasının önde gelen hekimlerinden biri olan İbn'i Sina tarafından da kullanılmış olup salebin balgam sökücü, iştah açan, felci önleyenve afrodisyak olarak kullanılmasını tavsiye ettiği bildirilmiş ilk tıp kodeksi olarak kabul edilen *Düstürü'l Edviye*'de önemli bir eserdir (Arslan, 2012; Sezik, 1984). Ayrıca bazı hastalıklara (mukoza zarını koruması, solunum yollarının temizlenmesi, bronşit, mide ülseri) fayda sağladığı belirtilmektedir (Sandal, 2009). Tıbbi olarak kullanılan salep aynı zamanda gıda alanında da kullanılmakta geleneksel Maraş dondurmasına kıvam, tat, aroma veren, dondurmanın erimesini önleyen, oldukça önemli bir katkı maddesidir (Kreutz, 2002; Oğuz vd. 2005). Salebin kalitesini belirleyen ve en önemli bileşeni olarak bilinen, kıvam arttırma ve koyulaştırıcı özelliği sağlayan glukomannan maddesidir. Glukomannanların genellikle bitkinin kök, soğan ya da yumrularında bulunan bir hidrokolloid olduğu bilinmektedir (Vahid vd., 2011). Salep yaklaşık olarak %16-55 glukomannan, %2,7 nişasta, %12 nem ve %2,4 mineral madde içerir. Bir başka kaynağa göre salebin bileşiminde %48 müsilaj, %1 şeker, %2,7 nişasta, %5 azotlu madde ve taze

haldeyken eser miktarda uçucu yağ bulunmaktadır (Tamer vd. 2006; Sezik ve Baykal, 1988; Doğan ve Kayacıer, 2004; Sezik, 1984; Telcioğlu ve Kayacıer, 2007; Şen, 2016). Salep glukomannanı, 3 mol mannoz ve 1 mol glikozun birbirine β (1-4) bağı ile bağlanması ve polimerleşmesiyle meydana gelen, 50 kat su absorblayabilen viskoz liflerden olan, ve bu sayede gıda endüstrisinde jelleştirici, kıvam arttırıcı ve emülsifiye edici olarak değerlendirme alanının geniş olduğu özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir (Farhoosh ve Riazi, 2007; Chen vd. 2005; Keithley ve Swanson, 2005). Sezik (1967) glukomannan oranlarının Maraş salebinde %11,62, Antalya salebinde %40,12, Kastamonu salebinde %39,88, Muğla salebinde %44,04, Silifke salebinde %41,02 ve Van salebinde ise %17,69 olarak tespit edildiğini bildirmiştir. Benzer amaçlarla yapılan bir başka araştırmada glukomannan oranının *Ophrys mammosa* türünde %17,69 ve *Serapias vomeracea* türünde ise %44,83 olduğu saptanmıştır (Tekinşen vd., 2009). Salep orkidelerinin hepsi salep eldesi için uygun olmamakla birlikte ülkemizde yetişen 9 cinsten 25'i salep eldesi için kullanılmaktadır. Genellikle *Aceras* (*A. anthropophorum*), *Anacamptis* (*A. pyramidalis*), *Barlia* (*B. robertiana*), *Dactylorhiza* (*D. iberica*, *D. osmanica*), *Himantoglossum* (*H. affine*), *Ophrys* (*O. bombyliflora*, *O. ferrumequinum*, *O. fusca*), *Orchis* (*O. anatolica*, *O. coriophora*, *O. italica*, *O. laxiflora*, *O. morio*, *O. pallens*, *O. palustris*, *O. pinetorum*, *O. provincialis*, *O. purpurea*, *O. sancta*, *O. simia*, *O. spitzelii*, *O. tridentata*), *Serapias* (*S. vomeracea*), *Neotinea* (*N. maculata*) salep elde edilmesinde kullanılmaktadır (Erzurumlu ve Doran, 2011). Salep eldesi amacıyla *Orchis sancta* L. ve *Serapias vomeraceae* türleri Ege Bölgesinde en çok talep edilen ve yetiştirilen orkide türleri olduğu bilinmektedir (Tutar vd., 2013).

Bu sebeble her yıl milyonlarca orkide yumrusu tahrip edilerek bir sonraki yıl meydana gelecek olan bitki yok edilmektedir. Bu bağlamda salep eldesi için kullanılan orkide türlerinin toplanması ve ticaretine yönelik tedbirler kapsamında yapılan hukuki düzenlemeler neticesinde ihracı yasak bir ürün olmuş, fakat iç piyasadaki ticareti doğadan toplanmasına engel olamamıştır. Doğadan tahrip edilen her yumru ile yeni meydana gelecek bitki ve bu bitkinin üreteceği çok sayıdaki tohumun oluşmasında engellenmektedir. 1000-4350 adet yumru doğadan tahrip edilerek 1 kg salep elde etmek için kullanıldığı belirlenmiştir (Özhatay, 2000). İç piyasadaki ticaret amacıyla üretilen salep miktarının 20 ile 45 ton civarında olduğu, bunun içinde 40 ile 180 milyon adet bitkinin toplandığı tahmin edilmektedir (Sezik, 1984). Günümüzde artan talebe bağlı olarak bu kapsamdaki birçok

salep orkidesi türü ülkemizde doğadan toplama yolu ile elde edilip iç piyasaya sürülmektedir.

Bu bağlamda tedbir alınması amacıyla Türkiye’de öncelikli olarak BERN “Avrupa’nın Yaban Hayatı ve Yaşama Ortamlarının Korunması Sözleşmesi” 09.01.1984 tarih ve 84/7601 sayılı Bakanlar Kurulu Kararıyla onaylanarak, 20.02.1984 tarih ve 18318 sayılı Resmî Gazete’de yayınlanmıştır. Daha sonra CITES “Nesli Tehlikede Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme” 27 Eylül 1994 tarihli ve 4041 sayılı Kanun ile onaylanması uygun bulunan bu sözleşme, 27 Nisan 1996 tarihli ve 96/8125 sayılı Bakanlar Kurulu Kararıyla onaylanarak, 20 Haziran 1996 tarih ve 22672 sayılı Resmî Gazete’de yayınlanmıştır. Nesli tükenme altında olan salep orkidelerinin korunması amacıyla devlet tarafından oluşturulan hukuksal tedbirler, 1974 yılında salep türlerinin ihracının yasaklanması ile başlamıştır. *Orchidaceae* familyasının bazı türleri BERN sözleşmesinin ekinde (Ek-1) kesin olarak koruma altına alınan flora türleri içinde yer almakta ve aynı zamanda CITES sözleşmesinin ekinde (Ek-2), henüz tam olarak neslinin tükenmesi tehlikesinin olmamasına rağmen, hayatta kalabilmelerine engel teşkil eden kullanımdan kaçınmak için bu türlerin ticaretinin kesin kurallara bağlanmadığı takdirde nesli tükenebilecek olan türler kategorisinde yer almaktadır (Kasperek ve Grim, 1999; Whigham ve Willems, 2003; Kayıkçı ve Oğur, 2012; Pant, 2013; Ghorbani vd. 2014).

Salep bitkisinin toplanması ve ticareti önemli bir ekonomik değeri teşkil etmekte fakat yapılan yoğun sökümler nedeniyle nesillerinin tükenmesi tehdidi söz konusudur. Doğal kaynak niteliğindeki türlerin sürdürülebilir olabilmesi, gen, tür ve toplam zenginliğinin korunması açısından kültüre alınması gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

Orchidaceae familyası toprak altında yumru (yuvarlak, parçalı ve elips şeklinde), kök veya rizom bulunduran, farklı yaşam formları olan (epifit, litofit, karasal ve parazit), çiçek durumu başak, rasem veya panikül şeklinde ya da çiçekler tek olarak bulunan çok yıllık otsu bitkilerdir. Çiçek yapıları ile dikkat çeken familyalardan biri olmakla birlikte çiçekler iki eşeyli ve zigomorftir, periyant tipik 6 segmentli olup iki daire üzerine üçerli şekilde dizilmiştir. Meyve kapsül şeklinde olup higroskopik bakımdan hassas olan 3-6 tane ve uç kısımları bitişik durumda bulunan kapillar şeklinde açılır (Davis, 1984; Sezik, 1984). Orkide cinslerinin ayırımında yumruların büyüklükleri ve şekil yapısı en önemli belirleyicidir. Toprakta yaşayan fotosentetik orkideler ototroftur. Toprak altı organları yumru, kök ve rizom olarak farklılık gösteren ılıman kuşak ya da karasal orkideler olarak bilinen türlerin yumruları genellikle birbirine yapışık ve iki adet olarak bulunmasıyla birlikte bitki gelişimi

sayesinde yeni yumru da gelişmektedir. Yeni yumru sonraki yılın generatif kısımlarını oluşturmaktadır (Sezik, 1984). Salep orkidelerini de içinde barındıran *Orchidaceae* familyasına ait türler generatif ve vejetatif olarak üretilebilmektedir. Generatif çoğaltımda türlere göre değişkenlik gösteren ancak çok küçük iriliklere sahip, 0,25-1,2 mm uzunluğunda, 0,09-0,27 mm genişliğinde ve ağırlıkları ise 0,3-1,4 µg olan tohumlar kullanılmaktadır. Orkidelerin tohumları çok küçük boyutta ve endospermi olmamasıyla bilinmekte ve çimlenmesi için gerekli en uygun nem, sıcaklık, ışık, oksijen ve toprak şartları olsa dahi, mikorizal mantarlarla enfekte olmadan, çimlenme gerçekleşmemektedir (Sezik, 1984; Arditti, 1967). Orkide tohumları endosperm (besi doku) bulundurmadığı için tohumların düştüğü yerde embriyonun çimlenebilmesi için mikorizal fungusların bulunması ve tohumun bunlarla enfekte olması gerekmektedir (Arditti vd., 1996). Orkide tohumlarının çimlenmesinde mikorizal fungusların önemli rolü olduğunu Noel Bernard 1899 yılında kesin olarak bildirmiştir (Özdener, 1994). Ancak funguslar orkide bitkilerinin ilk gelişme döneminden sonraki gelişme evrelerinde, bitki çimlenip geliştikten sonra fotosentez yapma yeteneğine kavuştuğu için, çok küçük bir öneme sahiptirler (Withner, 1974). Mikorizal fungusların orkide tohumlarının çimlenmesi için önemli olmasına rağmen çimlenmeden sonra protokormun oluşabilmesi ve büyümeye başlayabilmesi için de türle uyumlu olması gerektiği belirtilmiştir (Leake, 1994; Peterson vd. 1996). Bununla birlikte, 1900'lü yılların başlarına kadar karasal orkide tohumlarının mikorizal bir etki olmadan çimlenemeyeceği düşünülmeye rağmen, Knudson mikoriza olmadan orkide tohumlarının mineral ve şeker içeren basit bir besin ortamında çimlenebildiğini göstererek salep tohumlarının *In vitro* ortamda çimlendirilmesinin önünü açmıştır.

1900'lü yılların başlarında geliştirilen bitki doku kültürü; aseptik ve kontrollü bir ortam altında besin maddeleri içeren tanımlanmış katı veya sıvı ortam üzerinde totipotent hücrelerin, dokuların ve organların büyümesini ve çoğalmasını içermekle birlikte süs bitkilerinin üretiminde önemli bir role sahiptir (Saljooghian vd., 2010). Doku kültürünün temel amaçları arasında Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak sayılabilmektedir. Bu nedenle bitki doku kültürleri genetik iyileştirme çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda nesli tükenmekte olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde, çeşitli doku kültürü yöntemleri rutin olarak uygulanır.

Bitki doku kültürü işlemlerinde genetik iyileştirmelerde kullanılan temel sistem bitki rejenerasyonudur. Bitki rejenerasyonu, kültürü yapılan hücrelerin özellikleri itibarıyla

organize olmuş meristematik hücreleri ihtiva eden somatik dokulardan rejenerasyon, meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon ve mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon olarak üç grupta incelenebilmektedir. 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 de 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; Bektaş, 2014).

Bitki doku kültürleri; türler arası melezlemelerden sonra embriyo kültürü, haploit bitki üretimi, somaklonal varyasyon, *In vitro* seleksiyon, *In vitro* döllenme, germlazm muhafazası ve protoplast füzyonu gibi başlıca bitki ıslahı uygulamalarında kullanılmaktadır. Bitki ıslahının yanı sıra, bitki doku kültürleri ticari alanlarda da kullanılmaktadır. Özellikle hastaliksız bitki üretimi, sentetik tohum üretimi, mikroçoğaltım, sekonder metabolitlerin üretimi ve kimerik bitkilerin oluşturulmasında ilk başvurulan ve sıklıkla kullanılan yöntemdir (Bektaş, 2014).

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 besin 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. Bunun yanı

sıra *In vitro* üretim yöntemleri, kullanılan eksplantın özelliğine göre (embriyo, sürgün, kök, kallus, polen tanesi vb.) adlandırılmakla birlikte eksplantların alındığı anaç tipinin genotipi de mikroçoğaltımın başarısını etkileyen faktörlerden biridir. Endosperme sahip olmayan ve çok küçük boyutlarda tohumlara sahip salep orkidelerinin çimlenme zorluğunun yaşanmasına karşın, doğada çimlenebilmeleri için funguslarla simbiyotik yaşam içinde oldukları (Ingold ve Hudson, 1993); fakat *In vitro* üretim yöntemlerinin kullanılmasıyla mikorizal funguslara ihtiyaç duyulmadan da çoğalabilecekleri vurgulanmıştır (Ruglup vd., 1989). Salep orkidelerinin mikroçoğaltımları üzerine yapılan vejetatif üretimde farklı yöntemler (*In vitro*, *In vivo*, simbiyotik, asimbiyotik koşullar) ve eksplant tiplerinin (tohum, yumru gibi) kullanıldığı çalışmalar mevcuttur.

Harvais ve Hadley (1967), *In vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olan *Orchis purpurella* bitkisine ait tohumların çimlendirmesi üzerine yapılan çalışmada, farklı içeriklere sahip temel besi ortamları, saf su ve agar kullanılarak tohumların çimlenme gelişimi incelenmiştir. Bunun sonucunda çimlenme oranının ışık ile engellendiğini de bildirmişler fakat sterilizasyonun süre olarak uzatılması ve sıcaklığın yüksek olması ile çimlenmenin doğru orantılı olduğunu vurgulamışlardır.

Van Waes ve Debergh (1986) *In vitro* koşullarda 23 adet Batı Avrupa orkidesinde tohum çimlenme denemelerinin yapıldığı çalışmada, 20-25°C sıcaklığın çimlenme için en uygun sıcaklık olduğu, bunun yanısıra 6°C ve 40°C'de bile çimlenen orkide türlerinin olduğu bildirilmekte bununla birlikte çimlenme için uygun sıcaklığın 23°C olarak kabul edildiği belirtilmektedir.

Rasmussen vd. (1990) *Dactylorhiza majalis* tohumlarının çimlenmesi üzerinde sıcaklığın etkilerini araştırmış ve araştırma sonuçlarına göre simbiyotik çimlenme oranının asimbiyotik ortamdaki çimlenmeye göre daha fazla ve oluşan bitkilerin daha büyük olduğunu; bununla birlikte simbiyotik şartlarda 23-25°C sıcaklığın üzerinde önemli derecede azalma kaydedilmiş, asimbiyotik şartlarda ise 23°C'de çimlenme oranının %21 olduğunu saptadıklarını bildirmişlerdir.

Gönülşen (1983) yapmış olduğu çalışmada *Orchis anatolica* türünü materyal olarak kullanmıştır. Birçok araştırmacı gibi doğal yetişme ortamında orkidelerin tohumlarının çimlenmesinin zor olduğundan bahsetmiş ve çimlenmenin gerçekleşebilmesi için çeşitli besin maddeleri ve bitki büyüme düzenleyicileri ile birlikte, doğal yetişme ortamlarında olduğu gibi bazı funguslarla enfekte edilmesinin yardımcı olabileceğinin altını çizmiştir.

Araştırma da *In vitro* koşullarda *Orchis anatolica* türünün farklı bitki kısımlarını kullanarak denemeler oluşturmuş ve olumlu sonuçlar elde edilemediğini belirtmiştir. Bununla birlikte *In vitro* da elde edilen kültürlerde hiçbir gelişme olmadan canlılığını yitirdiği bildirilmiştir.

Rasmussen vd. (1991) *Listera ovata* türüne ait olgunlaşmamış embriyo ve tohumları ile simbiyotik ve asimbiyotik *In vitro* çimlendirme çalışması yapmışlardır. Simbiyotik çalışmadaki embriyolardan bütün aşamalarda protokorm elde edilmesine rağmen asimbiyotik kültürde sadece bazı belli aşamalarda başarı elde edilmiş ve bunun sonucunda ise çimlenmesi zor orkide türlerinin üretimi ve uygun fungus tespiti için olgunlaşmamış embriyoların inokulasyonun önerildiği bildirilmiştir.

Gönülşen vd. (1996) tarafından yapılan Ege ve Doğu Akdeniz Bölgesinde arazi çalışmaları ile örnekler toplanmış ve Ege bölgesinden alınan türlerin embriyo kültüründe *O. laxiflora*, *O. sancta* ve *S. vomeracea* türlerinde başarılı sonuç meydana gelirken Doğu Akdeniz Bölgesinden toplanan örneklerden ise *O. anatolica*, *O. bornmuelleri*, *S. vomeraceae* ve *O. coriophora* orkide türleri embriyo kültüründe başarılı bir şekilde üretim meydana gelmiştir. Sürgün ucu kültüründe *H. affine* ve *O. anatolica* orkide türlerinde başarı sağlanmış ancak oluşan fazlaca kararmalardan dolayı bitki elde edilemediği bildirilmiştir.

Çağlayan vd. (1997) salep elde etmek için en fazla kullanılan ve Kahramanmaraş'ta yetişen bazı orkidelerin *O. bornmuelleri*, *O. coriophora*, *R. ficaria* ve *S. vomeracea* olduğunu belirlemişler ve bununla birlikte *In vitro* da yaptıkları sürgün ucu kültüründen bir sonuç alınamamasına rağmen *Himantaglossum affine* ve *Orchis anatolica* türlerinde ise çoğaltma başarılı olmuş, *O. anatolica* türünde bitki oluşumu gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Andronova vd. (2007) *In vitro* koşullarda *Dactylorhiza maculata* tohumlarında çimlendirme yapmışlar ancak bitkilerin homojen bir şekilde gelişmediğinin gözlemlemişlerdir. Laboratuvar koşullarından dış koşullara alınan 13 ve 18 aylık olan bitkiler laboratuvar koşullarında yeniden kültüre alınmış ve bununla birlikte dış koşullardaki 13 aylık bitkilerin canlılık oranı %8 iken 18 aylık bitkilerde ise bu oran %30 olarak saptandığını belirtmişlerdir. Laboratuvar koşullarındaki bitkilerin çimlenmeden sonra canlılık oranları %45 ile 13 aylık bitkilerde ve %83 ile 18 aylık bitkilerde olduğu bildirilmiştir.

Salep orkidelerinde çimlendirme çalışmalarında sadece tohum kullanılmamış bunun yanısıra polen ve polliniumlarının da çimlendirildiği çalışmalar mevcuttur. Bu amaçla

Aybeke (2002) tarafından yapılan çalışmada, *In vitro* da salep orkidelerindeki polen ve polliniumların (kılıfla sarılı polen keseleri) çimlenmesi incelenmiş ve polenlerde çimlenmenin geneli çoğu kapalı tohumlardaki gibi olduğu, poliniumlarda ise, kese içindekilerde çimlenme olmayıp sadece besin ortamı ile temasta olanlarda çimlenme olduğu gözlemlendiği bildirilmiştir.

Orkide tohumlarının *In vitro* koşullarda çimlendirilme çalışmalarında yüzey sterilizasyonu önemli bir aşamadır. Yüzey sterilizasyonu sayesinde hem kültür yapıldıktan sonra inkübasyon aşamasında kontaminasyonun önlenmesi hem de tohum kabuğunun kırılması sağlanması amaçlanmaktadır. Bu bağlamda orkidelerin tohumlarının *In vitro* çimlendirilmesi sırasında kullanılan yüzey sterilizasyon çözeltileri değişiklik göstermektedir. Kullanılan sterilizasyon çözeltileri arasında kalsiyum hipoklorit bulunmaktadır (Warren, 1981). Yapılan bir çalışmada orkide tohumlarının çimlenme oranı üzerine tohum kabuğunun çimlenmeyi zorlayıcı etkiye sahip olduğunu bildiren araştırmacılar, yüzey sterilizasyonunda kullanılan %5'lik kalsiyum hipoklorit+ 1-2 damla Tween-80 çözeltisinin doz ve bekletilme süresinin, çimlenme üzerine olumlu etkisinin olmasıyla birlikte tohum kabuğu oldukça sert ve engelleyici olan sert kabuklu türlerde bekletilme süresinin uzatılması ile tohum kabuğu aşındığı tespit edilmiş bu şekilde çimlenmenin pozitif yönde etkilendiğini belirtmişlerdir (Van Waes ve Debergh, 1986). Snow (1985) *In vitro* koşullarda orkide tohumlarına uygulanan yüzey sterilizasyonu çalışmalarında tohumların 24 saat süreyle şekerli suda bekletildikten sonra 30 dakikalık süre ile %3'lük hidrojen peroksitin (H_2O_2) kullanıldığını bildirmiştir.

Orkide tohumlarının yüzeysel sterilizasyonunda kullanılan bir diğer çözelti sodyum hipokloritin tohumların toplu halde kümelenmesini önleyen bir kimyasal yapıda olması nedeniyle sterilizasyonda kullanılan diğer kimyasallara göre daha çok tercih edilmektedir (Özkoç ve Dalcı, 1991). Bir araştırmada Clements vd. (1986) konsantrasyon ve bekletilme süresi ile sodyum hipoklorit orkide tohumlarının çimlenmesi üzerinde farklı etkilere sahip olabileceği nedeniyle çimlenme için en etkili konsantrasyon ve bekletilme süresinin saptanması gerektiğinin altını çizmiştir. Bu bağlamda *Serapias vomeracea* türünün tohumlarına uygulanan yüzey sterilizasyonunun çimlenmeye üzerine ne gibi şekilde etkilerinin olduğunun araştırıldığı çalışmada %10, %20, %30'luk sodyum hipoklorit 5, 10, 15, 30, 45 ve 60 dakika uygulanmıştır. Bunun sonucunda en iyi çimlenmeler VWD-N ortamında en yüksek %50,3 ile 5 dakika %20 sodyum hipoklorit uygulamasından elde edilirken bunun devamında %25,4 ile 10 dakika %30 sodyum hipoklorit uygulamasında ve

%21,7 ile 30 dakika %10 sodyum hipoklorit uygulamasından elde edildiği bildirilmiştir (Özkoç, 1991). Yapılan bir çalışmada, *O. sphegodes* ve *Ophrys apifera* türlerinin köklerinden izole ettiği fungal izolatlarla tohum çimlendirme çalışması yapılmış ancak başarı elde edilememiştir. Sodyum hipoklorit çeşitli konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde uygulanmış bununla birlikte çimlenme oranı üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonucunda tohumların %1,5 'lik sodyum hipoklorit içinde 15 dakika bekletilmesinin sterilizasyon için yeterli olacağını belirtilmiştir (Aytaş, 1994). Yapılan bir başka çalışmada ise *Dactylorhiza iberica* türünün tohumlarının çimlenmesi üzerine farklı sodyum hipoklorit dozlarının etkilerini araştırılmış ve sonuç olarak %17,7 oranı ile en yüksek çimlenme %1'lik sodyum hipoklorit konsantrasyonundaki solüsyonda 20 dakika uygulanmasıyla bulunmuştur. *Dactylorhiza urvilliana* tohumlarında ise %70,4 oranı ile en yüksek çimlenme %1'lik sodyum hipoklorit konsantrasyonunun 10 dakika uygulanmasında meydana geldiği belirtilmiştir (Özdener, 1994). *In vitro* koşullarda üretilerek saksılı bitki olarak kullanımına ilişkin *Dactylorhiza majalis* türünde yapılan çalışmada, tohumların sterilizasyonu %1 Tween-80 + %5 NaOCl (sodyum hipoklorit) çözeltisinde 5 dakika süre ile bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Tohumlar 3 g/lit toz yulaf içeren kültür ortamına ekilmiş ve bu ekimden 6 hafta sonra çimlendikleri bildirilmiştir. Sonuç olarak materyal olarak kullandıkları türden izole edilerek sağladıkları fungal izolatlarla yapılan çimlendirme de sağlıklı protokorm meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte *Goodyera repens* bitkisinden elde edilen izolatla %80 oranında çimlenme gerçekleştiği de bildirilmiştir (Jorgensen, 1998). Farklı bir çalışmada ise Yararbaş (2008) yaptığı çalışmada *In vitro* da salep orkideleri tohumunun çimlenmesi için %20'lik şeker 1/10 MS ortamına karıştırılmış ve buna ek olarak ultrason uygulaması da yapıldığını belirtilmiştir. *Orchis italica* ve *Ophrys tenthredinifera* 4 dakika ultrason uygulaması yapılmıştır. Araştırma da %1 konsantrasyonundaki sodyum hipokloritte çözeltisinde tohumların 10 dakika muamele edildiği belirtilmiştir. *Orchis italica*'da sodyum hipoklorit ile muamele edilmesinin yanında yapılan ultrason uygulamasında çimlenme %81 oran ile 15 günde ve kontrol uygulamasında %89 ile 90 günde meydana geldiği bildirilmiştir. *Orchis italica*'nın çimlenme süresi kontrole göre 6 kat kısalmış ancak çimlenme yüzdesi bir miktar azalmıştır. Çimlenme gözlemlendikten 2 ay sonra ilk yaprakların meydana geldiği vurgulanmıştır. *Ophrys tenthredinifera*'da 4 dakikalık ultrason uygulaması sonucunda çimlenme meydana gelmemiştir fakat 5 dakika şok ve ultrason uygulamasından %5,3 oranında çimlenme 60 gün sonra meydana geldiğini belirtmiştir.

Harvais'e (1973) göre asimbiyotik kültür ortamında çimlenmenin gerçekleşebilmesi için ortamın çeşitli organik maddeler ile zenginleştirilmesinin gerektiğini ve tohum çimlendirilmesi için ise sukroz, glukoz gibi bilinen şeker formları ile başka şekerlerin de pozitif yönde etkilerinin olacağı vurgulanmaktadır. Bununla birlikte *In vitro* çimlendirme çalışmalarında, birçok araştırmacı tarafından dekstroz ve sakkarozun karbon kaynağı olarak orkide tohumları için kullanıldığı bildirilmiştir. Yetiştirme ortamına ilave edilen şekerin oranlarının belirli şekilde yükseltilmesiyle büyüme de artış olduğu, artan şeker konsantrasyonu ile ise çimlenme ve büyümenin engellendiği belirtilmiştir. *In vitro* çalışmalar sonucu meydana gelen bitkiler için glukoz, mannoz, maltotrioz, maltopentoz kullanılabilir (Ernst ve Arditti, 1990).

Van Waes ve Debergh (1986) *In vitro* koşullarda 23 adet Batı Avrupa orkidesinde tohum çimlenme denemelerinin yapıldığı çalışmada, *Epipactis helleborine* tohumlarının sadece inorganik azot içermeyen ortamda çimlenebilmesine rağmen ilerleyen süreçleri içinde inorganik azota ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir. Embriyonun büyümesinde ihtiyacı olan azotu kültür ortamına takviye edilen bazı aminoasitlerden temin ettiğini açıklamış ve bunların NH_4NO_3 'ün yerine kullanılabileceğini bildirilmiştir. Bunun yanısıra tohumların çimlenmesinin ilk aşamalarında inorganik azotun ihtiyaç duyulmadığı hatta bazı şekerler formlarının yoğun konsantrasyonlarda kullanımıyla çimlenmeyi zorlaştırdığı belirlenmiş, çimlenme ve gelişme bakımından sakkarozun diğer şeker formlarına göre daha etkili olduğu, fakat galaktoz ve mannitolün çimlenmeyi negatif şekilde etkiledikleri bildirilmiştir. Ayrıca bazı yoğun konsantrasyonlu şeker formlarının orkide tohumlarının çimlenmesinin zorlaştırmasının yanısıra çimlenme için kullanılan ortamlar arasında en uygun olan ortamın Van Waes-Debergh ortamı olduğunun altı çizilmiştir.

Başka bir çalışmada *In vitro* da *Orchis sancta* L. türünde çoğaltılması amaçlanmış olup bu bağlamda çimlendirme için Van Waes Debergh ortamı kültür ortamı olarak kullanılmıştır. Besin ortamına kontrol (0), 20, 40, 60, 80 ve 100 olarak konsantrasyonlar belirlenip sukroz, glukoz, maltoz, galaktoz ve fruktoz formundaki şekerler eklenmiştir. Bu sonuçlara göre en yüksek çimlenme ortalama %77,85 ile 40 g/l konsantrasyonunda Maltoz; en düşük çimlenme ise ortalama %44,36 ile 100 g/l konsantrasyonunda Galaktoz ortamlarından elde edildiği belirtilmiştir. Protokorm oluşumunda ise en yüksek ortalama değer %68,53 ile 100 g/l konsantrasyonunda Sukroz; en düşük ortalama değer %25,33 ile 100 g/l konsantrasyonunda Fruktoz ortamlarından sağlanmıştır. En yüksek sürgün oluşum oranı %13,30 ile 40 g/l konsantrasyonunda Sukroz ortamında meydana gelmiştir. Sonuç

olarak çimlenme süresinin 12,5-21,3 gün; protokorm oluşum süresinin 22,5-50,8 gün ve sürgün oluşum süresinin 50,6-105,3 gün aralıklarında olduğu saptanmıştır (Bozdemir, 2016).

Genel olarak epifit orkideler (başka bitki üzerinde havai kökleriyle yaşayanlar) daha yoğun ortamlarda; karasal orkideler ise seyreltik ortamlarda daha iyi çimlenmektedir. Asimbiyotik kültür ortamı, doğada epifit orkidelerin beslendiği ağaç özütlerinin bileşiminden çok daha yoğundur (Harvais, 1973). Farklı orkide türlerinde azot kaynağı ve katkı maddesi olarak aminoasitler kültür ortamına ilave edildiğinde değişik etkiler görülebilmektedir (Harvais, 1982). Bu bağlamda yapılan bir araştırmada, yoğun ve seyreltik besin ortamlarında *Serapias vomeracea* ve *Orchis laxiflora* türlerinin tohumları ekilmiş ve hem yoğun hemde seyreltik ortamda çimlenmenin olduğunu gözlemlenmesine rağmen sadece yoğun besin ortamında gelişmenin devam ettiğini belirtilmiştir. Ayrıca besin ortamından inorganik azotun çıkarılması ile çimlenmede yükselme olduğunu saptamışlardır (Özkoç ve Dalcı, 1991). Doku kültüründe *Orchis morio* ve *Dactylorhiza majalis* türlerinde mikorizal fungus ile çimlenmiş, bununla birlikte düşük azot ile büyümenin hızlandığı; daha yüksek azot ile *Ceratobasidium* fungusunun *D. majalis*'te büyümeyi zorlaştırdığı vurgulanmıştır (Dijk, 1990).

Sazak (2004) *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* ve *Spiranthes spiralis* türlerin tohumlarının asimbiyotik ve simbiyotik koşullarda çimlenmelerinin üzerine yapılan çalışmada yüzey sterilizasyonu amacıyla kullanılan çözeltilerin yoğunluğunun ve uygulama süresinin türlere göre farklılık gösterdiğini vurgulamıştır. *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* ve *Spiranthes spiralis* türlerinin çimlenmesinde fungal izolatlar kullanılmış ve bunun sonucunda asimbiyotik koşullarda oluşan çimlenmelerde inorganik azot, *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* türünde azaltan etkiye neden olduğu saptanırken *Spiranthes spiralis* türünde ise inorganik azot arttıran etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Diğer bitki türlerinde olduğu gibi salep orkidelerinde de *In vitro* kültürde başarıyı etkileyebilecek en önemli faktörlerden biri de kullanılan besin ortamlarıdır ve besin ortamlarına eklenen bazı bitki hormonlarının kombinasyonları, mikorizal fungus ya da bitki ekstraktları (patates ve hindistan cevizi sütü) gibi maddelerin bulunmasıyla yararlı bir etki sağladığı belirtilmektedir (Hadley ve Harvais, 1968). Besin ortamlarına eklenen kimyasal maddelerden yeterli sonuç alınmadığı zamanlarda besin ortamına pepton, hindistan cevizi sütü, muz ve patates ekstraktı gibi bazı doğal bileşiklerin eklendiğini ve çimlenme üzerinde olumlu etki yaptıklarını bilinmektedir. Ayrıca besin ortamına ilave edilen pyridoksine ve

thiamin gibi vitaminlerin özellikle sürgün gelişimini ve yaprak büyümesini olumlu yönde etkilemesi şeklinde belirtilmiş olmasına rağmen vitaminlerin bazı tohumların çimlenmesi üzerine negatif etki yapabileceği de bildirilmiştir (Arditti ve Harrison, 1977).

Çeşitli orkide türlerinde *In vitro* çimlendirmede bitki büyüme düzenleyicilerin çimlenme üzerine etkilerini incelemişler ve bunun sonucunda *Cypripedium calceolus* ve *Epipactis helleborine* türlerinde çimlenme için bir sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicilere gerek olmasına rağmen *Dactylorhiza maculata* ve *Listera ovata* tohumlarının çimlenmesi için herhangi bir bitki büyüme düzenleyiciye katkısına gerek olmamıştır. Çimlenme için kullanılan kimyasal maddelerden pozitif sonuç alınamamasına rağmen besin ortamlarına hindistan cevizi sütü, muz ekstraktı, patates ekstraktı, pepton ve kazeinhidrolizat gibi çeşitli doğal yapıları takviyeler yapılması orkide tohumlarının çimlenmeyi pozitif yönde etkilediği saptanmıştır (Van Waes ve Debergh 1986).

Orchis laxiflora ve *Ophrys sphegodes* türlerinin *In vitro* çimlenmesi amacıyla bir araştırmada vitamin ve azot kaynaklarının etkilerini incelemişlerdir. Türler arasında ufak farklılıklar görülmüş fakat NH_4NO_3 içeren bazal besin ortamı kullanılıp sakkaroz, organik azot ve vitaminler eklenmiştir. Türlerin tohumları bu ortama ekilmiştir. Bu çalışma sonucunda iyi gelişimler ortaya çıkmıştır. Tohumlarda yüksek oranda çimlenme ve bitkicik gelişimi elde edilmiştir. İyi gelişmeler olmasına rağmen bitkide yaşanan kararmalar dolayısıyla canlılıklarını kaybetmelerine sebep olmuştur. Bitkilerde en iyi gelişimler türlerin ikisinde de karanlıkta meydana gelmiştir. Ancak sekiz ay sonra bazı beyaz protokormlar kararır bitkiler canlılığını yitirmiştir. *O. sphegodes* tohumlarından oluşan bir protokorm bir bitkicik oluşumu, yeni bir protokorm oluşumu ve bazen de kallus benzeri oluşumları geliştirmiştir. *O. laxiflora* türünde köklü ve sağlam bitkiler meydana gelirken *O. sphegodes* türünde kök ve %50 oranında 1 cm boylarında yumru oluşumu meydana geldiği bildirilmiştir. Besin ortamına eklenen vitaminler arasında thiamine'in *O. laxiflora* türü için gerekli olduğu bildirilmiştir (Mead ve Bulard, 1975).

Karakuş (2015) çalışmada *Anacamptis pyramidalis* (L.), L.C. Rich, *Serapias vomeracea* Burm.fil., *O. coriophora*, *O. italica*, *O. sancta* orkidelerinin *In vitro* şartlarda çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki rejenerasyonunu etkileyen faktörlerin araştırılması üzerine çalışma yapmıştır. Salep tohumlarının yüzey sterilizasyonunda minimum kontaminasyon ve maksimum canlılık elde edilebilmesi için sterilizasyon öncesi ön optimizasyon çalışmaları oluşturulmuş ve yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlarda besin ortamına %0,02 $AgNO_3$ eklenerek kontaminasyonun en aza indirilebilmesi amaçlanmıştır.

Temel besin ortamı olarak basit inorganik tuzlar seçilmiş, çimlenme ve protokorm oluşumu süresince farklı Tripton, maya özütü, kasein hidrolizat, aminoasit solüsyonu gibi azot kaynakları içeren ortamlarla modifiye edilmiştir. Tohum ekiminden 10, 30 ve 50 gün sürelerinde alınan verilere göre değerlendirildiğinde protokorm oluşturma oranı %28 ile tripton içeren ortamda *S.vomeracea* türü, %48 ile *O.sancta* türü ve %48 ile *O.coriophora* türü olarak saptanmıştır. Elde edilen protokormlar alt kültüre alındıktan ve yaklaşık 1 ay süre geçtikten sonra %96 verimle *O.sancta* ve %98 verimle *O.coriophora* türünde bitki elde edilmiştir. Ancak *O.italica* ve *A.pyramidalis* türlerinde tohumlar canlılık özelliği göstermemiş, çimlenme ve protokorm oluşumu sağlanamadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte protokorm oluşumu gözlenmiş olan *S.vomeracea* türünde ise bitki oluşumu için alt kültür esnasında kontaminasyon nedeniyle kaybedildiği bildirilmiştir.

Doku kültüründe daha çok Murashige ve Skoog (1962) tarafından geliştirilmiş MS ortamı yüksek tuz içeren ve en yaygın kullanılan bir ortamı olmasıyla birlikte orkidelerde yapılmış çalışmalara bakıldığında VWD (Van Waes & Debergh), KC (Knudson-C), ORC (Orchimax) gibi besin ortamları da kullanılmıştır. Bu besin ortamlarına çeşitli doğal bileşikler(hindistan cevizi sütü, pepton, muz, patates ekstraktı ve kazeinhidrolizat gibi) ilave edilerek modifiye yapılmış çalışmalarda mevcuttur. Bu bağlamda Hatipoğlu vd. (1984) *In vitro* koşullarda *Orchis sancta* ve *Anacamptis pyramidalis* türlerinin çimlendirilme çalışmasını yapmışlar ve araştırmada üç değişik besin ortamı (Burgeff, Voth ve Fast) kullanmışlardır. Araştırmanın sonuçlarına göre 20 gün geçtikten sonra tohumlardan protokorm oluşan ortam Burgeff ortamı olmuştur ve oluşan bitkiler 30 güne yakın zaman sonra intermedica kültür solüsyonuna aktarılarak yaprak oluşumu meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ancak araştırmada aktarmaya kadar geçen sürede başarı sağlanabildiği belirtilmiştir.

Barroso vd. (1990) yaptığı bir çalışmada Curtis kültür ortamında *Ophrys lutea* Cav. ve *Ophrys fusca* Link türlerinin tohumlarını çimlendirmiştir. Tohumların ekiminden yaklaşık 60 gün sonra protokormlar gözlemlenmiş, bununla birlikte başka bir orkide ortamına alınmıştır. Protokormlar yeni orkide ortamına aktarıldıktan sonra 60 günde bitki oluşumu meydana geldiği belirtilmiştir.

Özkoç (1991) *O. laxiflora* ve *S. vomeracea* türlerini materyal olarak kullanmış ve simbiyotik kültür için en uygun ortamın yulaf besin ortamı olduğunu belirtmiştir. Fungal izolatlarla yapılan çalışmada en iyi çimlenme oranı %30,6 oranı ile yulaf ortamında, %9,1 oranı ile modifiye yulaf ortamında meydana gelmiştir. *In vitro* tohum çimlendirme

çalışmalarında ise en yüksek çimlenme oranının inorganik azot içermeyen, VWD, MS ve Knudson ortamları arasında olduğunu belirtmiş, fakat protokorm gelişimi gözlenemediğini bildirmiştir. En iyi çimlenme sonucu %53,8 oran ile MS-N ortamında olduğu belirtilmiştir. *Orchis laxiflora* ile yapılan çalışmada ise %13,4 oranı ile VWD-N ortamında çimlenme elde edilmiştir.

Gümüş vd. (2008) salep orkidelerinin tohumlarını çalışmalarında materyal olarak kullanmışlardır. Sterilizasyon işlemi olarak %10'luk sodyum hipoklorite 1-2 damla Tween-20 ekleyerek oluşturdukları solüsyonda 10 dakika bekleterek gerçekleştirmişlerdir. Sterilizasyonu tamamlanan tohumlar daha sonra MS, ½MS, VWD ve KC besin ortamlarında *In vitro* kültürü gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda *Dactylorhiza nieschalkiorum* türünde en yüksek çimlenme meydana geldiği belirtilmiştir. Besin ortamına göre en yüksek çimlenme oranının VWD ortamından elde edildiği saptanmıştır. Türler bazında besin ortamlarının etkisine bakıldığında ise en yüksek çimlenmenin *D. nieschalkiorum* türünün VWD besin ortamındaki kültüründen meydana geldiği bildirilmiştir. Bunun yanısıra en yüksek protokorm oluşumunda yine aynı tür olan *D. nieschalkiorum*'dan elde edildiği vurgulanmıştır.

Valletta vd. (2008) *Orchis mascula* türünden elde edilen tohumları *In vitro* koşullarda yaptıkları çimlendirme çalışmasında materyal olarak kullanmışlardır. Bu bağlamda çeşitli besin ortamları ve sterilizasyon yöntemleri kullanmışlardır. Sterilizasyon yöntemlerinin tohum kabuğu geçirgenliğine ve çimlendirme yeteneği üzerine etkisinin belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışmada 6 farklı besin ortamı kullanılmıştır. Bu besin ortamları arasından, çimlenmenin en yüksek olduğu besin ortam Orchimax ticari besin ortamı olarak saptanmıştır. Tohum kabuğunun kırılması için değişik uygulamalar yapılmış H₂SO₄ kimyasalı farklı konsantrasyonlar ve bekletme süreleri uygulanarak tohumun şişmesi sağlanmıştır. Bununla birlikte tohumlara 2 ay süreyle uygulanan 4-8°C sıcaklık çimlenmeyi pozitif yönde etkilediği belirtilmiştir. Sürekli bir şekilde karanlık koşullarda bırakılan tohumlarının çimlenmesinin engellendiği bildirilmiş, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık uygulamasının tohumlarda 1 ayda şişme ve 3 ayda köksü yapı oluşumu gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Bunun devamında 4-5 ayda sürgün ucu meydana gelmiş ve 5-6 ayda ise ilk yaprak oluşumu gerçekleştiği belirtilmiştir.

Kısakürek vd. (2009) *In vitro* koşullar da çimlendirme çalışması yapmışlar ve bununla birlikte *O. coriophora*, *O. laxiflora*, *H. affine*, *O. anatolica* ve *O. mascula* türlerinin tohumlarından yararlanılmıştır. Bu çalışmada VWDB, PF, KC olarak üç farklı besin ortamı

kullanılmış ve KC ortamına *O. coriophora* türünün tohumları ekilmiş, bunun sonucunda KC en yüksek çimlenme oranının görüldüğü besin ortamı olmuştur. Ayrıca *O. coriophora* türünü *O.laxiflora* ve *O.anatolica* türleri takip etmiş olmasına rağmen *O.mascula* türünün çimlenme oranı diğer türlere göre düşük kaldığı saptanmıştır. Bunun yanısıra *H. affine* türünde üç farklı besin ortamında da çimlenme saptanamadığı bildirilmiştir.

Doğu Anadolu bölgesinde yetişmekte olan bazı salep orkidelerinin tohumlarının *In vitro* ve *In vivo* koşullarda simbiyotik ve asimbiyotik kültüre alınmasıyla çimlenme, protokorm oluşturma ve sürgün elde etmeyi amaçlayan araştırmada *D. iberica*, *D. umbrosa* ve *O. palustris* türlerinin simbiyotik kültüründe sürgün oluşumu gözlemlenmesine rağmen yumru ve kök oluşumu sağlanamadığını belirtmiştir. Asimbiyotik kültür için VWD, KC, MS, ½MS ve 1/10MS ortamı kullanılmış ve bunun sonucunda oluşan sürgünlerde görülen en yüksek köklenme oranı *D. umbrosa* türünde ½MS ortamında meydana gelmiştir. Bununla beraber en fazla yumru oluşturma oranı *O. straussii* türünde VWD ortamından elde edildiğini bildirilmiştir. Ancak dışa aktarım için yeterli büyüklüğe ulaşan köklü ve yumrulu sürgünler aklimatizasyon sonucunda geçen zamanda canlılıklarını yitirdiği belirtilmiştir (Çığ, 2012).

Kemeç (2015) yapmış olduğu tez çalışmasında salep orkidelerinin *In vitro* koşullarda doku kültürü yöntemi ile çoğaltılarak tekrar doğaya kazandırılmasını amaçlamıştır. Çalışmada, Nisan ve Mayıs aylarında Çanakkale ilinin farklı konumlarından dört farklı salep orkide türlerini toplamıştır. Bu bitkiler laboratuvar koşullarında saksılara aktarılmış ve *A. morio subsp. morio* türünün tohumları doğal ortamlarında geliştikleri için direkt toplanmış, bu tür dışındaki diğer türlerden kendileme yolu ile tohum elde edilmiştir. Tohumlar yüzeysel sterilizasyon sonrasında Svante Malmgren'in özel ortamı (SV), Knudson-C (KC) ve Orchimax (ORC) olarak üç farklı besin ortamında kültüre alınarak gelişmeleri izlenmiştir. Bu besin ortamlarının materyal olarak kullanılan tüm salep orkidesi türleri üzerindeki çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişimi üzerindeki etkileri ortaya konmuştur. Sonuç olarak çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişimi açısından en iyi besin ortamının dört farklı tür içinde SV ortamı olduğu belirlenmiş ve %94,0 oranı ile en iyi çimlenen tür *A. morio subsp. morio*, %70,42 oranı ile en iyi protokorm oluşturan tür *A. morio subsp. morio* ve %55,87 oranı ile en iyi bitki gelişimi olan tür *A. morio subsp. morio* olarak saptanmıştır. *In vitro* ortamda başarılı bir şekilde protokormdan yumru geliştiren *A. pyramidalis*, *A. morio subsp. morio* ve *D. romana* türlerinin yumruları dış ortama aktarma

sonucunda kendi yetiştikleri bölgeden alınan toprağın içine %25'er oranda kuartz kum ve ağaç kabuğu eklenerek aktarıldıkları bildirilmiştir.

Kemeç vd. (2015) yapmış oldukları çalışmada, bazı salep orkidelerinin *In vitro* kültürde polen ve polliniumların çimlenmesi üzerine araştırma gerçekleştirmiştir. Bu amaçla KC, Orchimax ve özel bir ortam olan Svante Malmgren besin ortamlarını kültür ortamı olarak kullanmışlar ve daha sonra $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta 24 saat inkübe edilmiştir. Çimlenmiş olan polen Brilliant Blue ile boyanmıştır ve stereoskopik mikroskop altında incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre *Ophrys mammosa* türünde en iyi polen çimlenme oranı meydana gelmiş bununla beraber en iyi besin ortamı Orchimax olduğunu bildirmişlerdir. Polliniumlarda en iyi çimlenme oranı %69 ile *Ophrys mammosa* türünde meydana gelmiştir. Ayrıca Malmgren besin ortamının polliniumlar için en iyi besin ortamı olduğu vurgulanmıştır. Gerçekleşen çimlenmelerin özellikle polliniumların besin ortamı ile temas eden kısımlarında, polenlerde ise uç kısımlarında meydana geldiğinin altını çizmişlerdir.

Çeşitli besin ortamlarına eklenen farklı ekstraktların kullanıldığı çalışmalara bakıldığında ise Özdener (1994) yapmış olduğu çalışmada çeşitli konsantrasyonlarının *Dactylorhiza iberica* tohumlarının çimlenmesine etkilerini incelemiş ve sonuç olarak %17,7 ile en yüksek çimlenmeyi 20 dakika uygulanan %20 konsantrasyonundaki NaOCl solüsyonunda bulurken, *Dactylorhiza urvilliana* tohumlarında ise %70,4 ile en yüksek çimlenme %20'lik sodyum hipoklorit konsantrasyonunun 10 dakika uygulanmasında gerçekleştiğini belirtmiştir. Kültür ortamı olarak VWB besin ortamı tercih edilmiş ve ortama makro element, mikro element, vitamin, kompleks katkı maddesi (patates ekstraktı), aminoasit, şeker, ve inorganik azotun ilave edilmesi veya ilave edilmemesiyle modifiye edilen VWD besin ortamları kombinasyonları oluşturulmuştur. Protokormlar oluştuktan sonra diğer ortamlara aktarılmıştır. Asimbiyotik çimlenmede seyreltik ve seyreltik olmayan daha yoğun ortamlar kullanılmış ve bunun sonucunda seyreltik kültür ortamına ilave edilen şekerin ise çimlenmeyi negatif etkilediği gözlemlenmiştir. Yoğun VWD kültür ortamı bitki gelişimi için önemli bulunmuştur ve bu ortamın modifiye edilerek hazırlanan kombinasyonlarında organik azota ve şekere ihtiyaç duyulduğun saptanmıştır.

Özsavcı (1995) tarafından yapılan çalışmada, bazı salep orkidesi türlerinde embriyo kültürü ile farklı besin ortamlarında yumru oluşturmayı amaçlanmıştır. Sonuç olarak yumru elde etmede *O. anatolica* ve *Orchis coriophora* orkide türlerinde başarı sağlandığı belirtilmiştir. En olumlu sonuçların *O. coriophora* türünde ise domates ekstraktı ve aktif

karbon ile kombinasyon oluşturulan VWD ortamında, *O. anatolica* orkide türünde ise herhangi bir ekleme yapılmamış VWD besin ortamından elde edildiği belirtilmiştir.

Özavcı ve Çağlayan (1998) yapmış oldukları çalışmada *In vitro* da embriyo kültürü ile *O. anatolica*, *O. coriophora* L., *O. bornmuelleri*, *O. phrigra*, *S. vomeraceae* ve *H. affine* türlerinden alınan embriyolarını farklı besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Çalışmanın sonucunda en fazla çimlenme oranı %2,39, protokormdan bitki oluşum oranı %1,86 ve en fazla yumru oluşum oranı ise %2,45 olarak VWD+ domates ekstraktı ve aktif karbon bulunan besin ortamında saptanmıştır.

Çağlayan vd. (1998) doku kültüründe salep orkidelerinin embriyolarında gerçekleştirdikleri araştırmalarında çeşitli kültür ortamları kullanılmıştır. *Orchis coriophora* türünde en fazla çimlenme ve en fazla bitki oluşum oranının meydana geldiğini bildirmişlerdir. Kültür ortamları bakımından değerlendirildiğinde en yüksek çimlenme 58 günde %2,29 ve protokormdan oluşan bitkicik sayısı 156 gün süresinde domates ekstraktı ve aktif karbon ile kombinasyonu oluşturulmuş olan VWD kültür ortamından meydana geldiği saptanmıştır. Bununla beraber Knudson ortamı kullanılmış ve %10 oranlarında patates, domates ve salep yumrularından elde edilen ekstraktlar da kullanılmıştır. Kontrol uygulamaları haricinde bütün ortamlarda aktif kömür (1 g/l) ilave edildiği belirtilmiştir. Araştırmada *Orchis coriophora* ve *Orchis anatolica* türlerinin embriyo kültürlerinde en iyi sonuç veren türler olduğu tespit edilmiş ve bu türlerin yumru oluşturma potansiyellerine bakılmış ve bununla birlikte en yüksek ortalama %2,45 ile *Orchis coriophora*'nın yumru oluşturduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak *In vitro* da meydana gelen *Orchis coriophora* bitkiciklerini dış ortama aktardıktan sonra %20'sinin yaşadığını bildirmişlerdir.

Benzer şekilde bitki ekstraktlarından yararlanılarak oluşturulan besin ortamlarına kültüre alınan *Vanda roxburgii* tohumlarının çimlendirme uygulamalarında 200 mg/l patates ekstraktı ilavesi ile oluşturulan besin ortamında %78,24 oranında tohum çimlenmesi meydana geldiği belirtilmiştir. Bununla birlikte 100 mg/l patates ekstraktı ilave edilerek oluşturulan kültür ortamında ise aynı ebat ve özelliklere sahip köklü sürgünlerin meydana geldiğini bildirmiştir (Islam vd., 2011).

In vitro üretimde en önemli faktörlerden bir diğeri ise besin ortamlarına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicileridir. *In vitro* ortamda kültüre alma çalışmalarında besin ortamına bitki büyüme düzenleyicileri eklenerek besin ortamı kombinasyonları oluşturulabilmektedir. Bitki hormonları bitki bünyesinde sentezlenen, organik yapılı,

sentezlendiklerinde bitki bünyesinde etkili olacağı yere taşınan, büyüme ve gelişmeyi teşvik eden, engelleyici olabilen, durabilen ya da yönlendirebilen kimyasal maddelerdir (Baktır, 2010). Bu doğal ve yapay hormonlar daha geniş kapsamlı olarak “Bitki Büyüme Düzenleyici Maddeler (BBDM)” ya da “Bitki Büyüme Düzenleyicileri (BBD)” olarak adlandırılmaktadır (Gerçekçioğlu vd., 2008). Bitki büyüme düzenleyiciler içinde yer alan oksin, gibberellin, sitokin, inhibitörler ve etilen grubu genel olarak hücre bölünme, hücre uzaması, hücre farklılaşma, cinsiyet belirleme, organ oluşumu, metabolizma oluşumu, biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı dayanıklılığı teşvik etmektedir (Eken ve Şirin, 2016).

İlk keşfedilen bitki büyüme düzenleyicileri oksinlerdir. Daha sonra, gibberellinler, sitokinler, absisik asit ve etilen tanımlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin işlevlerine bakıldığında Oksinler; köklenmenin teşvik edilmesi, apikal dominansi, ışığa yönelme, yan sürgün gelişiminin baskılanması, hücre gelişimi, kallus oluşumunun uyarılması, hücre süspansyonlarının eldesi ve somatik embriyo oluşumu, bununla birlikte sitokinlerle kombinasyonunda kallus oluşumu, organogenez ve somatik embriyo oluşumunu teşvik eder. En yaygın IBA, IAA, 2,4-D, NAA olan formları kullanılır. Sitokinler; hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, rejenerasyon ve sürgün çoğaltımı, çiçeklenmenin geciktirilmesi, yaprak dökümünün engellenmesi, sürgünlerde köklenme ve embriyogenezin engellenmesi, çimlenmenin artırılması, yaşlanmanın geciktirilmesi için kullanılırlar. BAP/BA (benzilaminopürin/6benziladenin), KIN (kinetin), Adenin Sülfat, 2iP (izo pentil adenin), TDZ (thidiazuron), Zeatin yaygın kullanılan formlarıdır. Gibberellinler; bitkilerde çiçeklenmenin artırılması, meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılması, sürgün boyunun uzaması, kallus gelişimini, organogenez ve adventif kök oluşumunun engellenmesi için kullanılır ve GA₃ (Gibberellik asit) en yaygın kullanılan formudur. Absisik Asit; en çok bilinen şekli ABA (Absisik asit) ve somatik embriyoların olgunlaşması, yaprak ve meyve dökülmesi (absisyon), dormansi, stomaların kapanması için kullanılır. Etilen; meyve olgunlaşması, senesens ve yaprak absisyonunun teşvik edilmesi, yüksek derişimlerde, mikrotübül ve mikrofibrillerin yerleşimlerini etkileyerek, hücre uzamasının azaltılıp, hücre genişlemesinin artırılmasını sağlamak, *In vitro* kültürlerde alt kültür sonrasında büyüme ve organogenezin inhibe edilmesi, kallus ve süspansiyon kültürlerinde büyüme, gövde ve kök uzaması, aksillar ve adventif tomurcuk oluşumu, embriyogenez için kullanılmaktadır (Gaspar vd. 1996; Haberer ve Kieber, 2002; Bektaş, 2014).

Hadley ve Harvais'e (1968) göre *Orchis purpurella*'nın kültür ortamına ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; GA₃'ün protokorm ömrünü arttırmış olmasına rağmen protokorm sayısını ve protokorm büyüklüğünün üzerine bir etkisinin olmadığı bununla beraber IAA'nın çimlenmeyi engellediği ve protokormları uzattığı; kinetinin hem tek hem de IAA ile kombinasyonunda büyüme ve gelişme üzerinde kesin bir etkisinin olduğu; adeninin ise çok az etkisinin olduğu bildirilmiştir. Arditti ve Harrison'a (1977) göre ise salep orkidelerinin dahil olduğu grup olan karasal orkidelerin tohumlarının çimlenmesi üzerinde en pozitif etkisi olan bitki büyüme düzenleyicilerin sitokin grubuna ait olan bitki büyüme düzenleyiciler olduğu belirtilmiş olmasına rağmen, bitki büyüme düzenleyicilerin çimlenme üzerindeki etkilerinin oldukça farklı olabileceğini, aynı bitki hormonunun bir orkide türünde pozitif etkiye sahip olmasına rağmen diğerlerinde negatif etkiye sebep olduğu bildirmiştir.

Farklı besin ortamlarına eklenen bitkisel kaynaklı ekstraktlara ilave olarak bitki büyüme düzenleyiciler eklenerek çeşitli kombinasyonlar oluşturulan kültür ortamları kullanılarak yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu şekilde Önal (1999) tarafından yapılan çalışmada Ege Bölgesi'nden topladığı bitkileri materyal olarak kullanmış ve gerçekleştirdiği embriyo kültüründe *Orchis sancta*, *Serapias vomeracea* ve *O. laxiflora*'dan olumlu sonuç aldığını bildirmiştir. Besin ortamı olarak VWD ve KC ortamlarını kullanmış ve bu ortamlara farklı konsantrasyonlarda patates ekstraktı, muz ekstraktı, hindistan cevizi sütü, 0,2 mg/l GA₃, 1 mg/l BAP ilave ederek farklı ortamlar oluşturulmuştur. %0,6'lık sodyum hipokloritte 15-20 dakikada tohumların yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. *Orchis sancta* tüm kültür ortamlarında en az 4 haftada çimlendiği belirtilmiştir. %100 başarı ile en iyi sonuç Knudson + %10 patates ekstraktından elde edilmesine rağmen bitki büyüme düzenleyicileri uygulamalarının hemen hemen bütün türlerde ve besin ortamı kombinasyonlarında olumlu bir sonuç vermediği bildirilmiştir. *O. laxiflora* türü %10 patates ekstraktı bulunan KC ortamında %80 oran ile en yüksek protokormdan bitki oluşturma oranına sahip olurken; *O. sancta* türünde yine aynı ortamdan %100 oran ile bitki oluşumu sağlanmıştır. *S. vomeracea* türünde ise %10-20 muz ekstraktı bulunan KC ortamında %40 oran ile protokormdan bitki oluşumu elde edilmiştir. *O. laxiflora* türü %10 Hindistan cevizi sütü bulunan KC besin ortamında; *O. sancta* türü %20 patates ekstraktı bulunan KC ortamında ve *S. vomeracea* türü ise 0.2mg/L GA₃ nin eklenmesiyle oluşturulan VWD besin ortamı kombinasyonundan en iyi sonuç meydana geldiği bildirilmiştir. Bitkilerin bir kısmı 24°C ve 16 saat/gün ışık, diğer yarısı da 5°C'de ve karanlık koşullarda tutulmuşlardır. *Orchis*

sancta ve *O. laxiflora* türleri 5°C sıcaklık ve karanlık uygulamasında başarı göstermiştir. Dış ortama aktarılan %9,1 oranı ile *Orchis sancta*'da, %12,9 oranı ile *Orchis laxiflora*'da sürgün oluşumu meydana geldiği bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada 1 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, %2 sukroz ve 2 g/l pepton ilave edilerek VW (Vacin ve Went, 1949) besin ortamının kombinasyonları oluşturulmuş *Vanda teres* orkidesinin tohumlarını kullanarak çimlendirilmesi amaçlanmıştır. Kültür ortamına alınan tohumlardan 40-45 gün sonra çimlenme elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmada %10 hindistan cevizi suyu ilave edilen kültür ortamından sürgün oluşumu meydana gelmiştir. Oluşan sürgünlerin gelişimleri ve çoğaltımları sağlanmış bununla birlikte 2 g/l muz ekstraktı ve 100 mg/l kazein hidrolizat ilave edilmiş ½MS besin ortamında aynı boyutlardaki kök oluşumu gözlemlenen sürgünlerin meydana geldiği belirtilmiştir (Sinha ve Roy, 2004). Benzer şekilde yapılmış başka bir çalışmada Chen vd. (2007) tohum çimlendirme denemesi için *In vitro* koşullarda olgunlaşmamış *Phalaenopsis* tohumlarını kullanılmış ve yapılan bu denemelerin sonucunda en iyi besin ortamı şeker (20 g/l) ve aktif kömür (1 g/l) içeren 1/3 MS ortamına 2 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA + 50g/l muz püresi ilave edilmesiyle oluşturulan besin ortam kombinasyonunda meydana geldiği belirtilmiştir.

Bu çalışmalar haricinde farklı besin ortamlarına sadece bitki büyüme düzenleyicilerle desteklenen besin ortamları oluşturulmuştur. Bitki büyüme düzenleyicilerin birbirleri ile kombine edilip etkilerinin artırılması yönünde yapılmış araştırmalar vardır. Çoğunlukla temel besin ortamı olarak Murashige & Skoog ortamı ve bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları kullanılmış olmasına rağmen Van Waes&Debergh, Knudson C, Orchimax gibi besin ortamlarının kültür ortamı olarak kullanılıp olumlu sonuçlar alındığı yapılan çalışmalarla görülmüştür. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada bazı salep orkidelerinde tohumlar farklı sürelerde sodyum hipokloritli çözeltilerde muamele edilmesinin gelişim üzerinde farklı etkiler yarattığı yönünde bulguya rastlanmamasına rağmen tohumlar kültür ortamına ekilmelerinin üzerinde 3 ay geçtikten sonra, 2 mg/lt IAA ilave edilmesiyle oluşturulan Bürobet ve KC besin ortamı kombinasyonlarından elde edilen KC ortamına aktarılmış ve protokorm oluşumunun başladığı gözlemlendiği bildirilmiştir. Takip eden 15 gün sonra da yeşil sürgün gelişimi gözlemlendiği bildirilmiştir (Süberoğlu, 1987).

Modifiye edilen KC ve Burgeff Eg-1 ortamlarına farklı türlere ait tropikal orkide tohumları *In vitro* da kültüre alınmıştır. Tohumlarda çimlenmeler meydana gelmiştir. Araştırma sonunda en iyi çimlenme Burgeff Eg-1 ortamında meydana gelmiş olup; kültür

ortamlarına ilave edilen 1 ppm NAA hormonu ile oluşturulan kombinasyonların köklenmeye pozitif yönde etkileri olduğunun altını çizmişlerdir (Das ve Ghoshall, 1989).

1,0 mg/l BAP ve 0,1 mg/l NAA ile desteklenmiş MS ortamında, eksplant olarak filizlenen tomurcuklar kullanılarak tehdit altındaki bir tıbbi orkide olan *Orchis latifolia*'nın *In vitro* sürgün çoğalması elde edilmiştir. Aynı ortam üzerinde protokorm benzeri yapılar da üretilmiş ve *In vitro* olarak yetiştirilen sürgünler, aralıklı alt kültür olmadan 10°C'de 10 aydan fazla başarıyla korunabilmiştir (Sharma ve Chandel, 1996).

In vitro koşullarda *Orchis laxiflora* Lam. türüne ait tohumların asimbiyotik olarak çimlendirilmesi ve bitki gelişimi amaçlanmış ve bununla birlikte en uygun besin ortamı bileşimini belirlemek üzere denemeler kurularak çalışmalar yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar 3 ay sonra kültürlerdeki çimlenme oranı, protokorm oranı ve 11 ay sonraki bitki gelişme oranlarını gözlemlemişlerdir. Temel besin ortamı olarak MS, 1/2MS, VWD, KC besin ortamları kullanılmış ve bu ortamlara 0, 0,1, 0,5 mg/l olacak şekilde GA₃'ün farklı dozları ilave edilmiştir. Kültürler ilk 3 ay boyunca karanlıkta inkübe edilmiş, bu sürenin sonunda 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyodik koşullara alınmıştır. 3 ay sonunda protokorm oranları stereomikroskop altında incelenmiş ve bu sürecin ardından 4 haftada bir alt kültürü yapılmış ve bu ortamlar için 1/2MS kullanılmıştır. KC ile VWD besin ortamlarından en yüksek çimlenme oranı, protokorm oranı ve bitki gelişme oranı meydana gelmesine rağmen GA₃ uygulamaları çimlenmeyi engelleyici etkide bulunduğu bildirilmiştir (Gümüş ve Ellialtıoğlu, 2005).

Wotavová-Novotná vd. (2007) doku kültüründe çimlendirilen *Dactylorhiza* türlerinin şeker ve büyüme düzenleyicilerin, sürgün ve kök büyümesini önemli ölçüde etkilediğini belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada glukoz ve sakkarozun çimlenmeyi uyarıcı etkisinin olduğu belirlenmiş, sürgünün büyüklüğü ve uzunluğunun N6-(2-isopentenil) adenine ve N6-benziladenin ile IBA'nın kombinasyonu ile arttığı, kök büyüme ve kök uzunluğunun NAA ve IBA uygulaması ile arttığı saptanmıştır.

Gümüş (2009) *In vitro* ve *In vivo* koşullarda Batı Karadeniz'de yetişen salep orkidelerinde çoğaltım olanaklarının geliştirilmesi amaçlanan çalışmada salep orkidesi tohumlarının doku kültürü koşullarında çimlendirilmesi için bazı salep orkidesi türleri bitki materyali için kullanılmıştır. 1/2 MS, MS, VWD, KC, KC-N gibi çeşitli besin ortamlarına 0, 0,1, 0,5 mg/l konsantrasyonlarında GA₃ eklenerek besin ortamları kombinasyonları oluşturulmuştur. Bununla birlikte kültür süresince ilk bir ay veya ilk 3 ay karanlıkta tutma

ve ardından fotoperiyodik düzene aktarma gibi çeşitli aydınlatma uygulamaları gerçekleştirilmiştir. *In vitro* kültüre alınan tüm türlerde çimlenme ve protokorm elde edildiği bildirilmiştir. En fazla bitki oluşum oranı KC ortamında *O. morio*'da %89,88; *S. vomeraceae*'da %57,6; *O. coriophora*'da %48,3 ve *O. laxiflora*'da %14,5 değerleriyle elde edilmiştir. *D. nieschalkiorum*'da %19,8'lik bir değerle 0,5mg/l GA₃+KC kombinasyonu olan besin ortamından meydana gelmiştir. Bitkiler en fazla birkaç ay içerisinde canlılıklarını yitirdiklerinden dolayı dış koşullara aktarmada bir başarı sağlanamamış olduğu bildirilmiştir.

Başka bir çalışma da *Dactylorhiza nieschalkiorum*, *Orchis mascula* ve *Orchis tridentata* türlerine ait tohumların çimlendirilmesi üzerine uygulamalar yapılmıştır. Besin ortamı olarak ½ MS ve KC ortamlarına 0,1 mg/l GA₃ eklenerek, besin ortamından azot kaynağının eksiltilmesi etkileri incelenmiştir. Tohum ekiminden sonraki ilk 3 ay tamamen karanlık veya ilk 30 gün karanlıkta, sonraki 2 ay fotoperiyodik düzende aydınlatılan koşullarda tutulması gibi farklı ışıklandırma uygulamasının çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişim oranları üzerindeki etkileri araştırılmış ve bunun sonucunda *Dactylorhiza nieschalkiorum* Bauman et Künkele.; *Orchis mascula* (L.) L. ssp. *pinetorum* (Boiss et Kotschy) Camus ve *Orchis tridentata* Scop. türlerinde çimlenme meydana gelmiştir. Sadece *Dactylorhiza nieschalkiorum* Bauman et Künkele türünden bitki gelişimi meydana gelirken *Orchis tridentata* Scop. türünde protokorm oluşumu gözlenmemiştir. Karanlık koşullarda protokorm oluşumu daha yüksek oranda gerçekleştiği bildirilmiştir (Ellialtıoğlu ve Gümüş, 2011).

Palaz vd. (2011) bazı salep orkidesi türlerinin doğal alanından toplayarak yaptıkları çalışmada orkide tohumlarının doku kültüründe çimlenmesinin gerçekleşmesi için KC besin ortamına 1 mg/l GA₃ eklenerek oluşturulmuş olan ortamlarda kültüre alınmıştır. Tohumlar ilk olarak 24°C sıcaklıkta iki hafta karanlık ortamda tutulmuş daha sonra yine aynı sıcaklıkta 16 saatlik fotoperiyotta iklimlendirme kabininde kültüre alınmıştır. Bunun sonucunda *Orchis sancta*, *Orchis coriophora*, *Dactylorhiza romana*, *Dactylorhiza iberica* türlerinde çimlenme meydana gelirken *Ophrys apifera* türünde çimlenmenin gerçekleşmediği belirtilmiştir. Yaklaşık 2 haftada *Orchis sancta* tohumlarında çimlenme meydana gelirken, 14 haftada *Dactylorhiza romana* türünde gerçekleştiği belirtilmiştir. Tohumların çimlenme yüzdeleri karşılaştırıldığında en yüksek çimlenme yüzdesi %30 oranıyla *Orchis sancta* tohumlarında meydana geldiği bildirilmiştir.

Roy vd. (2011) *Vanda coerulea* tohumlarını *In vitro* koşullarda çimlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmalarında MS besin ortamı kullanmışlardır. Bu besin ortamına 5,36 µM NAA, 3,8 µM BAP ve Phytamax ilave etmişlerdir. Bunun sonucunda protokorm oluşumu meydana gelmiş ve ayrıca 3 g/l aktif kömür eklenmesiyle sürgün oluşumu meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Orchis coriophora L. *In vitro* tohum çimlenmesi, protokorm gelişimi ve yeni bitki oluşumu üzerine yapılan bir çalışmada olgun tohumlar farklı dozlarda oksin ve sitokinlerle desteklenerek 4 farklı bazal ortamda kültüre alınmış ve en yüksek çimlenme oranı %44,2 ile aktif kömür ve 1 mg/l IAA içeren Orchimax besin ortamında görülmüştür. Protokormdan bitkicik oluşumu için en uygun ortam aktif kömür ve 0,25 mg/l BA ile takviye edilen Orchimax besin ortamında olduğu bulunmuştur (Bektaş vd., 2013).

Bektaş (2014) *Orchidaceae* familyasına ait türlerden olan *Orchis sancta* ve *Serapias vomeracea* doku kültüründe çoğaltımı ve oluşan bitkilerin dış koşullara adaptasyonu bununla birlikte sentetik tohumlarının üretilmesi ve çimlendirilmesi amaçlanarak yapılan doktora çalışmasında *O. sancta* ve *S. vomeracea* olgunlaşmış tohumlarının asimbiyotik çimlendirilmesinde en iyi besin ortamının *O. sancta* ve *S. vomeracea* türünde aktif kömür içeren Orchimax besin ortamı olduğu bildirilmiştir. Farklı bitki hormonlarının ve bunların çeşitli dozlarının çimlenme üzerindeki etkilerine bakılmış, en yüksek çimlenme 1 mg/l ZEA içeren besin ortamında *O. sancta* da ve 2 mg/l BA içeren besin ortamında *S. vomeracea* da meydana geldiği belirtilmiştir. En uzun sürgün 53,24 mm ile *O. sancta* ve 42,88 mm ile *S. vomeracea*'de 0,25 mg/l TDZ içeren besin ortamlarında meydana gelmiştir. Yaprak oluşumunda en etkili besin ortamlarının *O. sancta*'da 1 mg/l ve 2 mg/l KİN içeren besin ortamlarında, *S. vomeracea*'de ise 2mg/l IBA içeren besin ortamlarında saptanmıştır. *O. sancta* ve *S. vomeracea*'nin köklerinin oluşumunda ve uzamasında yüksek dozlardaki IBA'nın etkili olduğu bildirilmiştir. Besin ortamlarından 2 mg/l ZEA içeren ortamların türlere ait tuberlerin oluşmasında ve bu tuberlerin içerdikleri glukomannan miktarlarında daha olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. Doku kültüründe gelişen her iki türe ait bitkilerin dış koşullara adaptasyonları başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Oluşturulan sentetik tohumlar ise besi ortamlarında ve dış koşullarda yüksek oranlarda çimlendirilmiş ve bu çalışma sonucunda *O. sancta* ve *S. vomeracea*'nin bitki doku kültürü yöntemiyle üretilbildiğini belirtmiştir.

Bektaş (2016) *Dactylorhiza urvillenana*'nin *In vitro* da çoğaltılmasının amaçlandığı çalışmasında materyal olarak tohumlar kullanılmıştır. Tohumlar çimlendikten sonra oluşan

protokormlar, farklı zeatin dozları ilave edilen aktif kömür içeren Orchimax besin ortamında organogenesis teşvik edilerek sürgün uzaması ve kök sayıları belirlenmiş ve bununla birlikte çimlenme, protokorm oluşumu ve kallus oluşumunda en iyi sonucu aktif kömür içeren Orchimax besin ortamında meydana geldiği saptanmıştır. Bu besin ortamdaki çimlenme oranı %62,39, protokorm oluşum oranı %73,18 ve kallus oluşum oranı %8,6 olarak belirlenmiştir. Farklı üzerine etkilerine bakıldığında ise, 1 mg/l zeatin dozlarının bulunduğu besin ortamlarında sürgün uzaması ve kök sayısı üzerine pozitif sonuçlar alındığı belirtilmiş ve bu ortamdan meydana gelen sürgün boyunun 36,05 mm ve kök sayısının 3,4 adet olarak bildirilmiştir.

Salep orkidelerinin *In vitro* üretimi konusunda yumrulardan sürgün meydana getirmek için de çalışmalar yapılmıştır. Ekinoğlu (2017) tarafından salep orkidelerinden *Orchis laxiflora* bitkisinin mikroçoğaltımı amaçlanan bu çalışmada yumrulardan elde edilen sürgünler eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. MS (Murashige Skoog) besin ortamı kullanılmıştır. Farklı konsantrasyon ve sürelerde yüzey sterilizasyonu uygulanan yumrular MS besin ortamlarına ekildikten 45 gün sonra sürgünler elde edilmiş ve bu sürgünler 0,5 mg/l ve 1 mg/l BAP ile NAA, P, IAA, IBA ve 2,4D bitki büyüme düzenleyicilerin farklı doz ve kombinasyonlarının olduğu MS besin ortamlarına dikilerek yumru oluşumu açısından incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda 30 gün sonra yumru oluşmaya başlamış ve yumru oluşumu açısından en iyi sonuç alınan dozlar 0,5 mg/l BAP ile 0,05 mg/l NAA bitki büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonu ile sağlanmasına rağmen en az etkiye sahip bitki büyüme düzenleyiciler ise 2,4D ve IBA olduğu bildirilmiştir.

Barlia robertiana salep orkidesinin tohumlarının *In vitro* koşullarda çimlendirilmesi üzerine araştırmalar yapılmıştır. Tohum sterilizasyonu için %25 ve %50 konsantrasyonlarında 2 farklı sodyum hipoklorit çözeltisi uygulanarak, farklı dozlarda Kinetin, BAP ve NAA eklenmiş MS, ½MS ve OAM (Orchimax) temel besin ortamlarına kültüre alınmışlardır. Çalışmada *Barlia robertiana* tohumları, aydınlık ortam, 1 ay karanlık ortam, 2 ay karanlık ortam ve 3 ay karanlık ortam olarak farklı fotoperiyot uygulamaları yapılmış ve bununla birlikte tohum çimlenmesine etkisine ve protokorm oluşturma oranları incelenmiştir. Sonuç olarak ½MS + 4 mg/l Kin + 0,5 NAA ortamından en yüksek çimlenme ve protokorm oluşumu meydana gelmiştir. Tamamen aydınlık ortamda ve sterilizasyonu %50 sodyum hipoklorit çözeltisi ile yapılmış olan uygulama sonucunda 19 adet protokorm oluşumu ile en iyi sonuç alınmıştır. Farklı uygulamalar olmakla birlikte en iyi çimlenme oranı ve en çok protokorm oluşturma oranı ½MS + 4 mg/l Kin + 0,5 NAA besin ortamı

olarak saptanmıştır. En fazla protokorm oluşumu 3 ay karanlık kültür ortamında meydana gelirken en yüksek çimlenme oranı 3 ay karanlık ortamda gözlemlendiği bildirilmiştir (Ağar, 2018).

Tohumla çoğaltımda karşılaşılan sorunlardan ve sürecin uzamasından dolayı doku kültüründe gerçekleştirilen çoğaltım son derece önemlidir. Yapılan çalışmalara bakıldığında ortama ilave edilen bazı bileşiklerin çoğaltım üzerine olumlu etkileri olmasına rağmen halen ticari anlamda üretimin gerçekleştirilebileceği bir metot geliştirilememiştir.

Son yıllarda süs bitkilerinde de kullanılan oksin, sitokinin, gibberellik asit gibi klasik hormonların yanı sıra bitki büyüme düzenleyici madde olarak kabul edilen salisilatlar, brassinosteroidler kullanımında artış yaşanmaya başlanmıştır (Eken vd., 2019). Bu bileşikler; güzel koku salgılama, hastalık ve böcek zararlarına karşı dayanıklılığı arttırmada, çiçeklenmeyi teşvik etmede, termojenik ve koku üreten bitkilerin çiçeklenmesinde, kök oluşumunu hızlandırmada kullanılabilir (Eken ve Şirin, 2016). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, brassinosteroidlerin bitkilerde büyüme, gelişme, cinsiyet belirleme ve üreme üzerinde güçlü bir modifiye edici etkisi olduğunu göstermiştir (Charnysh vd., 2016).

Jasmonatlar (JA veya MeJA), bitkilerde çeşitli proteinlerin sentezlenmesi, rizogenezin uyarılması ve kallus oluşumunun geciktirilmesi, bitki gelişiminde teşvik edici olmasının yanında engelleyici özelliklere sahip, diğer hormonlar üzerine sinerjistik ve antogonistik etkileri olan bileşiklerdir (Yıldız ve Yılmaz, 2001; Gaspar vd. 1996; Haberer ve Kieber, 2002). Jasmonatlar süs bitkilerinde klorofil oluşumu, bazı hastalık etmenlerini önleme, hasat sonrası dayanım gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Eken ve Şirin, 2016). Bu bağlamda yapılan çalışmalarda MeJA, etefonla birlikte uygulandığında lale gibi soğanlı bitkilerde klorofil oluşumunu arttırdığı bildirilmektedir (Ueda ve Saniewski., 2006). Kala zambaklarında, MeJA yapraklara sprey şeklinde 10 mm dozunda uygulandığında yumuşak kök çürüklüğüne neden olan *P. carotovorum*'un yapraklarda gelişimini tamamen engellediği görülmüştür (Luzzatto vd. 2007; Eken ve Şirin, 2016). Jasmonatlar bitki savunma mekanizmasını herhangi bir stres koşulu karşısında harekete geçiren bir uyarıcı görev yapmaktadır. Bu amaçla gülde yapılan bir araştırmada; hasat sonrası uygulanan metil jasmonatlar güldeki direnç mekanizmalarını uyararak, çiçek kalitesini bozmadan *botrytis* çürüklüğüne karşı sistemik koruma sağlamıştır (Meir vd. 1998; Eken ve Şirin, 2016). Benzer şekilde yapılan bir başka çalışmada farklı gül çeşitlerine uygulanan MeJA'nın doğal ve yapay yollarla bulaştırılan kurşuni küf gelişimini etkin bir biçimde önlediği bildirilmiştir (Meir vd. 2003; Eken ve Şirin, 2016). Jasmonat uygulamalarının, hasat sonrası ömrün

uzatılmasında, muhafazasında olumlu etkisi olduğu düşünölmekte ve bununla ilgili yapılan çalışmada araştırıcı, kesme çiçek olarak değerlendirilen şakayıkların uzun süre depolanabilmesi amacıyla emici pet içerisinde metil jasmonat uygulandış polietilen torba içinde saklanan çiçeklerin vazo ömrünün arttığı belirlemiştir (Gast,1999; Eken ve şirin, 2016). Saniewski ve Wegrzynowicz-Lesiak (1994) *Kalanchoe blossfeldiana*' da yaprak absisyonunu araştırdıkları çalışmalarında; MeJA ile muamele edilmesinden 1 gün önce bitkilere IAA, GA, BA, ABA uygulanmış ve yaprak absisyonuna engel olunamadığı belirtilmiştir. Araştırmanın sonucunda yaprak absisyon mekanizmasının metil jasmonat ile uyarılıp uyarılmadığı bilinmemekte ancak etilen üretimi ile ilgili olmadığı bildirilmiştir (Eken ve şirin, 2016).

Poliaminler somatik embriyogenez, sap veya gövde kalınlaşmasını, çiçeklenmeyi, kök büyümesi ve gelişmesini, yumru gelişimini, meyve olgunlaşması üzerine etkilidirler (Hanzawa vd. 2000; Antognoni vd. 2002; Fos vd. 2003; Couée vd. 2004; Eken ve şirin, 2016). Bir aminoasit türevi olmakla birlikte; Putresin (Put.), Kadaverin (Cad), Spermidin (Spd.) ve Spermin (Spm.) olmak üzere 4 tipi bulunmaktadır. Bunlardan Putresin ve Kadaverin bir "Diamin"; Spermidin Triamin ve Spermin ise "Tetraamin"dir (Smith, 1979; Liu vd. 2000; Kireçci, 2006; Eken ve şirin, 2016). Poliaminler, süs bitkilerinde bitki boyu, dal sayısı, yaş ağırlık gibi birçok morfolojik özellikler ve uçucu yağ kalitesi üzerine etkileri olduğu belirtilmiştir. Bu bağlamda *Ocimum basilicum* (Fesleğen)' da yapılmış bir çalışmada, pek çok morfolojik özellik açısından GA₃ uygulamalarına göre poliamin uygulamalarının daha etkili olduğu saptanmış ve bununla birlikte uçucu yağ oranına uygulanan hormonların önemli bir etkilerinin olmadığı, ancak yağ içerisindeki ana bileşen olan linalool miktarını önemli ölçüde değiştirdiği bildirilmiştir (Kireçci, 2006). Poliaminlerin aynı zamanda bitkilerin vejetatif gelişimi, çiçek kalitesi, çiçek sayısı, yaş ve kuru ağırlık, klorofil a, klorofil b, karotenoid gibi kimyasal özelliklere olumlu etki sağladığı saptanmıştır (El-Quesni vd. 2007; El-Sabwa, 2012; Kandil vd. 2015; Eken ve şirin, 2016)). Bu sayede Nahed vd. (2009) glayölde yapmış olduğu araştırmada, klorofil a, klorofil b, karotenoid, toplam fenol, N, P, K, çözülebilir toplam şeker gibi kimyasal özellikler açısından elde edilen en yüksek veriler putresin; çiçek parametreleri açısından ise putresin ve askorbik asit uygulanan bitkilerden alındığı bildirilmiştir. Toplam suda çözünebilir şeker, toplam fenol ve toplam indol içeriklerinin tiamin konsantrasyonları ile doğru orantılı bir şekilde artış gösterdiği saptanmıştır. Yapılan başka bir araştırmada putresinin yaprak yaşlanması üzerine etkisi incelenmiş ve bununla birlikte yaprak yaşlanmasının bağlı su

içeriği ve sitoplazmik membranların fizyolojik durumu ile ilgili olduğu saptanmıştır. Ayrıca dışsal putresin uygulamalarının, asimilasyon pigmentlerin konsantrasyonunda etkili olmadığını, Ayçiçeği'nin fizyolojik durumunun iyileştirilmesi üzerine etkili olduğunu belirlemişlerdir (Rubinowska ve Michalek, 2009). Poliamin uygulamalarının; hasat sonrası kalite, vazo ömrü ve yapraktaki besin maddelerinin konsantrasyonları ile ilgili yapılmış araştırmalar değerlendirildiğinde ise vazo ömrü, bitkilerin besin maddesi alınımı ve yapraklardaki besin maddelerinin konsantrasyonları üzerine etkili olduğu saptanmıştır (Sardoei vd. 2013; Dastyaran, 2015; Tatte vd. 2015; Eken ve Şirin, 2016).

Salisilatlar yani Salisilik asit (SA), uzun zamandan beri bilinmekte olup tıbbi olarak kullanımı olan bir moleküldür. Eksojen uygulanan SA'in, gen ekspresyonunu ve fitoaleksinler ile aralarında PR proteinlerinin de yer aldığı bir birçok proteinin sentezini uyardığı bildirilmiştir (Hammond Kosack ve Jones, 1996; Yıldız Aktaş ve Güven, 2005; Eken ve Şirin, 2016). Salisilik asit; bitkilerde etilen biyosentezi ve tohum çimlenmesini engellemek, yaralanma tepkilerini engellemek, köklerde absorpsiyon ve membran taşıyım mekanizmasını engellemek, hızlı membran depolarizasyonunu uyarmak ve transmembran elektrokimyasal potansiyelini ortadan kaldırmak, yaprak hareketlerini uyarmak, yapraklarda transpirasyonu azaltmak, ABA uyarımlı stoma kapanmasını tersine çevirmek, büyümeyi engellemek, mısır fidelerinde antosiyan üretimini uyarmak, baklagillerde simbiyotik azot fiksasyonunda etkili olan kök nodül oluşumunu arttırmak, vegetatif gelişmeyi hızlandırma olarak etkileri olmaktadır (Aktaş, 2001; Özeker, 2005). Ayrıca bitki dokularında patojene karşı savunma tepkilerinin oluşturulmasında gereklidir (Ryals vd., 1996). Süs bitkileri üzerindeki etkisi bitki boyutunda meydana getirdiği artış, çiçek sayısı, yaprak alanı ve çiçeklenmede erkencilik sağlamasıdır. Etilen biyosentezini bloke ettiği saptanmış ve bu sayede kesme çiçeklerin ömrünü uzatmış, kalitesini muhafaza etmesini sağlamış, salisilik asidin çiçeklenme üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (Leslie ve Romani, 1988). Salisilik asit uygulanan liliumlarda bitkilerin vazo ömürleri, canlı ağırlıkları, çözünebilir protein içeriği ve solunum hızının arttığı, yaprakta klorofil bozulmasının yavaşladığı belirlenmiştir (Xiao-li vd. 2007; Baran ve Doğan, 2014). Salisilik asidin çiçeklenmeyi teşvik edici etkisinin olduğuna dair ilk kanıt, tütün doku kültürlerinden meydana geldiği belirtilmiş ve tütün bitkisinin kallus kültürlerinde çiçek tomurcuğu oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir (Eberhart vd. 1989; Lee ve Skoog, 1965). Başka bir çalışmada kısa gün bitkisi olan *Xanthium strumarium*'un vegetatif ve generatif dönemlerinde yaprak bitleri ile yapılan denemelerin sonucunda, bitki çiçeklenmesinin düzenlenmesinde salisilik asidin rol

oynayabileceği ileri sürülmüştür (Cleland ve Ajami, 1974; Özeker, 2005). Afrika Menekşesi ile yapılan araştırmada 0,001 µM SA uygulaması yaprak sayısını, çiçek primordia sayısını ve rozet çapını arttırdığı belirtilmiştir (Martín-Mex vd., 2005). Petunyada yapılan bir çalışmada ise çinko sülfat (ZnSO₄) ve salisilik asit (SA) konsantrasyon artışı ile, çiçeklenmede artış olduğu saptandığı bildirilmiştir (Sardoei vd., 2014). Benzer şekilde yapılmış SA uygulamalarının petunyada sadece çiçek sayısını arttırmadığı, bununla birlikte 6 günlük erken çiçeklenmenin gerçekleştiği de belirlenmiştir (Martín-Mex vd., 2010). Salisilik asidin önemli bir başka etkisi ise stres koşulları altında bitki gelişimi üzerine uyarıcı etkisinin olmasıdır. Bu bağlamda salisilik asit uygulamalarının liliyumda yüksek sıcaklık stresinde antioksidan faaliyetlerini artırarak sıcaklık toleransının artırabileceği öngörülmektedir (Qiuming vd., 2008). Salisilik asit farklı abiyotik stres koşulları altındaki bitkiyi strese karşı korumaktadır. Bu bağlamda Ciğerli (2018) 200 mM NaCl tuz stresi altındaki 41 B ve 1103 P Amerikan asma anacının tek boğumlu mikro çeliklerini kullandığı araştırmasında da 0, 0,5, 1 ve 2 mM olacak şekilde farklı dozlardaki salisilik asit uygulamasıyla anaçların tuzluluğa olan dayanımlarını ve en uygun salisilik asit dozunun belirlenmesini amaçlamıştır. Araştırma sonucunda 1103 P anacının 41 B anacına göre tuzluluğa daha dayanıklı olduğu belirlenmiş ve bununla birlikte en etkin salisilik asit dozlarının 1103 P anacı için 1 mM; 41 B anacı için 0,5 ve 1 mM oldukları saptandığını belirtmiştir. *Hibiscus acetosella*'nın *In vitro* kültüründe besin ortamına eklenen 0,5 mM SA sürgün çoğalması, kök oluşumu, canlı kalma oranına olumlu etki sağladığı tespit edilmiştir (Sakhanokho ve Kelley, 2009).

Brassinosteroidler (BR); steroid yapısında ham lipoidal ekstraktlar olmakla birlikte fasulyenin ikinci internod bölgesinde aktif olarak bulunan, bu bölgenin şişkinliğine ve sertliğine neden olan ve kolza polenlerinden meydana gelen bileşiklerdir (Kumlay ve Eryiğit 2011; Surgun vd. 2012). Tüm brassinosteroidler, her zaman biyolojik olarak aktif olmamakla birlikte Brassinolid (BL), 24epibrassinolid (24-epiBL) ve 28homobrassinolid (28-homoBL) fizyolojik çalışmalarda biyolojik aktif olarak yaygın kullanılırlar (Rao vd. 2002; Surgun vd. 2012). Brassinosteroidler, biyosentezi bütün bitki kısımlarında gerçekleşebilen ve bitkilerde polen, tohum, yaprak, kök, gövde, çiçek gibi kısımlarda bulunmakta ve Endojen Brassinosteroid düzeyleri, bitki dokuları ve kısımları arasında farklılık gösterebilmektedir. Brassinosteroidler en fazla polen ve tohumlarda yer alırken sürgün, meyve, gal, anter, çiçek tomurcukları ve kambiyal bölgelerde bulunabilmektedir (Ankudo, 2004; Zullo ve Adam, 2002; Surgun vd. 2012). Brassinosteroidler, bitkilerde

büyüme ve gelişme üzerinde çeşitli düzenleyici aktivitelere sahiptir (Yokota, 1997; Surgun vd. 2012). Brassinosteroidlerin bitki gelişimindeki başlıca etkileri hücre bölünmesi ve genişlemesi, hücresel farklılaşma, lateral kök gelişimi, vasküler farklılaşma, polen tübü gelişimi, apikal dominansinin sürdürülmesi, çiçeklenme, senesens ve stres toleransının artırılması olarak sıralanabilmektedir (Rao vd. 2002; Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006; Clouse ve Sasse, 1998; Sasse, 2003; Amzalling ve Vaisman, 2006; Ashraf vd. 2010; Surgun vd. 2012). Bitkilerde brassinosteroidlerin fizyolojik etkilerine hücre seviyesinde bakıldığında uzama ve bölünmenin teşviki, hormonal dengenin sağlanması, protein ve nükleik asit sentez aktivasyonu, enzim aktivitesinin artması, membran bileşimi ve doymuş yağ asiti kompozisyonunu etkileme, fotosentetik kapasitenin artırılması gibi etkileri mevcutken bütün bitki seviyesinde bakıldığında büyümenin teşviki, döllemenin artırılması, vejetatif gelişim sürecinin kısaltılması, meyve kalitesi ve boyutunun artırılması, meyve kalitesi ve besinsel komponentlerin içeriğini etkileme, uygun olmayan çevresel faktörler, stres ve hastalıklara dayanıklılığının artırılması, ürün verimliliğinin artırılması gibi etkileri bulunmaktadır (Yokota, 1997; Surgun vd. 2012). Optimum aktivite için oksin ve brassinosteroid olarak her ikisine de ihtiyaç duyulmakta ve bununla birlikte vasküler farklılaşma, çiçek, meyve ile kök gelişimini içeren benzer gelişimsel süreçlerin çoğunda birbirleriyle bağlantılı olduğu saptanmıştır (Savaldi-Goldstein ve Chory, 2006; Nemhauser ve Chory, 2004; Bajguz ve Hayat, 2009; Surgun vd. 2012). Örneğin, *Arabidopsis*'de oksinin brassinosteroid biyosentezini düzenlediği ve brassinosteroidlerin büyümeyi teşvik edici etkilerinin oksinler tarafından devam ettirildiği bildirilmiştir (Chung vd. 2011; Surgun vd. 2012). Bitkilerde abiyotik stres koşullarında brassinosteroidler morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklerde olumlu rol oynadığı yapılan çalışmalar sonucunda belirtilmiştir (Divi vd. 2010; Surgun vd. 2012). EpiBL tuz stresi altında yetiştirilen buğday yapraklarına spreyleme yöntemi ile uygulanmış ve bunun sonucu olarak besin maddelerinin birikiminde etkisini göstermemiş fakat biyokütle ve büyümeyi arttırdığı saptanmıştır (Shahbaz ve Ashraf, 2007; Surgun vd. 2012). Tuz stresine koşullarındaki Ispanak (*Spinacia oleracea* L.) fidelerine püskürtülerek fide gelişimi üzerine etkisi incelemek amacıyla fideler Hoagland, Hoagland+eBL, Hoagland+NaCl, Hoagland+NaCl+EpiBL olmak üzere dört gruba ayrılarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda uygun konsantrasyonlar 150 mM NaCl ve 10⁻⁹ mM EpiBL olarak belirlenmiş ve bununla birlikte tuz stresine maruz bırakılan ve EpiBL uygulanan ıspanak fidelerindeki biyokimyasal analizler sonucunda EpiBL, tuz toksisitesinde hafifletici etki yaptığı saptanarak olumlu etkileri belirtilmiştir (Seven, 2017; Surgun vd. 2012).

Başka bir çalışmada EpiBL'nin kuraklık stresi altındaki domates bitkilerine uygulanmış ve bununla birlikte H₂O₂ içeriği ve lipit peroksidasyonunu azaltmış ayrıca prolin, çözülebilir protein içeriği ve antioksidatif enzim aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Behnamnia vd., 2009). Yine domates ve *Brassica napus* fidelerinden stres koşullarına 24-epiBL'nin etkisi araştırılmış ve EpiBL uygulaması kontrol uygulamasına göre letal sıcaklığa daha toleranslı oldukları saptanmıştır (Dhaubhadel vd., 1999).

Süs bitkilerinde çiçeklenme üzerine brassinosteroid etkilerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır ve bu amaçla yapılan bir çalışmada brassinosteroidlerin gövde çapı ve tomurcuk sayıları üzerinde etkili olduğu ve değerlerde artış meydana geldiği belirtilmiştir (Álvarez vd., 2005). Çiçeklenme ve kalite üzerine Liu vd. (2014) yaptıkları araştırmasında yapraktaki klorofil miktarları ve petallerdeki antosiyonin miktarlarında artış gözlenmiştir. Bir araştırma da glayölde brassinosteroid ve Jasmonik asitlerin korm ve kormel sayısında önemli artış sağladığının bildirilmesi brassinosteroidlerin soğanlı yumrulu bitkiler üzerinde de etkileri olduğunu belirtmektedir (Kumar vd.,2008).

Yaban mersininin (*Vaccinium corymbosum* L., cv. Brigitta blue) *In vitro* kültüründe, EpiBL uygulamasında bitki boyunun kontrole göre artış gösterdiği, sürgün çoğalma katsayısı bakımından 0,25 mg/l EpiBL, 7,25 mg/l 2iP ve 1,0 mg/l IAA içeren ortamda ve ayrıca 0,05 mg/l EpiBL, 2,0 mg/l 2iP ve 0,50 mg/l IAA içeren ortamda kültüre alınan bitkilerde meydana gelmiştir. 2iP ve EpiBL'nin düşük konsantrasyonlarda uygulanan kombinasyonlarda yabanmersini bitkilerinin endüstriyel *In vitro* çoğaltılması için kullanılabilceği önerilmektedir. EpiBL'nin sitokininlerin (BAP, 2iP) gerisinde kaldığı bildirilmiş (Kudryashova vd., 2012). *Cymbidium elegans*'ta 4 µM EpiBL ile sürgün ucu kesitlerinde, 12 hafta içinde etkin bir şekilde protokorm benzeri yapılar oluşmuş ve sürgünlerin canlılık oranını arttırdığı bildirilmektedir (Malabadi ve Nataraja 2007). *Cymbidium bicolor* da ise 3 µM 24-EpiBL' de eksplantların %86'sının, eksplant başına 65 protokorm benzeri yapılar oluşturduğu bildirilmektedir (Malabadi vd., 2008). Bir pamuk çeşidinin *In vitro* kültüründe kotiledon nodu eksplantları ve bir kotiledon yaprağını içeren eksplantlar, farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile 1 µM konsantrasyonda EpiBL eklenmiş MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bununla birlikte kotiledon nodu eksplantları 1 µM EpiBL çözeltisine batırılarak EpiBL bulunmayan MS ortamında kültüre alınmış ve etkileri incelenerek değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda her iki eksplant tipinde de en iyi sonuçlar, sürgün gelişimi Kontrol MS besin ortamından meydana gelmesine rağmen EpiBL uygulanan eksplantlara ait kültürlerde sürgün gelişiminin, EpiBL

bulunmayan kültürlerine göre daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Boy uzunlukları değerlendirildiğinde ise en fazla uzamanın bir kotiledonlu eksplantlarda 0,44 μM NAA+ 0,98 μM IBA+ 1 μM EpiBL ilaveli MS besin ortamında meydana gelmiştir. Kotiledon nodu eksplantlarında ise, 1 μM EpiBL içeren MS besin ortamında gerçekleştiği bildirilmiştir (Aksakal, 2009).

Lycopersicon esculentum Mill. *In vitro* kültürlerinde tuz stresi üzerine EpiBL 'in etkisi araştırılan bir çalışmada tohum çimlendirme, sürgün ucu ve kallus kültürleri ile sürgün rejenerasyonu çalışmaları yapılmış ve bu bağlamda eksplant olarak tohum, sürgün ucu, kotiledon ve hipokotil kullanılmıştır. Tohum ve eksplantlara ekzojen EpiBL uygulaması yapılarak farklı sürelerde EpiBL çözeltilerinde bekletilmiştir. 20, 40, 50, 60, 80, 100, 150 mM NaCl konsantrasyonları ve bu tuz stresi konsantrasyonlarına karşı 0,5, 1, 1,5, 2 μM EpiBL konsantrasyonları belirlenmiştir. Tohum çimlendirmede, epiBL uygulaması kültür öncesi tohumlara uzun süreli (24 saat) ve kısa süreli (10 saniye) olarak belirlenmiş fakat uzun süreli uygulamanın bir etkisi görülmediği için sonraki çalışmalarda NaCl konsantrasyonları 20, 40, 60, 80 ve 100 mM olarak belirlenmiş ve kısa süreli uygulama denenmiştir. 10 saniye EpiBL uygulaması yapılan tohumlar artan konsantrasyonlarda NaCl içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınmış ve bununla birlikte 40, 80 ve 100 mM NaCl konsantrasyonlarına karşı 1 ve 2 μM EpiBL uygulaması çimlenme yüzdesini arttırdığı gözlemlenmiştir. *In vitro* sürgün ucu kültürlerinde 2 mg/l K⁺ 0,4 mg/l NAA ilaveli MS ortamında sürgünler geliştirilmiş ve ardından 12 günlük sürgünlere epiBL uygulaması yapıldıktan sonra artan konsantrasyonlarda NaCl içeren MS ortamında kültüre alınmışlar ve bunun sonucunda 30 günlük kültür sonunda, 20 mM NaCl konsantrasyonunda bitki yaş ve kuru ağırlığı, aynı zamanda 100 mM NaCl konsantrasyonunda bitki boyu, bitki yaş ağırlığı ve kök kuru ağırlığı üzerine 2 μM EpiBL uygulamasının etkisinin olumlu yönde olduğu belirtilmiştir. 1 μM EpiBL uygulaması ise, 100 mM NaCl stresi altındaki bitkiciklerde klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriğini arttırmış olmasına rağmen 40 mM NaCl konsantrasyonunda 1 ve 2 μM EpiBL uygulamalıları prolin içeriğini önemli oranda azalttığı görülmüştür. Çalışmada 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamında kotiledon ve hipokotil eksplantlarından kallus meydana gelmiş ve 30 günlük kültürde kallusların yaş ağırlığı, kuru ağırlığı ve kallus çapı belirlenerek bazı NaCl konsantrasyonlarında 1 μM EpiBL'nin tuz stresine karşı olumlu etkisi olduğu saptanmıştır. 2 mg/l BAP eklenen MS ortamında yapılan EpiBL uygulamalı kotiledon eksplantlarından 20, 40 ve 80 mM NaCl stresi ve hipokotil eksplantlarında ise 60 ve 80 mM NaCl stresine karşı 1 μM EpiBL

uygulamasının rejenerasyon yüzdesi üzerine olumlu etkisi saptanmıştır. 80 mM NaCl konsantrasyonunda 2 µM EpiBL uygulaması kotiledon kültüründe eksplant başına düşen sürgün sayısı üzerine bununla birlikte 60 mM NaCl stresine karşı 1 µM EpiBL uygulaması hipokotil kültüründe rejenerasyon sürgün sayısı, 100 mM NaCl stresine karşı 1 µM EpiBL uygulaması sürgün boyu, ve 20 mM NaCl stresine karşı 2 µM EpiBL uygulaması sürgündeki yaprak sayısı üzerine olumlu etkisi saptanarak domates *In vitro* kültürlerinde tuz stresine karşı EpiBL'nin toleransı arttırmada önemli rolü olabileceğini bildirmiştir (Gökdoğan, 2014).

Limonium sinuatum (L.) Mill mikroçoğaltımı ve EpiBrassinolide (EpiBL), sitokinin (BAP), oksin (NAA), giberellinin (GA_3) çoğalma ve gelişme üzerine olan etkilerinin belirlenmesi ve birbirleri ile karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmada doku kültüründe geliştirilen 8-10 mm boyundaki *In vitro* sürgünler MS ortamına 5 µM (BAP, EpiBL, NAA, GA_3) ilave edilmiş ve kontrol ortamında alt kültüre alınmıştır. Bunun sonucunda NAA bulunan besin ortamında %100 kök oluşturmuş, BAP bulunan besin ortamında 4,74 adet sürgün/eksplant değeriyle en yüksek sürgün çoğalma katsayısı elde edilmiştir. Sürgün uzaması ve büyümesi açısından kültürün ilk iki haftasında GA_3 , altıncı haftada ise NAA en fazla boy artışının olduğu ve en uzun sürgünlerin olduğu besin ortamı olarak belirlenmiştir. EpiBL'nin diğer bitki büyüme düzenleyicilerine ve kontrol uygulamalarına göre istatistiksel bir farklılık oluşturmadığı saptanmıştır. EpiBL'nin farklı konsantrasyonlarda, oksin ve sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyicileri ile kombine edilerek denemesi, EpiBL'nin etkisinin daha net ortaya çıkarabilmesi açısından yararlı olabileceği belirtilmektedir (Eken vd., 2019).

Son yıllarda nano-TiO₂'nin bitki sistemleri ve farklı mikroorganizmalar üzerindeki etkileri üzerine yapılan kapsamlı araştırmalar, nano-TiO₂'nin fotokatalitik ve antimikrobiyal aktivitesini doğrulamıştır fakat bitki hücre ve doku kültüründe uygulanması ve doku kültüründe kontaminasyona neden olan mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasındaki rolü hakkında herhangi bir rapor bulunmamaktadır (Mandeh vd., 2012). Bununla birlikte nano bileşiklerde çalışmalarda farklı amaçlarla kullanılmaya başlanmıştır. Ispanak tohumlarının çimlenmesi ve büyümesi üzerindeki nano-TiO₂'nin etkileri, tohumların çimlenme oranı, çimlenme ve canlılık indeksleri ölçülerek incelenen araştırmada %0,25-4 nanoTiO₂ uygulamasında bu parametrelerde bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Büyüme aşaması sırasında, klorofil oluşumu, ribulosebisfosfat karboksilaz/oksijenaz aktivitesi ve bitkinin kuru ağırlığı artmıştır. En iyi sonuçlar %2,5 nano-TiO₂'de elde edilmiştir ve ayrıca

fizyolojik etkilerin nanometre boyutundaki parçacıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir, ancak nano-TiO₂'nin ıspanak tohumlarının büyümesini iyileştirdiği mekanizma üzerine araştırmalar yapılması gerektiği bildirilmiştir (Zheng vd., 2005). *Hordeum vulgare* L. olgun embriyolarının 0, 10, 30, 60 µg/ml konsantrasyonlarda 4 farklı TiO₂ süspansiyonu içeren MS ortamında kültüre alındığı çalışmada her alt kültürden sonra kallusların nicel ve nitel özellikleri analiz edilmiş ve bununla birlikte kallus rengi, şekli, embriyogenesis vb. gibi nicel özellikler hem kontrol hem TiO₂ içeren besin ortamlarında benzer bulunduğu belirtilmiştir (Mandeh vd., 2012).

Bakteriyel kontaminasyon, bitki doku kültürü prosedürlerinde ciddi bir problemdir. Nano-TiO₂, bakterilerin öldürülmesi veya yayılımının engellenmesi için kapsamlı bir şekilde araştırması yapılmış ve bu bağlamda, nano-TiO₂'nin bakteriyel kontaminasyonu ortadan kaldırma potansiyelini değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *Solanum tuberosum* L. da yapılan çalışmada doku kültürü ortamına farklı miktarlarda TiO₂ eklenmiş ve kültürden dört hafta sonra antimikrobiyal aktivite yüzdelerinin verileri alınarak değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda *In vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlardaki TiO₂'nin MS ortamındaki mikroorganizmaları azaltabildiği ve kaldırabildiği bildirilmiştir (Safavi, 2014). Başka bir çalışmada, nano gümüş (NS) ve nano dioksit titanyumun (TiO₂) bakteriyel kontaminasyonu ortadan kaldırma potansiyelini değerlendirmeyi planlayan araştırmacı, NS ve TiO₂'yi MS ortamına ekleyerek kültür ortamı olarak kullanmıştır. Tütün eksplantları, modifiye MS ortamında kültüre alındıktan dört hafta sonra değerlendirilmiştir. Sonuç olarak NS ve TiO₂'nin tütün bitkisi doku kültürü prosedürlerinde bakteriyel kontaminasyonun engellenmesi için iyi bir potansiyele sahip olduğunu gösterdiği saptanmıştır (Safavi, 2011). Benzer amaçla yapılan başka bir çalışmada ise *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi eksplantları kültüre alınmış ve 10, 20, 30 ve 40 mg/ml konsantrasyonlarında TiO₂ içeren MS ortamında mikroorganizmaların azaldığı ve eksplantların çok iyi büyüme gösterdiği belirtilmiştir. TiO₂'nin tütün bitkisi doku kültürü prosedürlerinde bakteriyel kontaminantları uzaklaştırmak için iyi bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. *Petroselinum crispum* *In vitro* kültüründe MS ortamına eklenen TiO₂'nin konsantrasyonundaki artışın çimlenme yüzdesi, çimlenme oranı, kök ve sürgün uzunluğu, canlılık oranı, klorofil yoğunluğu üzerinde önemli bir artışa neden olduğu ve en iyi TiO₂ konsantrasyonunun 30 mg/ml olduğu belirtilmiştir (Dehkourdi ve Mosavi, 2013).

Chutipaijit ve Sutjaritvorakul (2018) *Oryza sativa* L. ssp. indica tohumları, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon sıklığını değerlendirmek için incelenmiştir. 50 mg/l TiO₂

nanoparçacıkları ile desteklenmiş kallus indüksiyon ortamında sterilize edilmiş tohumların kültürü, yüksek bir kallus indüksiyon sıklığı ve biyokütle birikimi içeriği belirlenmiştir. Embriyojenik kallus, 10-50 mg/l TiO₂ nanopartikülleri ile modifiye edilmiş bitki rejenerasyon ortamına aktarılmış ve bununla birlikte en yüksek bitki rejenerasyon sıklığı ve bitki sayısının rejenere kalus sayısına oranı, 40 mg/l TiO₂ nanoparçacıkları ile modifiye edilmiş bitki rejenerasyon ortamında meydana gelmiştir. Rejenere sürgünler, bitki büyüme düzenleyicileri olmayan NB ortamında köklenmiş ve bitkicikler toprakta aktarılmıştır. Sonuç olarak, *Oryza sativa* L. ssp. indica nanomateryal uygulamaları için daha fazla geliştirilmesi için kullanılabileceği bildirilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait Süs Bitkileri Islahı ve Yetiştiriciliği Anabilim Dalı doku kültürü laboratuvarı ve iklim odasında 2020-2022 yıllarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Yürütülen bu araştırmada bitkisel materyal olarak; salep orkideleri türlerinden olan genel olarak Ege Bölgesinde yetişen *Orchis* sp. ve *Ophrys* sp. cinslerinden türler oluşturmuştur. Salep orkidelerinin yumruları ticari amaçla üretim yapan farklı işletmelere ait üretim sahalarında yetiştirilen bitkilerden temin edilmiştir. Temin edilen yumrular Bahçe Bitkileri bölümüne ait ısıtmasız plastik serada saksılara dikilerek vegetasyon süresince yetiştirilmiştir.



Resim 3.1. Serada saksılara dikilen saleplerden bir görünüm.

Serada yetiştirilen salep bitkilerinden gelişme dönemleri takip edilerek, gelişmenin belirli evrelerinde yumru, sürgün ucu, çiçek ve çiçek sapı alınarak bu materyaller eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.

Orchis sp.: Yumruludur. Görsel olarak son derece çeşitlidir. Dik bir gövde oluştururlar. Sarı, kırmızı, mor gibi renklere sahip olan çiçekleri vardır. Çiçekler silindirik veya küresel başak olarak 5-15 cm uzunluğundadır. Yapraklar tabanda bitki gövdesinin etrafında rozet şeklinde dizilmişlerdir. Toprağın yüzeyinde gövde ile değişik açılar yaparak yukarıya doğru yönelmişlerdir. Labellum undulat şekildedir. *Orchis* sp. türlerinin sahip oldukları iki yumru zamanla birbirinden ayrılıp ayrı bitki verecek şekilde gelişerek küme şeklinde orkide meydana getirirler. *Orchis* cinsine ait türlerden *Orchis coriophora* L. türünde bitki 15–30 cm boyda ve gövde kalın olarak gelişir. Yapraklar 5–7 adet arasında, tabandan itibaren gövde boyunca dizilmiş şekilde, üst yapraklar gövdeyi sarmış vaziyette meydana gelmektedir. Brakteler ise beyazımsı-yeşil renktedir. Çiçekler silindirik ve oldukça sık şekilde dizilişli spika oluşturmuş, yeşilimsi-mor, yeşilimsi-kırmızı, kahverengimsi-kırmızı renklindedir. Orman açıklıklarında ıslak çayırlarda yetişmektedirler. Mayıs-Haziran aylarında çiçeklenmektedirler. *Orchis morio* subsp. türünde bitki 10–30 cm boyda ve narin yapıya sahip olarak gelişir. Yapraklar 6–9 adet arasında, lanseolat, tabanda rozet şeklinde, üst kısımlarda 2–3 yaprak gövdeyi sarmış şekilde meydana gelir. Brakteler ovaryumdan daha kısa olacak şekilde, pembemsi- mor renklidir. Çiçekler pembemsi-mor, beyazdan koyu mora kadar değişik renklerde meydana gelmektedir. Çam ormanı, meşe ormanı ve nemli çayırlarda yetişmektedirler. Nisan- Haziran aylarında çiçeklenmektedirler. *Orchis mascula* subsp. türünde bitki 20–55 cm boyda ve gövde esnek, narin yapıya sahip olarak gelişir. Yapraklar 4–7 adet arasında, brakteler lanseolat, pulsus ve lanseolat şeklinde meydana gelmektedir. Çiçek durumu seyrek veya çok çiçekli olarak 14–54 adet arasında, silindirik, leylak renginden kırmızıya kadar çeşitli renklerde meydana gelmektedir. Çam, meşe ormanı altı ve yakınlarında yetişmektedirler. Mayıs-Haziran aylarında çiçeklenmektedirler. *Orchis purpurea* türünde ise bitki 35–60 cm boyda gelişir. Yapraklar 4-10 adet arasında, kenarları düz, tabanda rozet şeklinde, Brakte pulsus ve ovaryumdan kısa olacak şekilde meydana gelmektedir. Çiçekler yaklaşık 60 adet kadar çok sayıda ve geniş bir şekilde meydana gelmektedir. Çam, meşe orman içi ve açık alanlarında yetişmektedirler. Nisan-Mayıs aylarında çiçeklenmektedirler (Sezik, 1984; Arslan, 2010).

Ophrys sp.: Yumruludur. Parlak, bazal yapraklar yeşil veya mavimsi bir renge sahiptir. Tohumların çimlenmesi için simbiyotik mantarlara ihtiyaç duyar. 2-12 çiçek dik bir

sap üzerinde büyür. Kendi tozlayıcı böceği vardır. Yapraklar tabanda bitki gövdesinin etrafında rozet şeklinde dizilmişlerdir. Toprağın yüzeyine yayılmış şekildedir. Labellumun ortası spekulum denilen tüysüz, parlak ve sert bir yapı oluşturabilir. Bununla birlikte küçük bir çıkıntı şeklinde apendiks yapısı uç kısmında bulunabilir. *Ophrys* cinsine ait türlerde bulunan iki yumru zamanla birbirinden ayrılıp ayrı bitki verecek şekilde gelişerek küme şeklinde orkide meydana getirirler. *Ophrys* cinsine ait tür olan *Ophrys pseudomammosa* Renz türünde bitki 20–40 cm boyda gelişir. Yapraklar 3-9 adet, tabandakiler rozet şeklinde yayılmış, yukarılara doğru gövdeyi sarar vaziyette, dikdörtgenimsi-ovaitten mızrakşıya benzer şekildedir. Brakteler ovaryumdan biraz uzun olacak şekilde, ovoitten lanseolata kadar, açık yeşil renktedir. Çiçekler 3–8 adet arasında, oldukça iri, dışa yönelmiş vaziyette meydana gelmektedir. Labellum uca doğru yan kenarları sarımsı-yeşil renkli ve uca apendiks bulunur. Genellikle çalılıklar ve çayırlıklarda yetişmektedirler. Haziran ayında çiçeklenmektedirler (Sezik, 1984; Arslan, 2010).

3.1.2. Kimyasal Materyaller

MS ortamı: MS ortamı Murashige ve Skoog (1962) tarafından geliştirilmiş yüksek tuz içeren bir ortam olmakla birlikte doku kültüründe en yaygın kullanılan besin ortamıdır. Özellikle düşük yoğunluklarda (1/4 MS, 1/2 MS) birçok bitki türünde başarıyla kullanılmaktadır. Çalışmada besin ortamı olarak Duchefa marka M0222 kodlu vitamin içerikli hazır MS ortamı kullanılmıştır (Resim 3.2).

Agar: Eksplantlar genellikle yarı-katı ortamda kültüre alınmaktadır. Bu amaçla kültür ortamında besin ortamını katılaştırmak için agar kullanılmaktadır. Çalışmada Sigma-Aldrich marka 05039 kodlu molekül formülü ($C_{12}H_{18}O_9$)n ve CAS numarası 9002-18-0 olan toz agar kullanılmıştır.

Sakkaroz: kültür ortamının önemli bir unsuru olarak tüm besin ortamları karbon kaynağı amacıyla %1-3 oranında sakkaroz içerir. Çalışmada Isolab marka 970.053 kodlu, ve CAS numarası 57-50-1 olan sükroz kullanılmıştır.

BAP: Doku kültüründe sitokininler hücre bölünmesinin uyarılması, sürgün ve kök farklılaşması, lateral tomurcukların büyümesi, yaprak gelişmesi, kloroplast gelişimi ve senesens üzerine etkilidirler (Özen ve Onay, 1999). Çalışmada Duchefa marka B0904 kodlu, CAS numarası 1214-39-7, molekül formülü $C_{12}H_{11}N_5$, Molekül ağırlığı 225.3 g mol⁻¹

¹, Test > %99 “6-Benzil amino pürin (6-BAP, N6-Benzyladenine)” kullanılmıştır (Resim 3.2).

NAA: Oksin grubu bitki büyüme düzenleyicileri, hücre uzaması ile kallus oluşumunu teşvik etmek ve kök farklılaşmasını sağlamak amacıyla kullanılırlar (Gürel vd., 2013). Çalışmada Duchefa marka N0903 kodlu, CAS numarası 86-87-3, molekül formülü $C_{12}H_{10}O_2$, molekül ağırlığı 186.2 g mol^{-1} , Test > %98 “A-Naftalen asetik asit” kullanılmıştır (Resim 3.2).

EpiBL: Brassinosteroidler fotosentetik ve enzimatik aktiviteyi, hormonal dengeyi, hücre bölünmesi ve genişlemesi, lateral kök gelişimi, hücrel farklılaşma, vasküler farklılaşma, polen tübü gelişimi, apikal dominansinin sürdürülmesi, çiçeklenme, senesens ve stres toleransının artırılması üzerine etkilidir (Rao vd. 2002; Savaldi-Goldstein vd. 2006; Clouse ve Sasse, 1998; Sasse, 2003; Amzalling ve Vaisman, 2006; Ashraf vd. 2010; Surgun vd. 2012). Çalışmada Sigma-Aldrich marka E1641 kodlu, CAS numarası 78821-43-9, molekül formülü $C_{28}H_{48}O_6$, molekül ağırlığı $480.68 \text{ g mol}^{-1}$, Test $\geq\%85$ “Epibrassinolid” kullanılmıştır (Resim 3.2).

SA: Salisilik asit bitkilerde yaygın olarak bulunan ve bitki büyüme ve gelişmesinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan, çiçeklenmeyi teşvik eden, bitkilerde sonradan kazanılmış sistemik dayanıklılığı teşvik eden ve farklı abiyotik stres koşulları altındaki bitkiyi strese karşı koruyan, oksinlerle birlikte köklenme üzerine son derece etkili hormon benzeri bir maddedir (Raskin, 1995; Klessig ve Malamy, 1994; Van der Krieker vd. 1997; Lee ve Skoog, 1965). Çalışmada Sigma-Aldrich marka S7401 kodlu, CAS numarası 69-72-7, molekül formülü $C_7H_6O_3$, molekül ağırlığı $138.12 \text{ g mol}^{-1}$, Test $\geq\%99$ “salisilik asit” kullanılmıştır (Resim 3.2).

TiO₂: Nano titanyum dioksit uygulamalarının tohum çimlenmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu, ışık emilimini artırarak fotosentezi desteklediği, yaşlı tohumların canlılığını ve klorofil biyosentezini arttırdığı, kuraklık stresi altındaki bitkilerde stresin etkilerini azalttığı, bakteriyel kontaminantları uzaklaştırmak için yararlı bir materyal olabileceği bildirilmektedir (Zheng vd. 2005; Hong vd. 2005; Zheng vd. 2008; Mingyu vd. 2007; Dehkourdi ve Mosavi, 2013; Safavi, 2014; Aghdam vd. 2016). Çalışmada Sigma-Aldrich marka 637254 kodlu, nanotoz, <25 nm partikül boyutu, Test %99.7 eser metal bazında, CAS numarası 1317-70-0, molekül ağırlığı TiO₂ 79.87 g mol^{-1} “Titanyum dioksit (Titanium (IV) oxide, anatase)” kullanılmıştır (Resim 3.2).

Pestisitler: Başlangıç sterilizasyon yöntemine alternatif sterilizasyon yöntemleri oluşturmak amacıyla modifiye edilen sterilizasyon yöntemlerinde çeşitli fungusitler ve antibiyotik kullanılmıştır. Fungusit olarak; 100 ml/ 100 l su dozunda 200 g/l Azoxystrobin+ 125 g/l Difenconazole etken maddeli fungusit, 200 ml/ 100 l su dozunda 500 g/l Fluazinam etken maddeli fungusit, 100 g/l Pyraclostrobin etken maddeli fungusit ve 500 ml/ 100 l su dozunda 12,5 g/l Fludioxonil+ 5 g/l Metulaxyl etken maddeye sahip fungusit kullanılmıştır. Bununla birlikte antibiyotik olarak hem besin ortamına eklenerek hemde sterilizasyon aşamasında 250 mg/l su dozunda Streptomycin sülfat kullanılmıştır.



Resim 3.2. Uygulamalarda kullanılan kimyasallar a) hazır MS ortamı b) benziaminopürin c) epibrassinolid ç) naftalen asetik asit d) salisilik asit e) titanyum dioksit.

Kültür kabı olarak cam kavanozlar ve falcon tüplerden yararlanılmıştır. Çalışma laminar akışlı steril kabinde gerçekleştirilmiş, her çalışmadan önce ve sonra hem kabin

içinde hemde laboratuvarında 30 dakika ultraviyole ışığı yakılarak ortam sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Besin Ortamı Hazırlanması ve Doku Kültürü Koşulları

In vitro çalışmalar için kullanılan tüm besin ortamları ve kullanılan malzemeler aseptik koşullar altında hazırlanmıştır.

MS ortamının hazırlanmasında MS bazal ortamına karbon kaynağı olarak 30 g L⁻¹ sakkaroz ve besin ortamının katılaşmasını sağlamak amacıyla 8 g L⁻¹ agar eklenmiştir. Besin ortamına eklenen agarı eritmek amacıyla mikrodalgadan yararlanılmıştır.

Hazırlanan MS ortamına farklı dozlarda (2 mg L⁻¹ ve 4 mg L⁻¹) BAP, (1 mg L⁻¹ ve 2 mg L⁻¹) NAA ve 5 µM Epi brassinolide (EpiBL), 1 mM Salisilik Asik (SA), 30 mg L⁻¹ Nano Titanyum Dioksit (TiO₂) eklenerek farklı besin ortamı kombinasyonları oluşturulmuştur. Kontrol uygulaması için bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamı kullanılmıştır. Deneme konuları Çizelge 3.1' de verildiği gibi oluşturulmuştur.

Çizelge 3.1. Deneme konularına ilişkin uygulama adları, uygulamaların içeriği ve uygulama dozları.

Uygulamalar	Uygulama İçeriği	Uygulama Dozları
U1	BAP	2 mg L ⁻¹
U2	BAP	4 mg L ⁻¹
U3	NAA	1 mg L ⁻¹
U4	NAA	2 mg L ⁻¹
U5	EpiBL	5 µM
U6	SA	1 mM
U7	TiO ₂	30 mg L ⁻¹
U8	BAP+ EpiBL	2 mg L ⁻¹ ve 5 µM
U9	BAP+ SA	2 mg L ⁻¹ ve 1 mM
U10	BAP+ TiO ₂	2 mg L ⁻¹ ve 30 mg L ⁻¹
U11	NAA+ EpiBL	1 mg L ⁻¹ ve 5 µM
U12	NAA + SA	1 mg L ⁻¹ ve 1 mM
U13	NAA + TiO ₂	1 mg L ⁻¹ ve 30 mg L ⁻¹
U14	BAP+NAA	2 mg L ⁻¹ ve 1 mg L ⁻¹
U15	BAP+NAA	4 mg L ⁻¹ ve 2 mg L ⁻¹
U16	Kontrol	

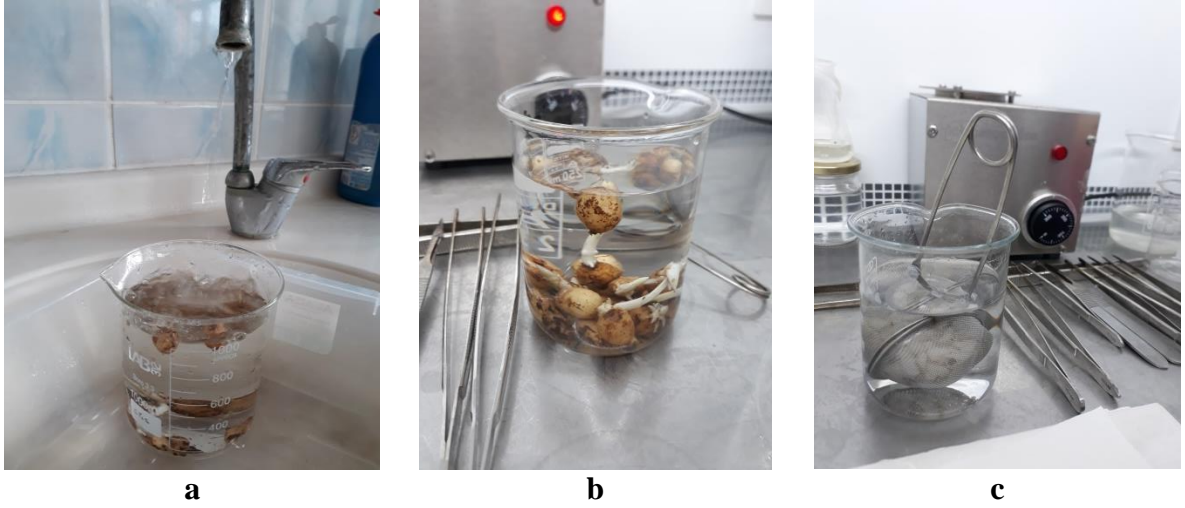
Bütün uygulamalarda, besin ortamı otoklavlanma işleminden önce pH 5.7' ye ayarlanmıştır. Besin ortamlarına eklenen agarın erimesi için mikrodalgadan yararlanılmış olup kültür kabı olarak kullanılan cam kavanozlara ve falcon tüplere besin ortamları dökülmüştür. Hazırlanan besin ortamlarının sterilizasyonu 121°C sıcaklıkta 20 dk süre ile 1.2 atmosfer basınçta otoklavda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu ve Eksplant Hazırlığı (Başlangıç Sterilizasyonu)

Üreticilerden temin edilerek Bahçe Bitkileri bölümüne ait ısıtmasız serada saksılara dikilen ve çiçeklenme zamanına kadar yetiştirilmiş olan salep orkideleri eksplant tiplerine göre farklı gelişme evrelerinde saksılardan sökülerek kültüre alınmıştır. Eksplant kaynağı olarak; salep orkidelerinin yumru, sürgün ucu, yaprak, çiçek ve çiçek sapı kullanılmıştır. Yaprak, çiçek ve çiçek sapı eksplant olarak alınırken salep bitkisi sökümü yapılmadan bitkiden kesilerek gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon aşamasında kullanılan tüm malzemeler bulaşık deterjanı ve sodyum hipoklorit bulunan çözeltilerde yıkanıp daha sonra otoklavlanarak kullanılmıştır.

3.2.2.1. Yumruların yüzey Sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonu için saksılardan çıkarılan yumrular, üzerlerindeki toprak partiküllerinin uzaklaştırılması amacıyla 30 dk boyunca çeşme suyunun altında bekletilmiştir. Sünger ve fırça ile gözenekli yapıdaki yumru yüzeylerinden toprak partikülleri uzaklaştırılmıştır. Yarım saatin sonunda yıkanan yumrular %70'lik etil alkol çözeltisinde 3-4 dk süresince çalkalayıcıda bekletilmiştir (200 rpm). Çalkalayıcıdan çıkan yumrular bir defa steril saf su ile yıkandıktan sonra %25'lik Sodyum Hipoklorit + Tween 20 içeren çözeltide 10 dk 200 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. Steril saf su ile 3 kez yumrular tekrar yıkandıktan sonra steril kabin içerisinde kültüre alınmışlardır (Sevindik ve Mendi, 2016; Koçak vd. 2014). Resim 3.3' de salep yumrularının yüzey sterilizasyonu aşamaları verilmiştir. Yumruların başlangıç sterilizasyonu aşamaları Çizelge 3.2' de verilmiştir.



Resim 3.3. Salep yumrularının yüzey sterilizasyonu aşamaları a) çeşme suyu altında yıkama b) %70'lik etil alkolde bekletme c) %25'lik sodyum hipokloritte bekletme.

3.2.2.2. Sürgün Ucu, Yaprak, Çiçek ve Çiçek Sapının Yüzey Sterilizasyonu

Araştırmada kullanılan eksplant tiplerinden sürgün ucu, yaprak, çiçek ve çiçek saplarının sterilizasyonunda ise; eksplantlar ön sterilizasyon amacıyla 10-15 dk çeşme suyu altında bekletilmiştir. Daha sonra %70'lik etil alkolde 3 dk çalkalayıcıda bekletilmiştir. Çalkalayıcıdan çıkarıldıktan sonra %25'lik Sodyum Hipoklorit + Tween 20 içeren çözeltide 5 dk 200 rpm'de çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra 3 kere saf su ile yıkanmıştır (Sevindik ve Mendi, 2016; Koçak vd. 2014). Sürgün ucu, yaprak, çiçek ve çiçek sapının başlangıç sterilizasyonu aşamaları Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Başlangıç sterilizasyonu aşamaları.

Başlangıç sterilizasyonu	
Yumru	Sürgün ucu, Yaprak, Çiçek, Çiçek sapı
<ul style="list-style-type: none"> ●30 dk çeşme suyu ile yıkama ●3-4 dk %70 etil alkolde bekletme ●Bir defa steril saf su ile yıkama ●10 dk %25 NaOCl+ Tween20 ●3 defa steril saf su ile yıkama 	<ul style="list-style-type: none"> ●10-15 dk çeşme suyu ile yıkama ●3 dk %70 etil alkolde bekletme ●Bir defa steril saf su ile yıkama ●5 dk %25 NaOCl+ Tween20 ●3 defa steril saf su ile yıkama

Yürütülen araştırma süresince alınan kültürlerde ve eksplantlarda karşılaşılan kontaminasyonlar sebebiyle başlangıçta kullanılan ve çalışmada başlangıç sterilizasyonu

olarak adlandırılan yüzey sterilizasyonu modifiye edilerek çeşitli alternatif sterilizasyon denemeleri yürütülmüştür.

3.2.3. Modifiye Edilmiş Sterilizasyon Uygulamaları

Salep orkideleri yumru bitkilerdir ve yeni yumru oluşturarak çoğalmalarını sağlamaktadırlar. Salep orkidelerinde toprak altı organları çoğaltımında kullanıldığından dolayı yumruları, kökleri, gövdenin bir kısmı toprakta olduğundan kaynaklı birçok hastalık etmenini yüzeylerinde barındırmaktadırlar. Eksplant olarak kullanılan yumruların yüzeylerinin pürüzlü olmaları nedeniyle yüzeyinde bulunan gözeneklerde toprak partiküllerinin bulunması pürüzlü gözenekler içerisinde fungal ve bakteriyel patojenleri barındırma olasılığının yüksek olması sterilizasyon aşamasında birçok probleme neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda başlangıç sterilizasyon yönteminin modifiye edilmesi gerekliliği karşımıza çıkmıştır. Bu bağlamda sterilizasyon yöntemleri modifiye edilirken bazı sterilizasyonlarda NaOCl konsantrasyonları %1'lik , %1,5'luk , %2'lik gibi değişiklik göstermiştir. Etil alkolde bekletme süreleri (30 sn, 1 dk, 2 dk, 3 dk), etil alkol yoğunlukları(%99, %96, %70) ve uygulandığı aşamalar farklılık göstermiştir. Sodyum hipoklorite Tween 20 eklenmesi yapılarak hazırlanan solüsyonlarda değişen konsantrasyonlar ve eksplant tiplerine bağlı olarak 5 dk, 10 dk, 15 dk, 20 dk, 25 dk, 30 dk olacak şekilde bekletme süreleri revize edilerek sterilizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilen sterilizasyonların uygulanma aşamaları Çizelge 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Modifiye edilmiş sterilizasyon uygulamaları ve aşamaları.

	Eksplant Tipi	Sterilizasyon Yöntemi		Eksplant Tipi	Sterilizasyon Yöntemi
S1	Yaprak	<ul style="list-style-type: none"> ▪60 dk çeşme suyu ile yıkama ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 dk % 1 NaOCl+ Tween20 ▪3 defa steril saf su ile yıkama ▪5 dk 250 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole 	S8	Yumru	<ul style="list-style-type: none"> ▪60 dk çeşme suyu ile yıkama ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 dk % 1,5 NaOCl+ Tween20 ▪3 defa steril saf su ile yıkama
S2	Yaprak	<ul style="list-style-type: none"> ▪60 dk çeşme suyu ile yıkama ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 sn % 70 etil alkolde bekletme ▪Steril saf su ile yıkama ▪10 dk % 2 NaOCl+ Tween20 ▪3 defa Steril saf su ile yıkama ▪5 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole 	S9	Yumru	<ul style="list-style-type: none"> ▪60 dk çeşme suyu ile yıkama ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 dk % 1,5 NaOCl+ Tween20 ▪3 defa steril saf su ile yıkama ▪2 dk 200 ml/100 lt Fluazinam
S3	Yumru	<ul style="list-style-type: none"> ▪60 dk çeşme suyu ile yıkama ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 sn % 70 etil alkolde bekletme ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 dk % 2 NaOCl+ Tween20 ▪3 defa steril saf su ile yıkama ▪5 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole 	S10	Yumru	<ul style="list-style-type: none"> ▪60 dk çeşme suyu ile yıkama ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 dk % 1,5 NaOCl+ Tween20 ▪3 defa steril saf su ile yıkama ▪2 dk 500 ml/100 lt Fludioxonil+Metulaxyl
S4	Yumru	<ul style="list-style-type: none"> ▪60 dk çeşme suyu ile yıkama ▪20 dk Bulaşık deterjanı ve Tween 20 içeren çözelti ▪Çeşme suyu ile yıkama ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 sn % 70 etil alkolde bekletme ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 dk % 2 NaOCl+ Tween20 ▪3 defa steril saf su ile yıkama ▪5 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole 	S11	çiçek ve çiçek sapı	<ul style="list-style-type: none"> ▪30 dk Bulaşık deterjanı ve Tween20 içeren çözelti ▪60 dk çeşme suyu ile yıkama ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 sn % 70 etil alkolde bekletme ▪Steril saf su ile yıkama ▪5 dk % 2 NaOCl+ Tween20 ▪3 defa steril saf su ile yıkama ▪3 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole
S5	Yumru, kök, yaprak, gövde	<ul style="list-style-type: none"> ▪60 dk çeşme suyu ile yıkama ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 sn % 70 etil alkolde bekletme ▪3 defa steril saf su ile yıkama ▪30 dk % 1,5 NaOCl+ Tween20 ▪Steril saf su ile yıkama 	S12	Yumru, kök, yaprak, gövde	<ul style="list-style-type: none"> ▪60 dk çeşme suyu ile yıkama ▪Steril saf su ile yıkama ▪30 dk % 1,5 NaOCl+ Tween20 ▪3 defa steril saf su ile yıkama ▪1 dk streptomycin sülfat ▪5 dk 50 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole

Çizelge 3.3. Modifiye edilmiş sterilizasyon uygulamaları ve aşamaları (Devamı).

	Eksplant Tipi	Sterilizasyon Yöntemi		Eksplant Tipi	Sterilizasyon Yöntemi
S6	Yumru, kök, yaprak, gövde	<ul style="list-style-type: none">▪60 dk çeşme suyu ile yıkama▪Steril saf su ile yıkama▪20 dk % 1,5 NaOCl+ Tween20▪3 defa steril saf su ile yıkama▪1 dk streptomycin sülfat▪5 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole	S13	Yumru, kök, yaprak, gövde	<ul style="list-style-type: none">▪60 dk çeşme suyu ile yıkama▪Steril saf su ile yıkama▪30 dk % 1,5 NaOCl+ Tween20▪3 defa steril saf su ile yıkama▪2 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole
S7	Yumru, kök, yaprak, gövde	<ul style="list-style-type: none">▪60 dk çeşme suyu ile yıkama▪Steril saf su ile yıkama▪5 dk 50 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole▪Steril saf su ile yıkama▪20 dk % 1,5 NaOCl+ Tween20▪3 defa steril saf su ile yıkama▪30 sn %70 etil alkolde bekletme			

3.2.4. İkinci Modifiye Edilmiş Sterilizasyon Uygulamaları (ST)

Yürütülen araştırma kapsamında *Ophrys* sp. ve *Orchis* sp. eksplantlarında yürütülen sterilizasyon denemesinde elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde; yapılan sterilizasyon yöntemlerinde canlılık olmasına rağmen kontaminasyonun oransal olarak azalmasına rağmen devam etmesi ikinci bir sterilizasyon denemesi kurulması gereğini karşımıza çıkarmıştır. Bu amaçla ikinci kez bir modifikasyona gidilerek 2. modifiye sterilizasyon (ST) uygulamaları oluşturulmuştur. Oluşturulan bu modifiye edilmiş sterilizasyon uygulamaları Çizelge 3.4’ de verilmiştir. Bu bağlamda yapılan sterilizasyon yöntemlerinden yola çıkarak modifiye edilmiş 15 farklı sterilizasyon uygulamasının bulunduğu deneme kurulmuştur.

Çizelge 3.4. ST sterilizasyon denemesinde yer alan uygulamalar ve aşamaları.

	Sterilizasyon Yöntemi		Sterilizasyon Yöntemi
ST1	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 5 dk %2 NaOCI+ Tween 20 3 kez steril saf su ile yıkama	ST9	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 5 dk %2 NaOCI+ Tween 20 3 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 100 g/ lt Pyraclostrobin
ST2	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 10 dk %2 NaOCI+ Tween 20 3 kez steril saf su ile yıkama	ST10	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 5 dk %2 NaOCI+ Tween 20 3 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 200 g/ lt Pyraclostrobin
ST3	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 10 dk %2 NaOCI+ Tween 20 3 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 100ml/100lt Azoxystrobin+Difenoconazole	ST11	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 10 dk %2 NaOCI+ Tween 20 3 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 100 g/ lt Pyraclostrobin
ST4	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 10 dk %2 NaOCI+ Tween 20 3 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 200ml/100lt Azoxystrobin+Difenoconazole	ST12	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 10 dk %2 NaOCI+ Tween 20 3 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 200 g/ lt Pyraclostrobin

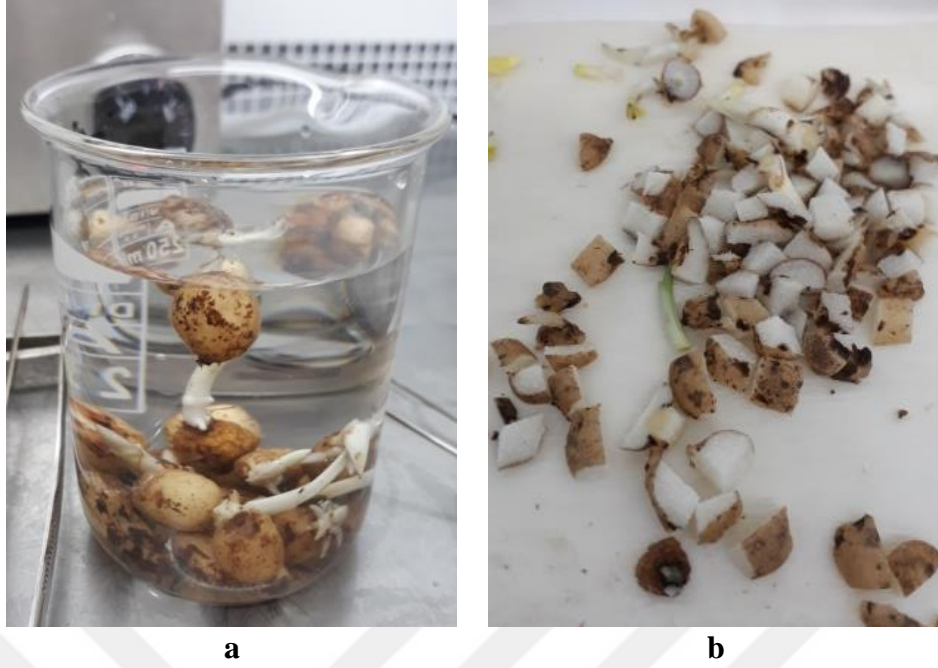
Çizelge 3.4. ST sterilizasyon denemesinde yer alan uygulamalar ve aşamaları (Devamı).

	Sterilizasyon Yöntemi		Sterilizasyon Yöntemi
ST5	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 5 dk %2 NaOCI+ Tween 20 3 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 100ml/100lt Azoxystrobin+Difenoconazole	ST13	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 100 g/ lt Pyraclostrobin
ST6	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 5 dk %2 NaOCI+ Tween 20 3 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 200ml/100lt Azoxystrobin+Difenoconazole	ST14	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 200 g/ lt Pyraclostrobin
ST7	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 100ml/100lt Azoxystrobin+Difenoconazole	ST15 (kontrol)	3 kez steril saf su ile yıkama
ST8	60 dk çeşme suyu ile yıkama 10 sn %70 etil alkolde bekletme 1 kez steril saf su ile yıkama 5 dk 200ml/100lt Azoxystrobin+Difenoconazole		

3.2.5. Eksplantların Kültüre Alınması

3.2.5.1. Yumruların Kültüre Alınması

Araştırmada kullanılan *Orchis* sp. ve *Ophrys* sp. salep yumruları steril kabin içerisinde sterilizasyona tabii tutulduktan sonra yine steril kabinde kültüre alınmıştır. Seçilen türlere ait sterilizasyonu yapılmış olan yumrular, yumru iriliklerine bağlı olarak ortalama 2, 4, 6 ve 8 parça olacak şekilde küçük dikdörtgen parçalar halinde kesilerek cam kavanozlardaki besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Yumruların sterilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra kültüre alınmak üzere parçalara bölünen yumru parçaları Resim 3.4' de verilmiştir.



Resim 3.4. a) Sterilizasyonu gerçekleşmiş yumrular b) kültüre alınmak üzere parçalara ayrılmış yumrular.

3.2.5.2. Sürgün Ucunun Kültüre Alınması

Denemede kullanılmak amacı ile sera koşullarında saksıda yetiştirilen salep yumrularında gelişme başladığı dönemde, yeni sürgün ucu çıkarmaya başlayan yumrulardan meristematik dokuları içeren sürgün uçları 2,5-3,0 cm olacak şekilde kesilip besin ortamlarına aktarılmıştır. Bu aşamada kullanılan eksplantların alımıda yine steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.3. Çiçeklerin Kültüre Alınması

Dikilen yumruların gelişimleri izlenerek oluşan iek sapları üzerindeki iek tomurcukları görüldüğünde açmadan önceki dönemde alınarak eksplant olarak kullanılmıştır. iek tomurcukları eksplant olarak direkt ya da bisturi ucu yardımıyla yaprakların çıkarılıp ovaryum olacak şekilde besin ortamlarına aktarılmıştır. Açmış olarak alınan çiçekler ise bisturi ile ta yaprakların kesilerek ovaryum parçası içerecek şekilde besin ortamlarında kültüre alınmıştır.

3.2.5.4. Çiçek Saplarının Kültüre Alınması

Yumrular üzerinde gelişen çiçek sapsarı yumrunun hemen üzerinden sapsın gelişmeye başladığı noktadan kesilerek alınmıştır. Alınan çiçek sapsarı önce 1 cm küçük parçalara bölünmüş daha sonra yüzey sterilizasyonuna tabii tutularak steril kabin ortamında hazırlanan besin ortamlarında kültüre alınmıştır.

3.2.6. Çalışmada İncelenen Parametreler

Deneme tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olacak şekilde kurulmuştur. Her kavanoza 5 adet eksplant konularak, her bir kavanoz 1 tekerrür olarak kabul edilmiştir. Kùltürlerin 4 haftada bir olacak şekilde alt kùltürü planlanmış fakat yaşanan kontaminasyon sebebiyle alternatif sterilizasyon denemeleri kurulmuştur. Kültüre alınmış eksplantlar, 1200 lüks ışık şiddeti altında, 14 saat/gün aydınlık ortamda, $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve nisbi nemi $\%65\pm 5$ olan kùltür odasında inkübe edilmişlerdir.

3.2.6.1. Canlılık Oranı (%)

Kùltüre alınan eksplantlardan canlı eksplantlar sayılarak yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.2. Enfeksiyon Oranı (%)

Kùltüre alınan eksplantlardan enfeksiyon olan eksplantlar sayılarak yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.3. Kallus Oluşturan Eksplant Oranı (%)

Kültüre alınan eksplantlardan kallus oluşturan eksplantlar sayılarak yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.4. Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)

Kültüre alınan eksplantlardan sürgün oluşturan eksplantlar sayılarak yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.2.6.5. Kültüre Alınan Eksplant Sayısı (Adet)

Besin ortamına kültüre alınan eksplantların sayısıdır.

3.2.6.6. Kallus Oluşturan Eksplant Sayısı (Adet)

Besin ortamına kültüre alınan eksplantlarda kallus oluşturan eksplantların sayısıdır.

3.2.6.7. Kararmış Eksplant Sayısı (Adet)

Kültüre alınan eksplantlarda fenolik salgısı nedeniyle kararmış eksplantların sayısıdır.

3.2.6.8. Canlı Eksplant Sayısı (Adet)

Besin ortamına kültüre alınan eksplantlarda canlı kalan eksplantların sayısıdır.

3.2.6.9. Enfeksiyonlu Eksplant Sayısı (Adet)

Besin ortamına kültüre alınan eksplantlarda enfeksiyon olan eksplantların sayısındır.

3.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmada elde edilen veriler üzerine varyans analizler için TARİST istatistiksel analiz programı kullanılmış ve veriler %5 hata olasılığına sahip LSD testine göre karşılaştırılarak uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



4. BULGULAR

Orchis sp. ve *Ophrys* sp. salep orkidelerinin kültüre alınması amacı ile yürütülen bu araştırmada kültür aşamasında karşılaşılan gelişme ve kontaminasyon durumlarına bağlı olarak düzenlemeler yapılmıştır. Bu amaçla özellikle deneme planlanırken oluşturulan başlangıç sterilizasyonu üzerinde farklı uygulamalar ilave edilerek modifikasyona gidilmiş ve yeni oluşturulan sterilizasyon protokolleri ile elde edilen sonuçlar bu bölümde değerlendirilmiştir.

4.1. Başlangıç Sterilizasyonu

Denemenin planlanması aşamasında oluşturulan ve başlangıç sterilizasyonu olarak tanımlanan yöntemde; öncelikli olarak ısıtmasız plastik serada yetiştirilen saleplerin yumruları, kökleri, gövde kısımları ve yaprakları eksplant olarak kullanılmıştır. Kasım ayında alınan yumrular başlangıçta planlanan sterilizasyon yöntemi ile sterilize edildikten sonra U1 (2 mg/l BAP) ortamında kültüre alınmışlardır. Eksplant olarak kullanılan kök, gövde, yaprak eksplantları ise sterilizasyon aşamasından sonra yumrular gibi U1 (2 mg/l BAP) besin ortamında kültüre alınmışlardır.

Başlangıç sterilizasyonu sonucunda kültüre alınan eksplantlar kontamine olmuş ve canlılıklarını kaybetmişlerdir. Canlılık oranı %0, enfeksiyon oranı %100 olduğundan dolayı projede planlanan sterilizasyon yöntemi başarısız olmuştur. Bu yüzden başlangıç sterilizasyonu modifiye edilerek farklı içeriklerde sterilizasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

4.2. Modifiye Edilmiş Sterilizasyon Uygulamaları

Salep orkideleri yumrulu bitkilerdir ve yeni yumru oluşturarak çoğalmalarını sağlamaktadırlar. Salep orkidelerinde toprak altı organları çoğaltımında kullanıldığından dolayı yumruları, kökleri, gövdenin bir kısmı toprakta olduğundan kaynaklı birçok hastalık

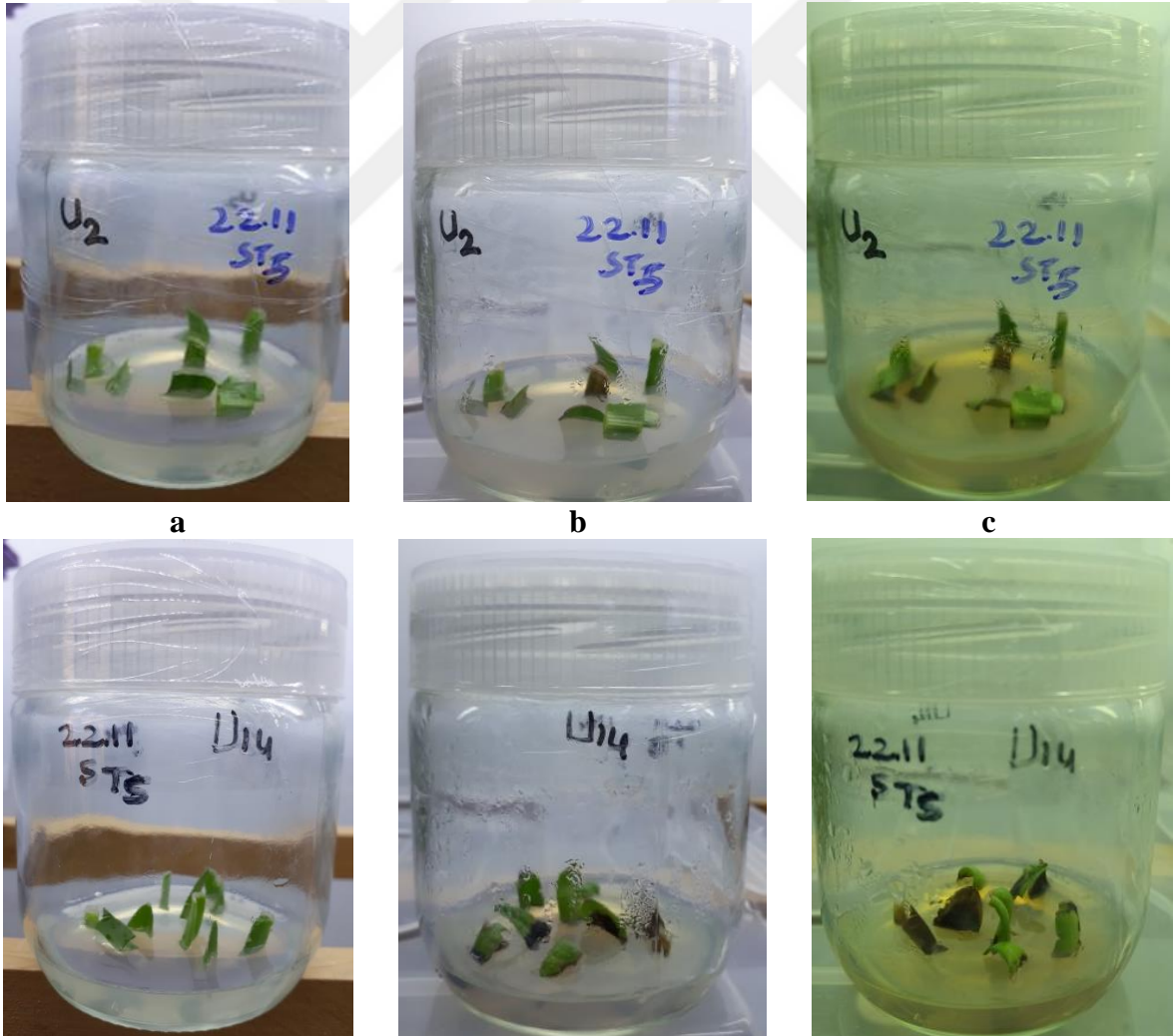
etmenini yüzeylerinde barındırmaktadırlar. Eksplant olarak kullanılan yumruların yüzeylerinin pürüzlü olmaları nedeniyle yüzeyinde bulunan gözeneklerde toprak partiküllerinin bulunması pürüzlü gözenekler içerisinde fungal ve bakteriyel patojenleri barındırma olasılığının yüksek olması sterilizasyon aşamasında birçok probleme neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda başlangıç sterilizasyon yönteminin modifiye edilmesi gerekliliği karşımıza çıkmıştır.

Bu bağlamda modifiye edilen sterilizasyon uygulamalarının ilki olan Sterilizasyon 1 (S1) uygulamasına bakıldığında eksplant olarak kasım ayında salep orkidelerinden alınan yaprak kullanılmıştır. Yapraklar 60 dk çeşme suyu altında yıkanmış ve daha sonra steril kabine alınmıştır. Burada 1 kez steril saf su ile tekrar yıkama yapıldıktan sonra 30 dk %1 NaOCl+ Tween20 çözeltisinde 200 rpm de karıştırıcıda steril edilmişlerdir. Çözeltiden çıkarılan yapraklar 3 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra 5 dk fungusit (250 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole) ile muamele edilerek besin ortamlarında kültüre alınmışlardır.

S1 uygulaması yapıp kültüre alınan yaprak eksplantlarının canlılık oranı ve enfeksiyon oranı üzerinde yapılan istatistiksel değerlendirmede 15. günde canlılık oranı ve enfeksiyon oranı interaksiyonu faktörlerine bağlı olarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge 4.1 incelendiğinde; 15. günde eksplantların besin ortamında canlı olarak elde edilen canlılık oranı ortalaması açısından istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Sonuçlara göre canlılık oranı 15. günde U1 (2 mg/l BAP), U4 (2 mg/l NAA), U14 (2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA), U15 (4 mg/l BAP+ 2 mg/l NAA) besin ortamlarında %100 oranla ile en yüksek canlılık oranlarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Canlılık oranları arasında en düşük oran %33,33 ile U1 ve U3 besin ortamı olmuştur. Enfeksiyon oranı ortalamalarında ise istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunamamıştır. Bu bağlamda Çizelge 4.1 incelendiğinde; 15. günde enfeksiyon oranı en yüksek U3 ve U14 besin ortamında meydana geldiği gözlemlenmiştir. Resim 4.1’ de S1 uygulamasının kültürün ilk günü, kültürün 8. günü, kültürün 15.günü verilmiştir.

Çizelge 4.1. S1 uygulaması yapıp kültüre alınan yaprak eksplantlarının canlılık ve enfeksiyon oranları.

Sterilizasyon	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	15. gün		
				EO (%)	CO (%)	
S1	Yaprak	U1	3	44,443	33,330	c
		U1	3	0,000	100,000	a
		U2	3	66,665	77,777	ab
		U2	3	33,330	88,889	ab
		U3	3	77,780	33,330	c
		U4	3	0,000	100,000	a
		U4	3	0,000	100,000	a
		U14	3	77,777	66,670	abc
		U14	3	0,000	100,000	a
		U15	3	0,000	100,000	a
		U15	3	66,670	55,567	bc
		U16	3	55,553	66,670	abc
LSD (%5) değeri				92,137öd	34,895**	
KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı						



Resim 4.1. S1 uygulamasında kültüre alınan yaprak eksplantlarının görünüşleri a) kültürün ilk günü b) kültürün 8. günü c) kültürün 15. günü.

S1 yönteminde olduğu gibi S2 yönteminde de ocak ayında alınan yaprak eksplanti kullanılmıştır. 60 dk çeşme suyu altında yıkanan yaprak eksplantları steril kabine alınıp steril saf su ile yıkama yapılmış ve daha sonra 30 sn %70 etil alkolde bekletilmişlerdir. Tekrar steril saf su ile yıkama yapılan yapraklar 10 dk %2 NaOCl+ Tween 20 de karıştırıcıda bekletilip 3 defa steril saf su ile yıkama yapılmıştır. Eksplantların dezenfeksiyonu amacı ile bu uygulamada Azoxystrobin+Difenoconazole etken maddeli fungusit kullanılmıştır. Yapraklar 5 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole etken maddeye sahip fungusitte bekletildikten sonra besin ortamlarına kültüre alınmışlardır.

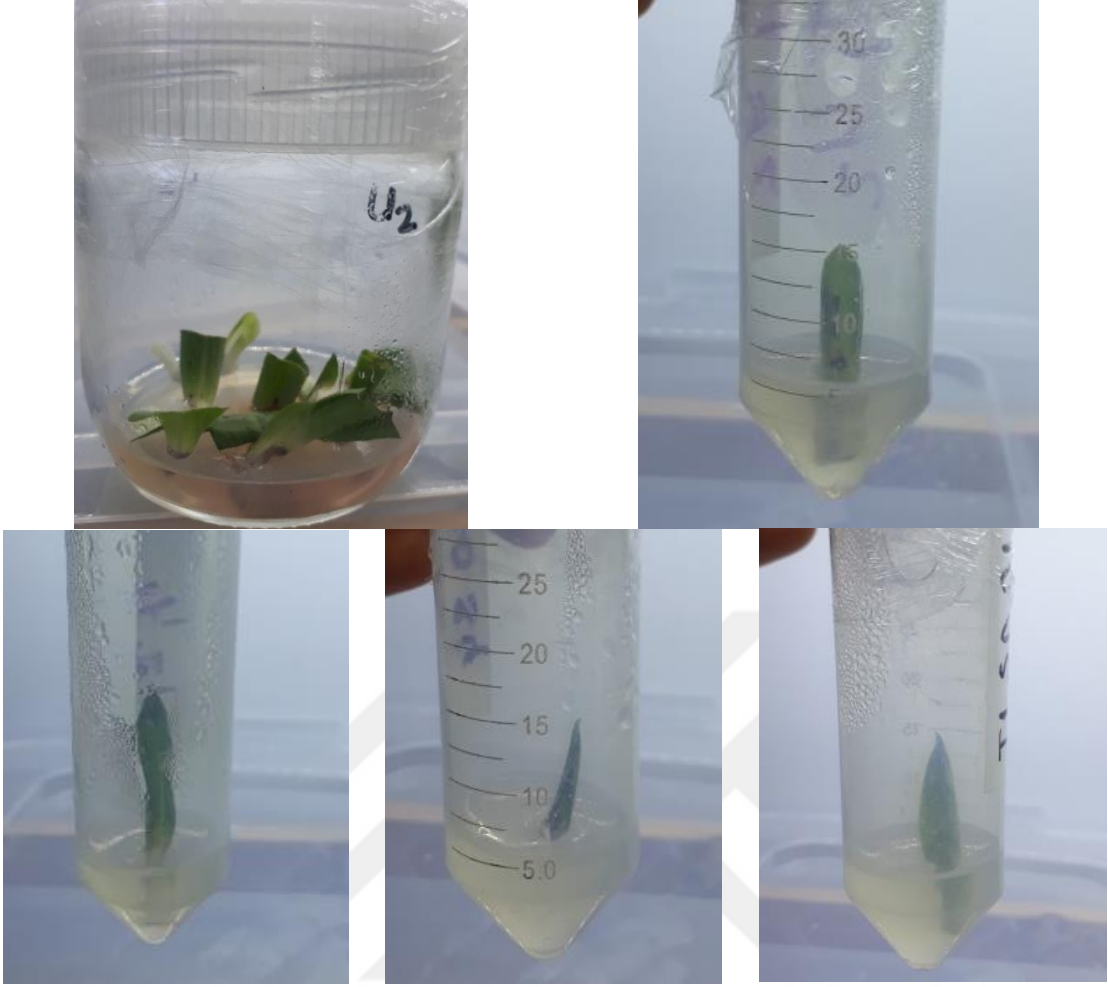
U2 besin ortamında kültüre alınan yaprak eksplantlarının 8. günde canlılık oranı %100 olarak Çizelge 4.2' de görülmektedir. Enfeksiyon oranı 8. günde %0 olarak görülürken 15. günde bu değer artmış ve %91,67 olmuş, canlılık oranı %8,33'e düşmüştür. Kültüre alınan eksplantlar ilerleyen günlerde canlılıklarını tamamen kaybetmişlerdir.

Kontaminasyon riskini en aza indirmek amacıyla S2 uygulamasında falcon tüpler kullanılmıştır. Falcon tüplerin içerisine hormon bulunmayan ½ MS ortamı dökülmüştür. Her falcon tüpte 1 eksplant bulunacak şekilde kültüre alınan yaprakların canlılık oranlarına bakıldığında ise Çizelge 4.2' de görüldüğü üzere 8. gün %100, 15. gün %95,45, 23. gün %95,45 olmuştur. Enfeksiyon oranı 15. ve 23. günde %4,55 ile sabit kalmasına rağmen 23. günde kültüre alınan 22 eksplanttan 7 tanesinde kararına gözlemlenmiştir. Resim 4.2, Resim 4.3, Resim 4.4' de kültürün 8, 15 ve 23 gün sonraki durumları verilmiştir.

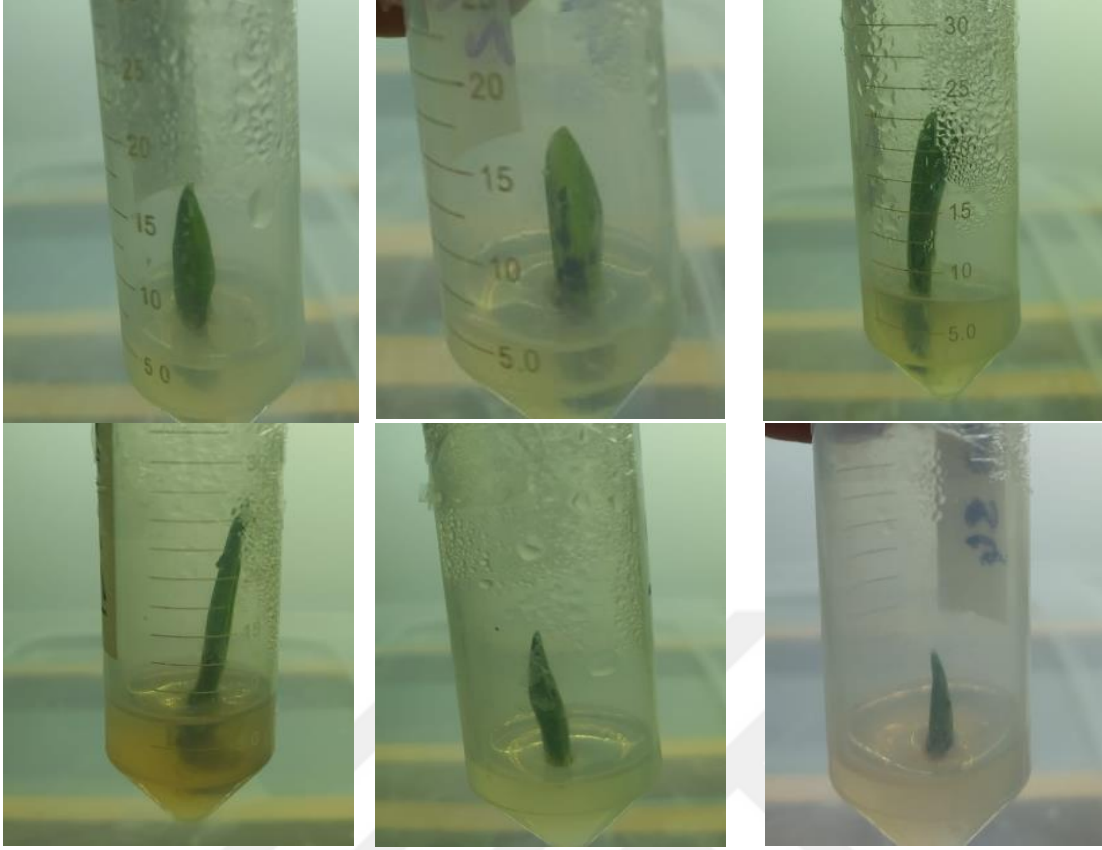
Çizelge 4.2. S2 uygulaması yapıp kültüre alınan yaprak eksplantlarının canlılık ve enfeksiyon oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	KES (adet)	CO (%)	EO (%)
S2	Yaprak	U2	12	8	12	0	0	100	0
				15	1	11	8	8,33	91,67
		½ MS	22	8	22	0	0	100	0
				15	21	1	0	95,45	4,55
				23	14	1	7	95,45	4,55

KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, KES: kararlı eksplant sayısı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı



Resim 4.2. S2 uygulamasında kültüre alınan yaprak eksplantlarının 8 gün sonraki kültür görüntüleri.



Resim 4.3. S2 uygulamasında kültüre alınan yaprak eksplantlarının 15 gün sonraki kültür görüntüleri.



Resim 4.4. S2 uygulamasının 23 gün sonraki kültür görüntüleri.

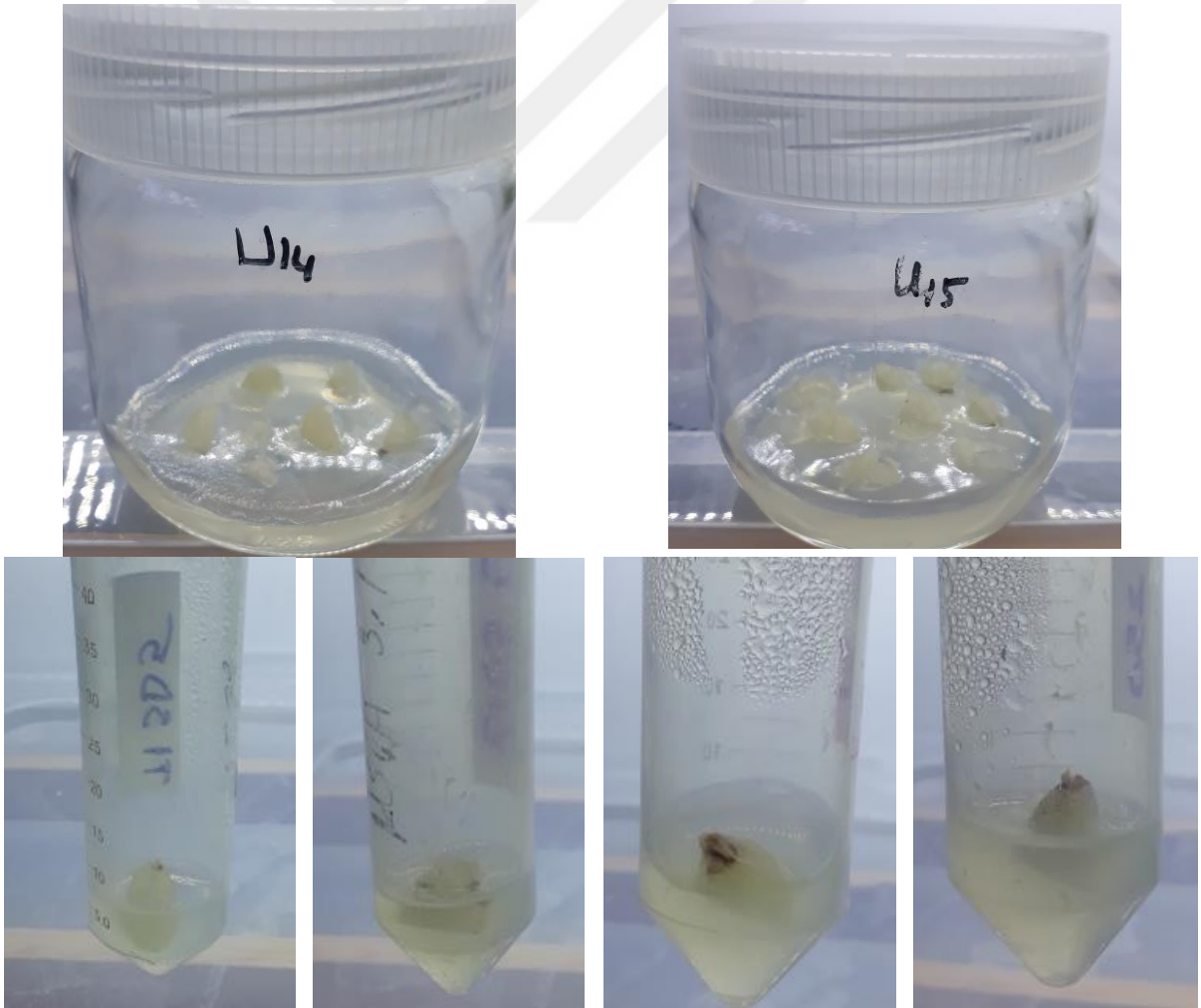
S3 sterilizasyon yönteminde ise diğer yöntemlerden farklı eksplant olarak ocak ayında alınan yumrular kullanılmıştır. S3 uygulamasında (30 sn %70 etil alkol, 30 dk %2 NaOCl+ Tween 20, 5 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole) elde edilen sonuçlara baktığımızda ise; U14 (2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA) besin ortamında kültüre alınan yumruların canlılık oranı 8. günde %100 olarak karşımıza çıkarken 15. günde %85,71 düştüğü görülmektedir. Enfeksiyon oranı ise 8. günden 15. güne kadar olan sürede %0'dan %14,29' a yükselmiştir. S2 uygulamasına benzer şekilde S3 uygulamasında da falcon tüpler kullanılmış ve her bir falcon tüp içerisinde eksplant olarak 1adet yumru parçası kültüre alınmıştır. Falcon tüpler içerisine hormon bulunmayan $\frac{1}{2}$ MS ortamı dökülmüştür. S3 sterilizasyon yapılarak $\frac{1}{2}$ MS ortamında kültüre alınan eksplantlarda 8 günlük periyot sonunda yumruların canlılık oranı %100 iken; 15. günde bu %65,22 olarak saptanmış ve 23. Gün yapılan gözlem süresine kadar canlılık kaybı yaşanmamıştır. Çizelge 4.3 incelendiğinde enfeksiyon oranı %0 dan %34,78'e yükseldiği görülmektedir. Ayrıca kültüre

alınan yumru eksplantlarının 23 tanesinden 3'ü karamıştır. Resim 4.5' de 8 gün sonraki, Resim 4.6' da 23 gün sonraki kültüre alınmış yumru eksplantları görülmektedir.

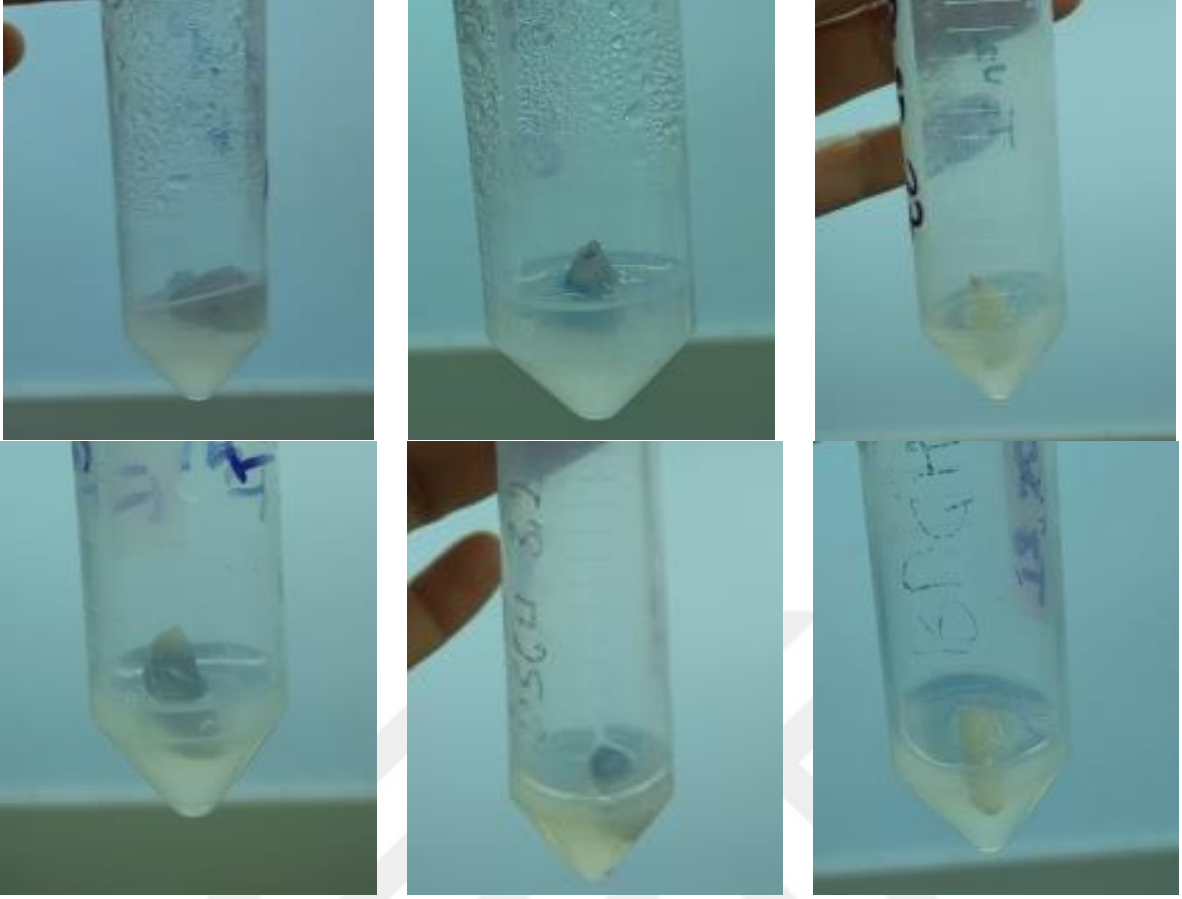
Çizelge 4.3. S3 uygulaması yapılp kültüre alınan yumru eksplantlarının canlılık ve enfeksiyon oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	KES (adet)	CO (%)	EO (%)
S3	Yumru	U14	7	8	7	0	0	100	0
				15	6	1	3	85,71	14,29
		U15	8	8	8	0	0	100	0
				15	8	0	2	100	0
		½ MS	23	8	23	0	0	100	0
				15	15	8	0	65,22	34,78
		23	15	8	3	65,22	34,78		

KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, KES: karamış eksplant sayısı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı



Resim 4.5. S3 uygulamasında kültüre alınan eksplantların 8 gün sonraki kültür görüntüleri.



Resim 4.6. S3 uygulamasında kültüre alınan eksplantların 23 gün sonraki kültür görüntüleri.

Çalışmada modifiye edilerek kullanılan bir diğer sterilizasyon yönteminde (S4) ise; mart ayında alınan yumru parçası eksplantları öncelikli olarak fırça yardımı ile çeşme suyu altında yıkanmış, sonra 20 dk bulaşık deterjanı+ Tween 20 içeren solüsyonda bekletilmiştir. Daha sonra steril saf su ile 1 kez yıkanarak 30sn %70 etil alkolden sonra steril saf su ile yıkama yapılmıştır. 30 dk %2 NaOCl+ Tween 20’de steril edilerek 3 defa steril saf su ile yıkamadan sonra 5 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole ile muamele edilmiş (S4) ve kültüre alınmışlardır. Kültür kabı olarak falcon tüpler kullanılmış ve her falcon tüpte 1 eksplant yumru parçası kültüre alınmıştır. Resim 4.7’ de S4 uygulamasının aşamaları verilmiştir.



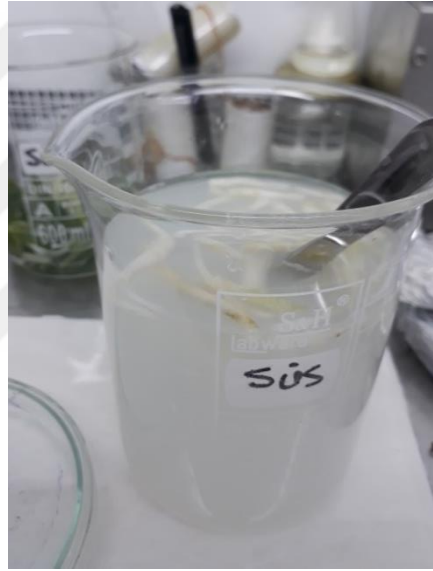
a



b



c



d

Resim 4.7. S4 uygulamasının aşamaları a) steril saf su ile yıkama b) yumruların NaOCl çözeltisinde sterilizasyonu c) yaprakların NaOCl çözeltisinde sterilizasyonu d) eksplantların fungusitle muamelesi.

Çizelge 4.4 incelendiğinde U1(2 mg/l BAP) besin ortamında 8. günde canlılık oranı %100 iken 19. günde %0 olmuş eksplantların canlılığını kaybettiği görülmüştür. U2, U5,U13, U15 besin ortamında kültüre alınan yumru parça ekplantları 32. güne kadar canlılıklarını kaybetmemiş ve canlılık oranı %100 olmuştur. U3 besin ortamında canlılık oranı 8. günde %100 olarak görülmekteyken 32. günde %75,00 olarak karşımıza çıkmış ve enfeksiyon oranı ilk kültüre alındığı günden 32. güne kadar %25 çıktığı gözlemlenmiştir. U4 besin ortamında canlılık oranı 8. ve 19. günde %100 iken 32. günde %66,67'ye

düşmüştür. U6 besin ortamında ise 8. günde %50 olarak karşımıza çıkan canlılık oranı 32. günde de %50 olarak saptanmıştır. U6 kültürüne benzer şekilde U9 ve U12 kültürlerinin de 32. güne kadar canlılık oranları %50 olmuştur. U7 kültüründe ise 8. ve 19. günde %100 olan canlılık oranları eksplantların kararmasından dolayı 32. günde %0 olarak canlılıklarını kaybettikleri görülmüş ve bu canlılık kaybının kararmaya bağlı olarak besin ortamında ve eksplantlarda ortaya çıkan kontaminasyondan kaynaklandığı kanaatine varılmıştır. U14 besin ortamındaki kültürlerde ise; 8. günde %100 olan canlılık oranı 19. günde %66,67 olmasından dolayı 32. günde enfeksiyon oranı %33,33 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. S4 uygulaması yapıp kültüre alınan yumru eksplantlardaki canlılık ve enfeksiyon oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	KES (adet)	CO (%)	EO (%)
S4	Yumru	U1	1	8	1	0	0	100	0
				19	0	1	0	0	100
				32	0	0	0	100	100
		U2	2	8	2	0	0	100	0
				19	2	0	0	100	0
				32	2	0	0	100	0
		U3	4	8	4	0	0	100	0
				19	4	0	0	100	0
				32	3	1	0	75	25
		U4	3	8	3	0	0	100	0
				19	3	0	0	100	0
				32	2	1	0	66,67	33,33
		U5	1	8	1	0	0	100	0
				19	1	0	0	100	0
				32	1	0	0	100	0
		U6	2	8	2	1	0	50	0
				19	2	1	0	50	0
				32	2	1	0	50	0
		U7	1	8	1	0	0	100	0
				19	1	0	0	100	0
				32	0	1	1	0	100
		U9	2	8	2	1	0	50	0
				19	2	1	0	50	0
				32	2	1	1	50	0
		U12	2	8	2	1	0	50	0
				19	2	1	0	50	0
				32	1	0	0	100	50
		U13	1	8	1	0	0	100	0
				19	1	0	0	100	0
				32	1	0	0	100	0
U14	6	8	6	0	0	100	0		
		19	4	2	0	66,67	33,33		
		32	4	2	0	66,67	33,33		
U15	1	8	1	0	0	100	0		
		19	1	0	0	100	0		
		32	1	0	0	100	0		

KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, KES: kararmış eksplant sayısı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı

Çalışma kapsamında yürütülen birinci modifiye edilmiş sterilizasyon uygulamasına ait Çizelge 3.3 incelendiğinde; bu sterilizasyon denemesinde yer alan S5 uygulamasında; eksplant olarak aralık ayında alınan yumru kullanılan U15 (4 mg/l BAP+ 2 mg/l NAA) besin ortamında 10 adet eksplant kültüre alınmış ve enfeksiyon oranı %0 olarak karşımıza çıkmıştır. Eksplantların kültüre alındığı ilk günden itibaren 35. güne kadar canlılık oranı %100 olmasına rağmen yumru veya sürgün oluşumuna ilişkin bir gelişme saptanamamıştır. Kök, yaprak ve gövde eksplantlarının kültüre alındığı besin ortamında enfeksiyon oranı kültür boyunca %0 olarak devam etmiş fakat yumruların kültüründe olduğu gibi kök, gövde ve yaprak kültüründe de gelişme veya kallus oluşumu gözlemlenememiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. S5 uygulaması yapıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık ve enfeksiyon oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	CO (%)	EO (%)
S5	Yumru	U15	10	18	10	0	100	0
				28	10	0	100	0
				35	10	0	100	0
	Kök, Gövde, Yaprak		10	18	10	0	100	0
				28	10	0	100	0
				35	10	0	100	0
KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı								

Modifiye edilmiş birinci sterilizasyon denemesinde; S6 uygulamasında aralık ayında alınan ve çeşme suyu altında yıkanan yumrular, kök, gövde ve yaprak eksplantları steril kabine alınarak 20 dk %1,5 NaOCl+ Tween20 de bekletilmiş, steril saf su ile yıkandıktan sonra 1dk streptomycin sülfat ile muamele edilerek 5 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole da bekletilmiştir. Çizelge 4.6' da verildiği üzere kültüre alınan eksplantların 35 günlük kültür süresinde %100 canlılık devam etmiştir. Kontaminasyon görülmemesine rağmen kültürde kallus veya benzeri bir yapı gelişimi herhangi bir hücre farklılaşması ve gelişimi saptanamamıştır.

Çizelge 4.6. S6 uygulaması yapıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık ve enfeksiyon oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	CO (%)	EO (%)
S6	Yumru	U15	10	18	10	0	100	0
				28	10	0	100	0
				35	10	0	100	0
	Kök, Gövde, Yaprak		10	18	10	0	100	0
				28	10	0	100	0
				35	10	0	100	0

KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı

Bir başka sterilizasyon yöntemi denemesinde 5dk 50 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole, 20 dk %1,5 NaOCl+ Tween20, 30 sn % 70 etil alkol (S7) aşamaları gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda Çizelge 4.7' de verilen canlılık ve enfeksiyon oranları belirlenmiştir. Bu sterilizasyon uygulamasında da eksplant olarak aralık ayında alınan yumru, kök, gövde ve yapraklar kullanılmıştır. Eksplantlar 35. güne kadar canlılıklarını korumuş ve enfeksiyon oranı %0 olarak belirlenmiş olmasına rağmen S5 ve S6 sterilizasyon uygulamalarında olduğu gibi kallus oluşumu veya yumru gelişimi söz konusu olmamıştır.

Çizelge 4.7. S7 uygulaması yapıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık ve enfeksiyon oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	CO (%)	EO (%)
S7	Yumru	U15	10	18	10	0	100	0
				28	10	0	100	0
				35	10	0	100	0
	Kök, Gövde, Yaprak		10	18	10	0	100	0
				28	10	0	100	0
				35	10	0	100	0

KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı

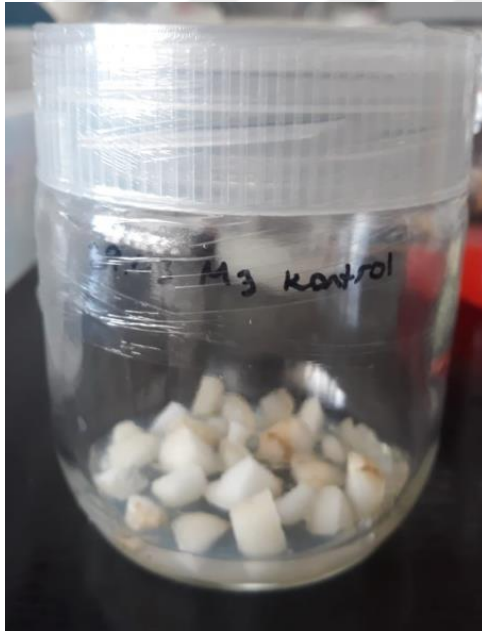
Denemede yer alan sterilizasyon yöntemlerinden bir diğeri olan S8 uygulamasında (30 dk %1,5 NaOCl+ Tween 20), mart ayında alınan salep yumru parçaları eksplant olarak kullanılmıştır. U15 (2 mg/l NAA+ 4 mg/l BAP) besin ortamı kullanılan yumruların canlılık oranı 14. gün %54,55 ve 18. gün %50,0 olmasına rağmen 22. günde alınan verilere göre canlılıklarını kaybettikleri saptanmıştır. S8 sterilizasyon uygulaması yapılarak U15 besin

ortamında kültüre alınan yumru parçalarında kallus oluşumu saptanmıştır. Kültüre alındıktan 14 gün sonra kallus oluşturma oranı %4,55 olarak gözlemlenirken bu oran 18 gün sonrada değişmemiştir. Fakat 22 gün sonra oluşan kontaminasyondan dolayı enfeksiyon oranının %100 olması ile birlikte kallus oluşturan eksplant canlılıklarını kaybetmiş kallus geliştiren bu eksplantlarda herhangi bir sürgün gelişimi veya yumru taslağı oluşumu meydana gelmemiştir (Çizelge 4.8). Resim 4.8’ de kültürün ilk ve 14 gün sonraki durumu, Resim 4.9’ da 14 gün sonra gelişen eksplantın görüntüsü verilmiştir.

Çizelge 4.8. S8 uygulaması yapıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	KOES (adet)	KOEO (%)	CO (%)	EO (%)
S8	Yumru	U15	22	14	12	10	1	4,55	54,55	45,45
				18	12	11	1	4,55	50,00	45,45
				22	0	22	0	0,00	0,00	100,0

KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, KOES: kallus oluşturan eksplant sayısı, KOEO: kallus oluşturan eksplant oranı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı



Resim 4.8. S8 uygulamasının soldan sağa ilk kültüre alındığı gün ve 14 gün sonra görüntüsü.



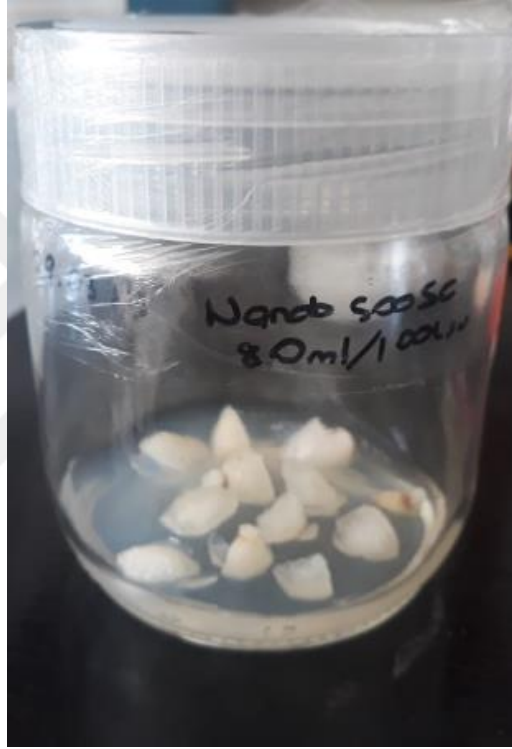
Resim 4.9. S8 uygulamasında 14. günde yumru eksplantında oluşan kallus gelişiminin görünümü.

Mart ayında alınan yumrular önce toprak patiküllerinden temizlenmesi amacıyla 60 dk çeşme suyu altında yıkanmış daha sonra steril kabine alınarak 1 kez steril saf su ile tekrar yıkanmıştır. S9 uygulamasında karıştırıcıda 30 dk %1,5 NaOCl+ Tween20 çözeltisinde bekletilen yumrular steril saf su ile yıkama yapıldıktan sonra 2 dk 200 ml/100 lt Fluazinam ile muamele edilerek U15 besin ortamında kültüre alınmışlardır. U15 besin ortamında yumrular 14, 18, 22 ve 29. gün olarak canlılık oranı, kallus oranı ve enfeksiyon oranları kaydedilmiştir. Bu bağlamda yumruların canlılık oranları 14. gün %66,67 iken 18. ve 22.gün %41,67'e düşmüştür. Ancak 29. günde bu oran düşerek %25,0 olmuştur. Yumru eksplantları 14. günde kallus oluşturmamasına rağmen 18 gün sonra kallus oluşumu gözlemlenmiştir. 29 günlük kültür süresi sonunda kallus oluşturan eksplant oranı %8,33 olarak sabit kalmıştır. Kontaminasyon olmasına rağmen kallus gelişimi devam etmiştir (Çizelge 4.9). S9 uygulamasının Resim 4.10' de kültüre alındığı ilk gün, Resim 4.11' de kültürün 14. günü, Resim 4.12'de kültürün 18. günü, Resim 4.13' de kültürün 22. günü, Resim 4.14'de kültürün 29. günü, Resim 4.15'da kallus oluşturan eksplantın aktarımı verilmiştir.

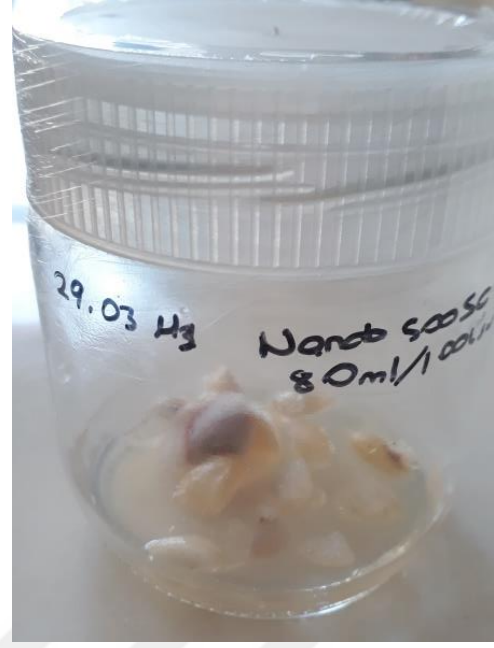
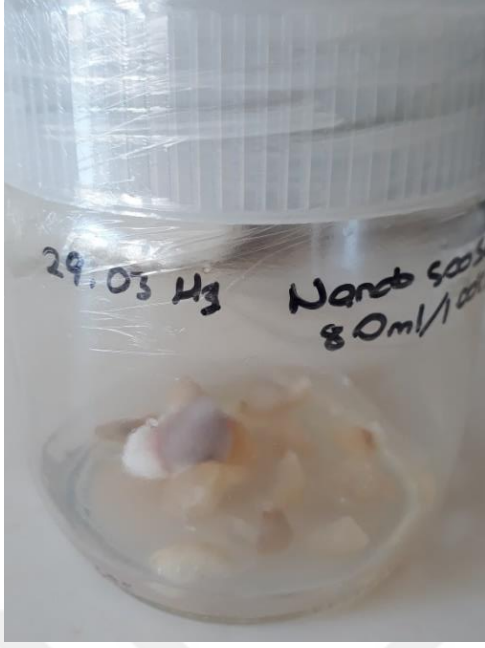
Çizelge 4.9. S9 uygulaması yapıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	KOES (adet)	KOEO (%)	CO (%)	EO (%)
S9	Yumru	U15	12	14	8	4	0	0	66,67	33,33
				18	5	7	1	8,33	41,67	58,33
				22	5	7	1	8,33	41,67	58,33
				29	3	9	1	8,33	25,00	75,00

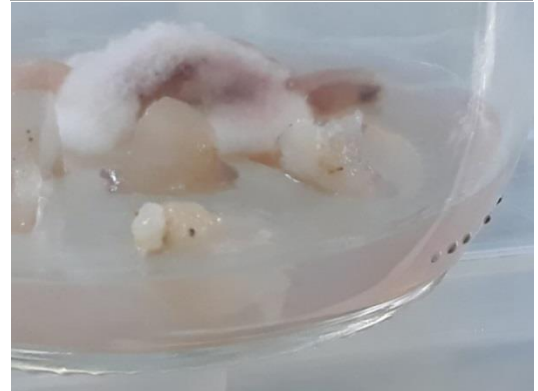
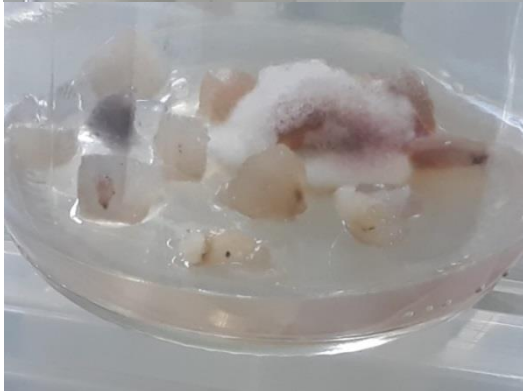
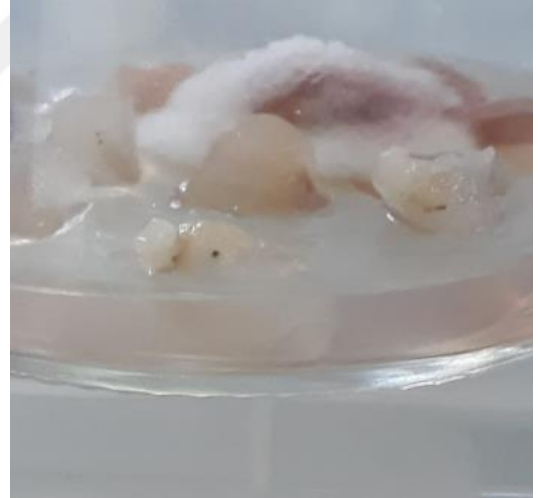
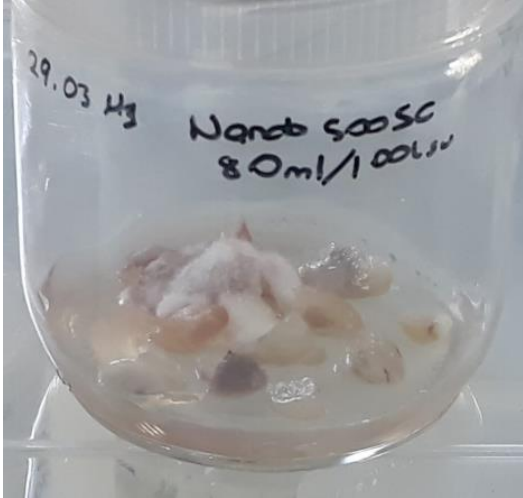
KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, KOES: kallus oluşturan eksplant sayısı, KOEO: kallus oluşturan eksplant oranı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı



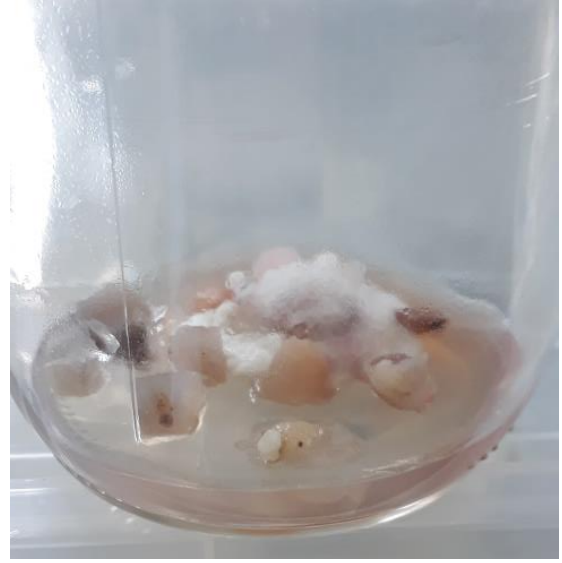
Resim 4.10. S9 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların ilk günkü görünümü.



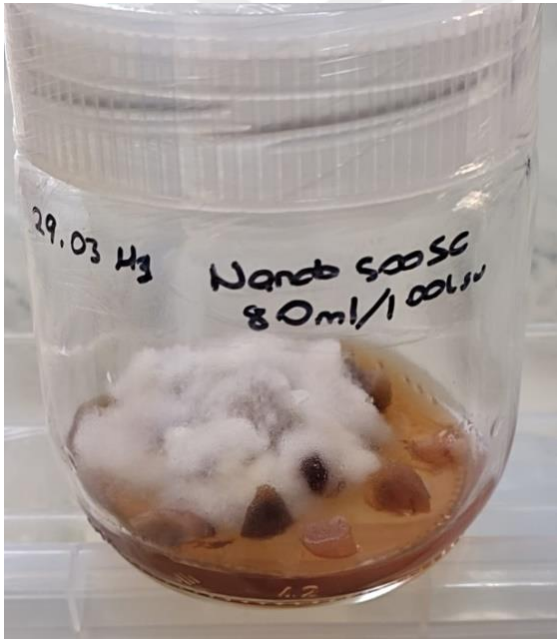
Resim 4.11. S9 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 14. günkü görünümü.



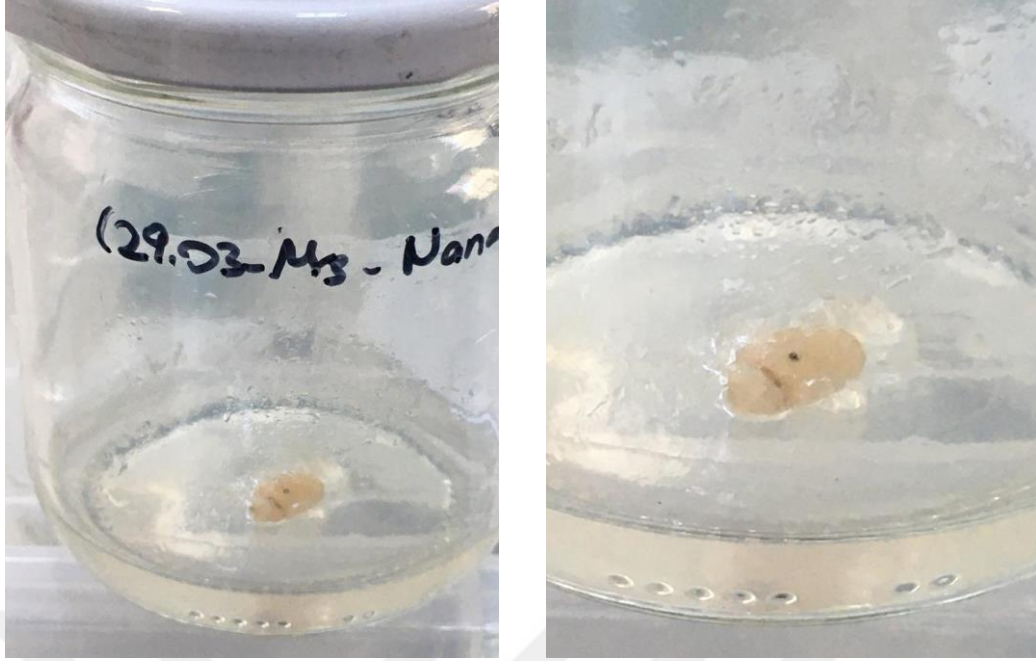
Resim 4.12. S9 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 18. günkü görünümü.



Resim 4.13. S9 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 22. günkü görünümü.



Resim 4.14. S9 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 29. günkü görünümü.



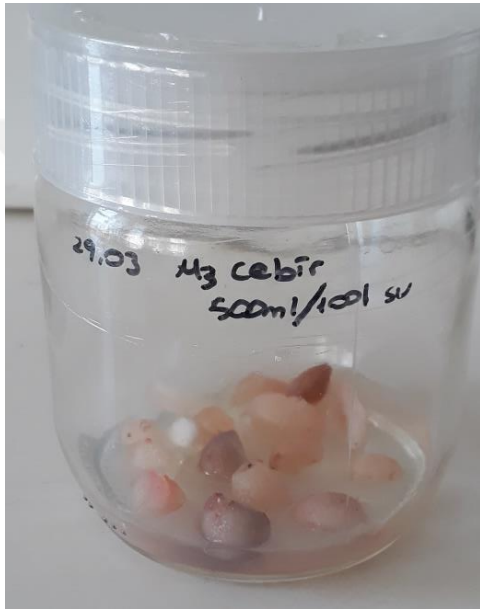
Resim 4.15. S9 uygulaması kallus oluşturan eksplantın aktarımından bir görüntü.

Araştırmada yer alan bir diğer sterilizasyon uygulaması olan S10'da ise S9 uygulamasına benzer aşamalar takip edilmiş fakat fungusit olarak 2 dk 500 ml/100 lt Fludioxonil+Metulaxyl kullanılarak sterilizasyon tamamlanmıştır (Çizelge 3.3). Bu sterilizasyon yönteminde ise eksplant olarak kullanılan yumrular mart ayında alınmıştır. Yumruların canlılık oranları 14 gün sonra %94,12 olarak karşımıza çıkmaktayken 18 gün sonra bu oranda değişim olmamıştır (Çizelge 4.10). 22. gün alınan verilere göre enfeksiyon oranı yükselerek %11,76 olmuş ve 29. günde enfeksiyon oranı %47,06 'ya yükselmiştir. Yumru eksplantları U15 (4 mg/l BAP+ 2 mg/l NAA) besin ortamında kültüre alınmışlardır. Kültüre alınan 17 adet eksplanttan 1 adedinde kallus gelişimi belirlenmiştir. 29 günlük kültür süresince kallus oranı %5,88 ile sabit kalmıştır. Kallus geliştiren eksplant canlılığını oluşturan enfeksiyona rağmen devam ettirmiştir. Daha sonra kararına nedeniyle canlılığını yitirmiştir. S10 uygulamasının, Resim 4.16' da kültürün 14 gün sonraki durumu ve kallus oluşturan eksplant, Resim 4.17' de kültürün 22 gün sonraki durumu, Resim 4.18' de kültürün 29 gün sonraki durumu, Resim 4.19' de kallus geliştiren eksplantın 29 gün sonraki durumu, Resim 4.20' de kallus gelişimi görülen eksplantın aktarımı verilmiştir.

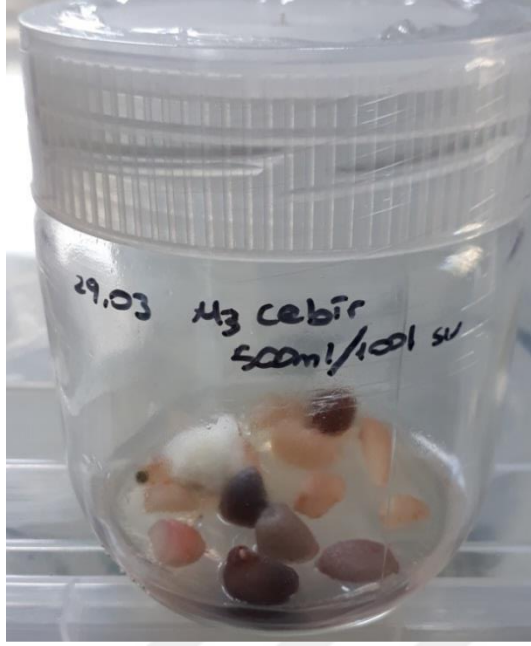
Çizelge 4.10. S10 uygulaması yapıp U15 ortamına kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	KOES (adet)	KOEO (%)	CO (%)	EO (%)
S10	Yumru	U15	17	14	16	1	1	5,88	94,12	5,88
				18	16	1	1	5,88	94,12	5,88
				22	15	2	1	5,88	88,24	11,76
				29	9	8	1	5,88	52,94	47,06

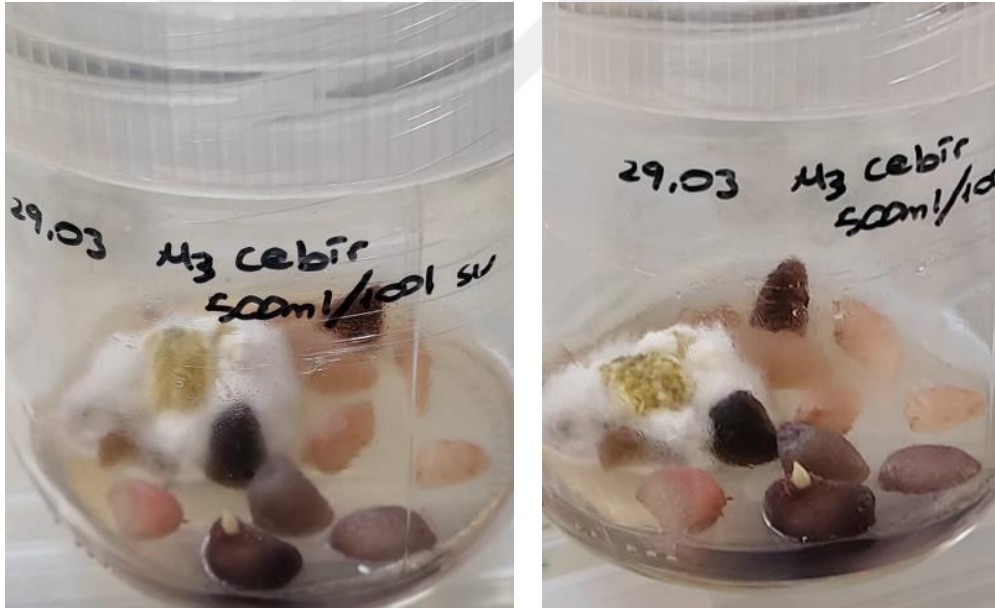
KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, KOES: kallus oluşturan eksplant sayısı, KOEO: kallus oluşturan eksplant oranı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı



Resim 4.16. S10 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 14. günkü görünümü ve kallus oluşturan eksplant.



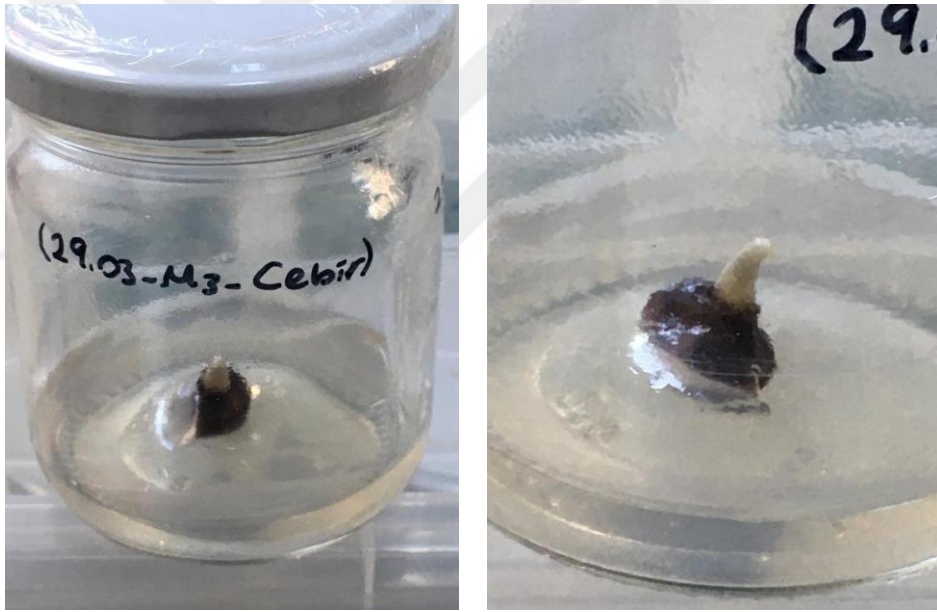
Resim 4.17. S10 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 22. günkü görünümü.



Resim 4.18. S10 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan yumruların 29. günkü görünümü.



Resim 4.19. S10 uygulamasında kallus geliştiren eksplantın 29 gün sonraki görünümü.



Resim 4.20. S10 uygulamasında kallus gelişimi olan eksplantın aktarımı.

Farklı bir eksplant tipinin kullanıldığı S11 uygulamasında mart ayında alınan iek, iek tomurcuğu ve iek sapı 30 dk bulaşık deterjanı ve Tween 20 içeren çözelti içinde bekletilmiştir. Daha sonra eşme suyu altında yıkanıp steril kabine alınmıştır. Steril saf su ile bir yıkama daha yapılıp 30sn %70 etil alkol ile steril edilmiştir. Karıştırıcıda 5 dk %2 NaOCl+ Tween 20 çözeltisinde bekletilen iek, iek tomurcuğu ve iek sapı eksplantları 3 defa steril saf su ile yıkanarak 3 dk fungusitte (100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole) bekletilerek sterilize edilmiştir. Sterilizasyonu tamamlanan

eksplantlar içeriğinde BAP ve NAA dozlarının bulunduğu ve besin ortamlarına kültüre alınmışlardır. 2 mg/l ve 4 mg/l BAP ile 1 mg/l ve 2 mg/l NAA dozları ve bunların kombinasyonlarına ek olarak Kontrol besin ortamına kültüre alınan çiçek, çiçek tomurcuğu ve çiçek sapı eksplanlarının canlılık oranları, kallus oluşturan eksplant oranları ve enfeksiyon oranları Çizelge 4.11' de verilmiştir.



Çizelge 4.11. S11 uygulaması yapılp kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	KES (adet)	KOES (adet)	KOEO (%)	CO (%)	EO (%)
S11	Çiçek, Çiçek tomurcuğu ve Çiçek Sapı	U1	10	18	6	4	0	0	0	60	40
				26	6	4	0	1	10	60	40
				35	0	10	0	1	10	0	100
		U2	16	18	16	0	8	0	0	100	0
				26	16	0	12	0	0	100	0
				35	0	0	16	0	0	0	0
		U2	12	18	0	12	0	0	0	0	100
				26	0	12	0	0	0	0	100
				35	0	12	0	0	0	0	100
		U3	11	18	11	0	6	0	0	100	0
				26	4	0	7	0	0	36,36	0
				35	0	0	11	0	0	0	0
		U4	12	18	11	1	2	0	0	91,67	8,33
				26	8	4	2	0	0	66,67	33,33
				35	0	12	0	0	0	0	100
		U14	6	18	3	3	0	0	0	50	50
				26	2	4	0	0	0	33,33	66,67
				35	0	6	0	0	0	0	100
		U14	13	18	13	0	2	0	0	100	0
				26	13	0	5	3	23,08	100	0
				35	13	0	8	3	23,08	100	0
U15	13	18	8	5	0	0	0	61,54	38,46		
		26	4	9	0	0	0	30,77	69,23		
		35	0	13	0	0	0	0	100		
U15	15	18	15	0	2	0	0	100	0		
		26	10	0	5	0	0	66,67	0		
		35	7	0	8	0	0	46,67	0		

KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, KES: kararmış eksplant sayısı, KOES: kallus oluşturan eksplant sayısı, KOEO: kallus oluşturan eksplant oranı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı

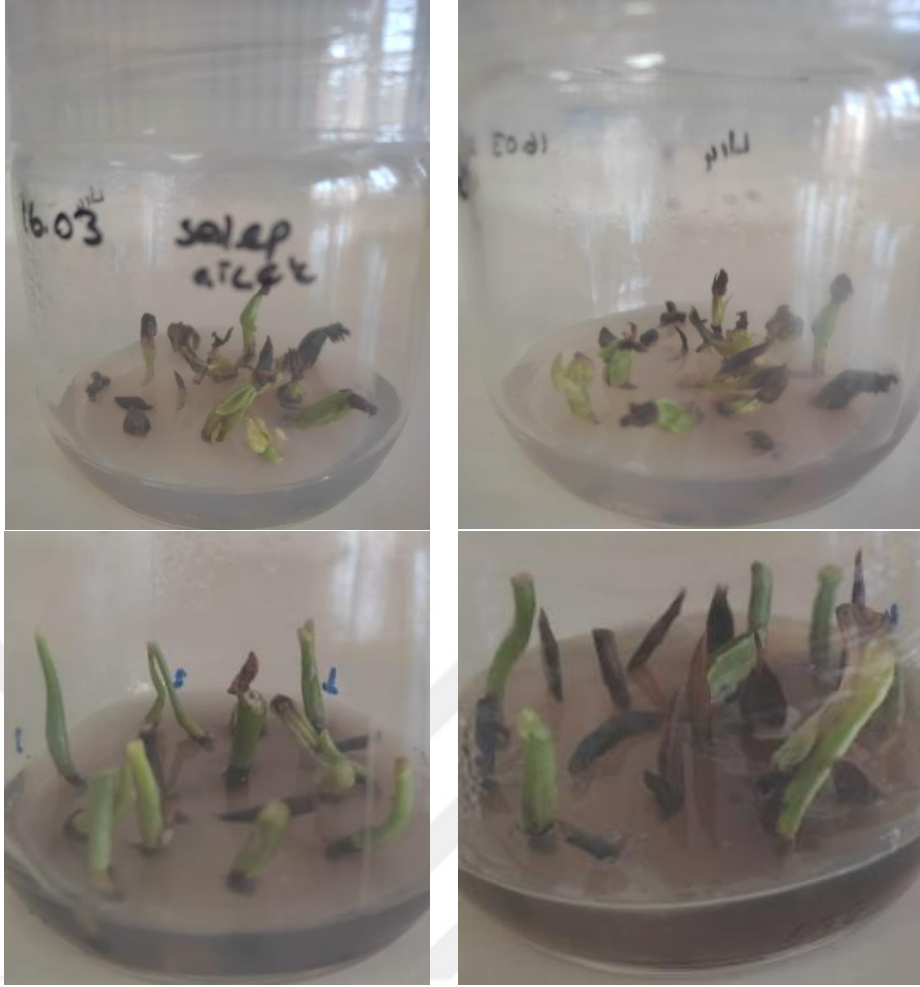
Çizelge 4.11 incelendiğinde; S11 sterilizasyon uygulaması yapıp U1 (2 mg/l BAP) besin ortamında kültüre alınan çiçek ve çiçek saplarının canlılık oranları 26 güne kadar %60 olmasına rağmen 35 günün sonunda canlılıklarını kaybederek enfeksiyon oranı %100 olmuştur. Bununla birlikte, bu uygulamada ilk 18 gün kallus oluşumu gözlenmezken 26. günde kallus oluşumu gözlemlenmiş ve kallus oranı %10 olarak belirlenmiştir. Yine S11 uygulanan ve U2 besin ortamına kültüre alınan eksplantlarda canlılık oranı 26 günde canlılığını koruyarak canlılık oranı %100 olmasına rağmen 35 günlük kültür sonunda tüm eksplantların kararmasıyla canlılıklarını yitirmiştir. Bununla birlikte enfeksiyon oranı 35 günlük kültür süresinde %0 olarak devam etmiştir. Diğer U2 kavanozunda ise 18. gün alınan verilere göre enfeksiyon oranı %100 olmuştur. U3 (1 mg/l NAA) besin ortamında yapılan kültürde 35 günlük sürede kontaminasyona rastlanmamış ve enfeksiyon oranı %0 olmuştur. Fakat eksplantların kararmasından dolayı canlılıklarını yitirmişler ve bununla birlikte canlılık oranı 26. günde %45,45, 26. günde %36,36 ve 35. günde ise %0 olarak saptanmıştır. U4 besin ortamında kültüre alınan canlılık oranı 18. günde %91,67 iken 26. günde %66,67'ye düşmüş ve 35 günlük kültür sonunda enfeksiyona bağlı olarak canlı hiçbir eksplant kalmamıştır. U2 besin ortamına benzer şekilde U14 besin ortamından da 2 kavanoz kültüre alınmıştır. Kavanozlardan birinde canlılık oranı 18. Günde %50,0 iken 26. günde %33,33 olmuştur. 35. günde enfeksiyon oranı %100 olarak karşımıza çıkmaktadır. 2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA kombinasyonunun (U14) diğer kavanozunda ise kültür boyunca enfeksiyon oranı %0 olmasına rağmen eksplantlarda kararma görülmesiyle birlikte canlılık oranı giderek düşmüştür. Canlılık oranı 18. günde %84,62, 26. günde %61,54 ve 35. günde %38,46 olarak saptanmıştır. Bununla birlikte kültürde kallus gelişimi gözlemlenmiş ve kallus oranı 26 günde %23,08 olarak belirlenmiş ve 35. güne kadar bu oran sabit kalmıştır. Kavanozda kültüre alınan eksplantların kararma sonucunda canlılıklarını yitirmesi durumundan dolayı kallus geliştiren eksplantlar U15 besin ortamına aktarılmışlardır fakat kararak canlılıklarını yitirmişlerdir. İki ayrı kavanoz U15 besin ortamında kültürlerden birinde canlılık oranı 18. günde %61,54 iken bu oran 26. günde %30,77 olmuş ve 35. günde enfeksiyon oranı %100 olmuştur. Diğer kültürde ise 35 gün kültür süresinde kontaminasyon görülmemesine rağmen eksplantların kararmasından dolayı canlılık oranları giderek azalmıştır. Canlılık oranı 18. günde %86,67 iken 26. günde %66,67 ve 35. günde bu oran iyice düşerek %46,67 olmuştur. S11 sterilizasyon uygulamasında U2, U3, U4 ve U15 besin ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda herhangi bir kallus oluşumu veya sürgün gelişimi gerçekleşmemiştir. kallus oluşumu gerçekleşmemiştir. Resim 4.21, Resim 4.22 ve Resim 4.23' de S11 uygulamasının kültür görüntüleri verilmiştir.



Resim 4.21. S11 uygulaması yapıp kültüre alınan eksplantların 18 gün sonraki görünümü.



Resim 4.22. S11 uygulamasında yapıp kültüre alınan eksplantların 26. gününde kallus oluşturan eksplantların görünümü.



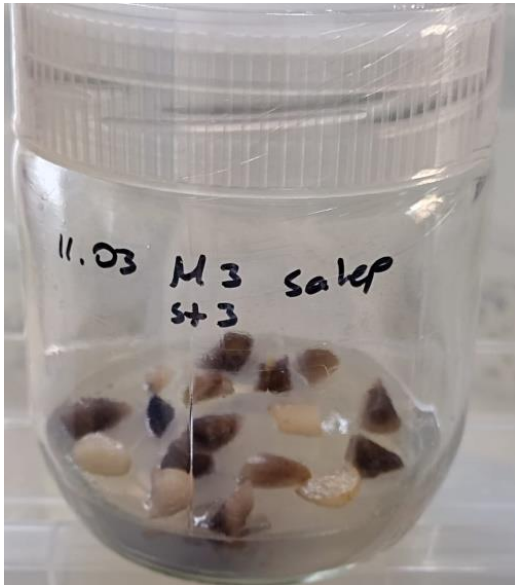
Resim 4.23. S11 uygulaması yapıp kültüre alınan eksplantların 35 gün sonraki görünümü.

S12 uygulamasında sterilizasyon işlemleri, kültür boyunca %100 canlılık görülen S6 uygulamasına benzer aşamalar gerçekleştirilerek yapılmış fakat NaOCl+Tween 20 solüsyonunda bekletme süreleri (30 dk) ve kullanılan fungusitin dozunda (50 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole) farklılık yapılarak modifiye edilmiştir. Yapılan S12 uygulamasında U15 besin ortamı (4 mg/l BAP+ 2 mg/l NAA) kültür ortamı olarak kullanılmıştır. Eksplant olarak mart ayında alınan yumru, gövde ve yaprak kültüre alınmıştır.

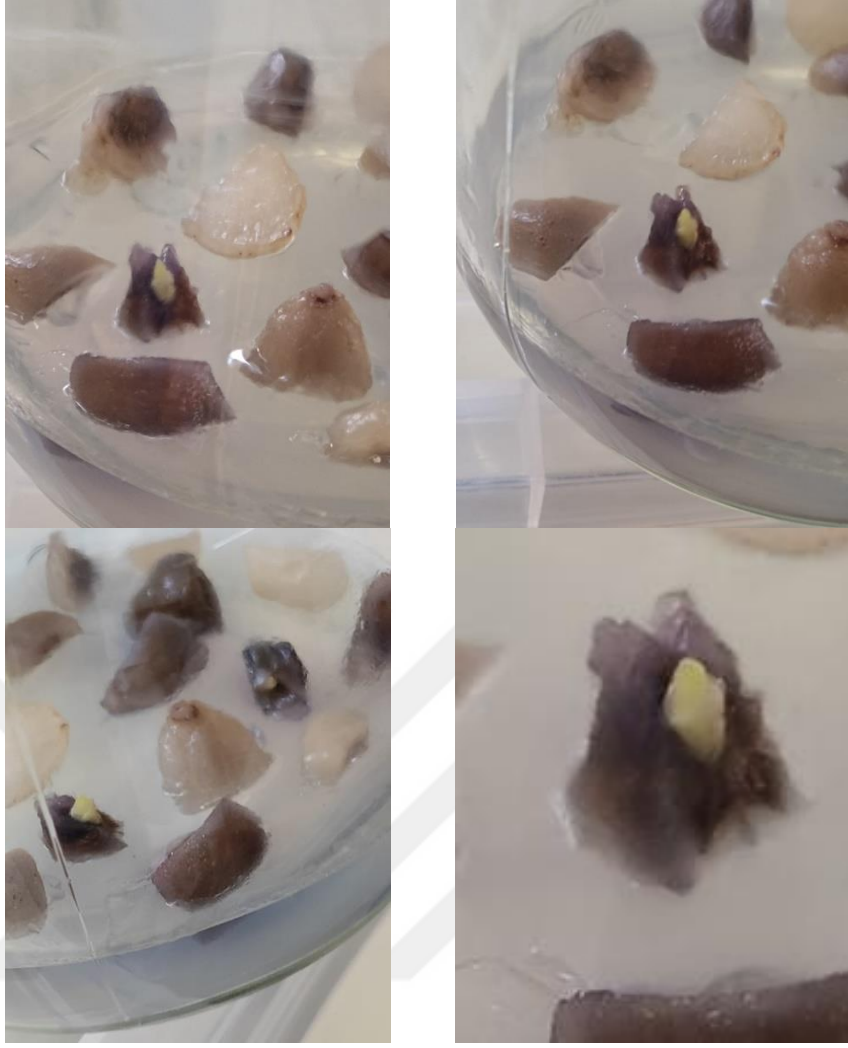
Çizelge 4.12. S12 uygulaması yapılp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.

	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	KES (adet)	KOES (adet)	KOEO (%)	CO (%)	EO (%)
S12	Yumru	U15	16	18	16	0	0	2	22	100	0
				47	5	0	9	2	22	43,75	0
	Gövde Yaprak	U15	22	18	16	6	0	1	4,55	72,73	27,27
				47	1	21	0	1	4,55	4,55	95,45
KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, KES: kararmış eksplant sayısı, KOES: kallus oluşturan eksplant sayısı, KOEO: kallus oluşturan eksplant oranı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı											

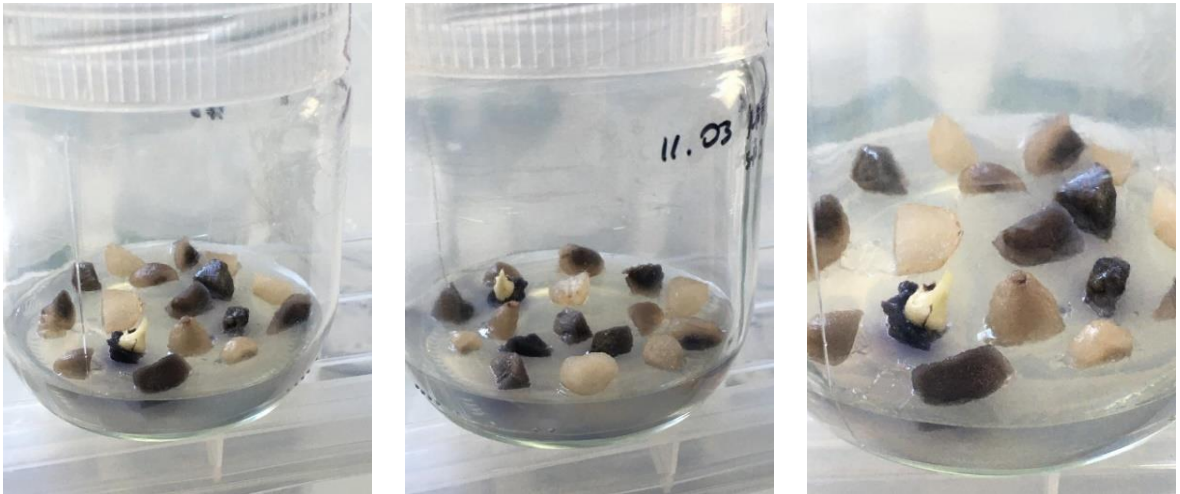
Yumruların kültüründe 47 gün boyunca kontaminasyon olmamasına rağmen kararmalar nedeniyle 18. günde %100 olan canlılık oranı 47. günde %43,75'e düşmüştür. Bununla birlikte, yumruların eksplant olarak kullanıldığı kültürde 16 eksplanttan 2 eksplantta kallus gelişimi gözlemlenmiştir. Çalışmanın devamında diğer eksplantlarda kallus gelişimi olmadığı için 47 günlük kültür süresince kallus oluşturan eksplant oranı %22,0 olarak sabit kalmıştır. Diğer kültürde U15 besin ortamına alınan gövde ve yaprak eksplantları 18. günde %72,73 canlılık oranına sahip olmasına rağmen kontaminasyon nedeniyle 47. günün sonunda enfeksiyon oranı %95,45 olmuştur. Bununla birlikte 18. günde 1 adet gövde eksplantında kallus gelişimi saptanmış ve kallus oluşturan eksplant oranı %4,55 olarak 47. güne kadar sabit kalarak devam etmiştir. Oluşan kontaminasyon dolayısıyla kallus gelişimi olan gövde eksplantı ilerleyen süreçte canlılığını kaybetmiştir (Çizelge 4.12). 47 gün sonra kallus oluşumu görülmüştür (Resim 4.24, Resim 4.25). Kallus oluşturan eksplant 75 gün sonra kallus da büyüme görülmüştür (Resim 4.26, Resim 4.27). S12 uygulamasının 90. gününde kallustan sürgün oluşumu başlamıştır (Resim 4.28). S12 uygulamasında gelişen kallustan oluşan sürgünde uzama başlamış ve canlılığını 102 güne kadar korumuştur (Resim 4.29). bu oluşan kallusun kültürü boyunca canlılığını kaybetmemesine ve sürgün oluşturmaya devam etmesine rağmen oluşan kararmalar ve kontaminasyondan dolayı başka bir besin ortamına aktarımı yapılmış (Resim 4.30) ve zamanla karararak canlılığını yitirmiştir.



Resim 4.24. S12 uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 47. günkü görünümü.



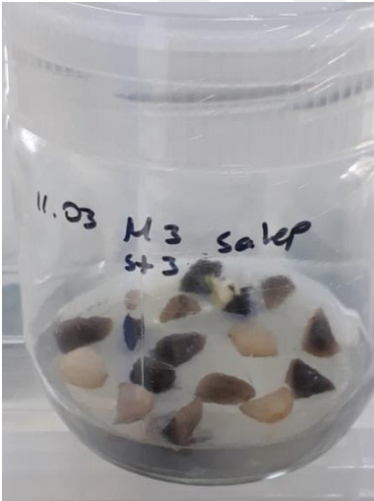
Resim 4.25. S12 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kallus oluşturan eksplantın 47 gün sonraki görünümü.



Resim 4.26. S12 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kallus oluşturan eksplantın 75 gün sonraki görünümü.



Resim 4.27. S12 uygulamasında kallus oluşturan eksplantın 75 gün sonraki görüntüsü.



Resim 4.28. S12 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kallus oluşturan eksplantın 90 gün sonraki görünümü.



Resim 4.29. S12 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kallus oluşturan eksplantın 102 gün sonraki görünümü.



Resim 4.30. S12 uygulamasında gelişimi gözlenen eksplantın aktarımından bir görüntü.

Modifiye edilen sterilizasyon yöntemlerinin sonucusu olan S13 uygulamasında ise mart ayında alınan ve 60 dk çeşme suyu altında yıkanan yumru, gövde ve yaprak eksplantları 30 dk %1,5 NaOCl+ Tween 20 bekletildikten sonra steril saf su ile yıkama yapılarak 2 dk 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole ile muamele edilmiştir. Fungusite muamele edilen eksplantlar 2 mg/l NAA ve 4 mg/l BAP kombinasyonu olan U15 besin ortamında kültüre alınmışlardır. Çizelge 4.13'ye bakıldığında; yumru kültürünün 29 günlük kültür süresinde canlılığı %100 olduğu görülmektedir. Ayrıca bu kültürde 14. günden itibaren kallus oluşumu gözlemlenmiştir (Resim 4.31, 4.32). Kallus oluşturan

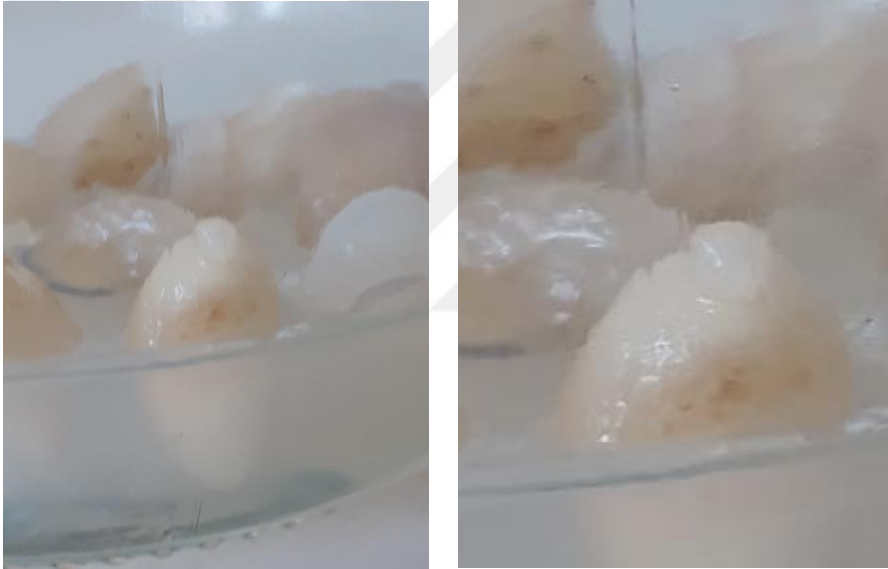
eksplant oranı %7,14 olan yumru kültüründe kallus oluşturan eksplantlarda bir süre sonra kararma meydana gelmiştir (Resim 4.33, Resim 4.34). Kültürün 57. gününde kallus oluşturan eksplanttan sürgün oluşumu başladığı görülmüş (Resim 4.35) ve 73. güne kadar oluşan sürgünde uzama olduğu gözlemlenmiştir (Resim 4.36). 84 gün sonra eksplanttan oluşan sürgünde uzama devam etmiş fakat fenolik bileşiklerin etkisine bağlı olarak kararmalar oluşmaya başlamıştır (Resim 4.37). Bu nedenle aktarım yapılmış (Resim 4.38) ancak eksplant kararma sebebiyle canlılığını yitirmiştir. Gövde ve kök kültüründe ise kontaminasyon sebebiyle 14. günde kültüre alınan eksplantları %87,50'sinde enfeksiyon oranı meydana gelmiştir. Enfeksiyon oranı giderek yükselmiş 18. günde %91,67 olmuş ve 22. günde tamamen kontamine olarak %100 olmuştur. Kültürde 14. günde kallus oluşturan eksplant oranı %12,50 iken 18. günde %8,33 olmuş ve kallus oluşturan eksplantların 22. günde enfeksiyondan dolayı canlılıklarını yitirdikleri saptanmıştır.

Çizelge 4.13. S13 uygulaması yapılp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantlardaki canlılık, enfeksiyon ve kallus oranları.

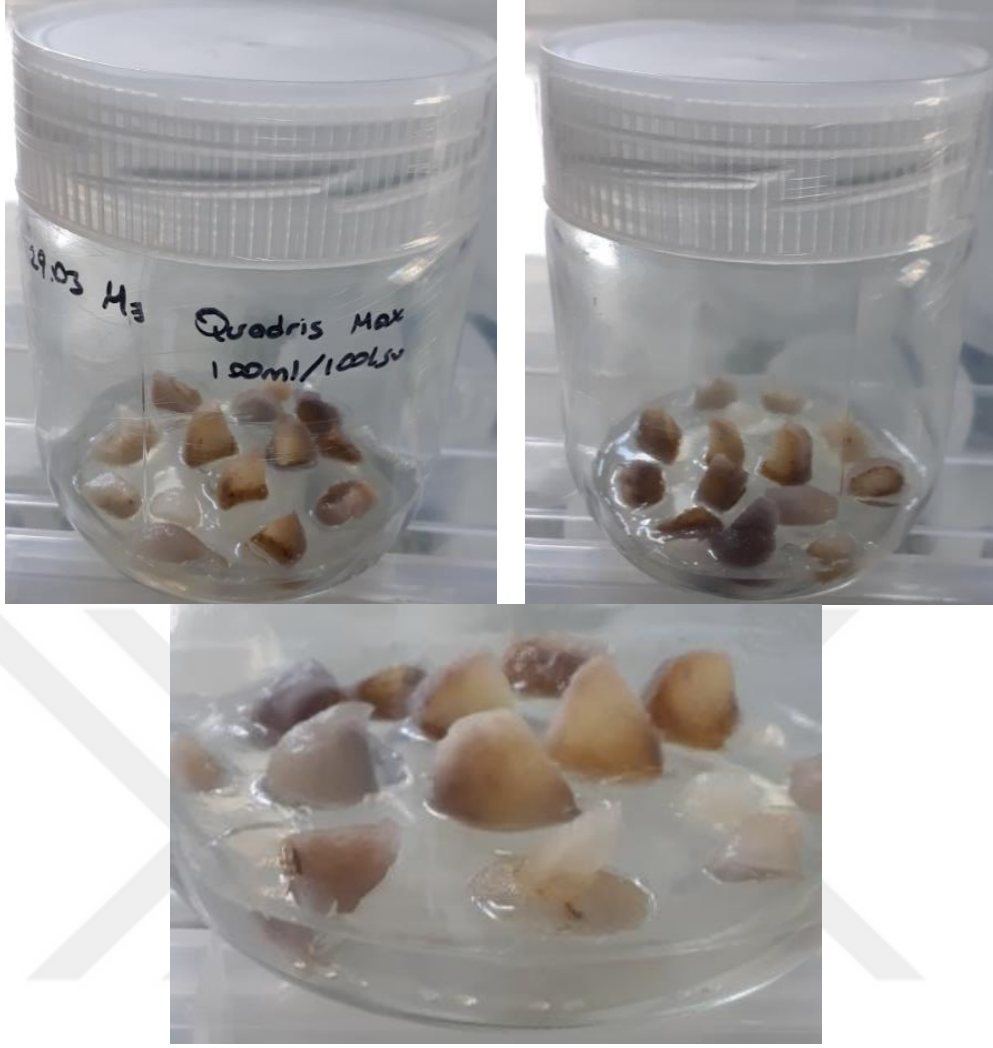
	Eksplant Tipi	Besin Ortamı	KAES (adet)	Gün	CES (adet)	EES (adet)	KOES (adet)	KOEO (%)	CO (%)	EO (%)
S13	Yumru	U15	14	14	14	0	1	7,14	100,0	0,0
				18	14	0	1	7,14	100,0	0,0
				22	14	0	1	7,14	100,0	0,0
				29	14	0	1	7,14	100,0	0,0
	Gövde Kök	U15	24	14	3	21	3	12,5	12,50	87,50
				18	2	22	2	8,33	8,33	91,67
				22	0	24	0	0	0	100,0
KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, KOES: kallus oluşturan eksplant sayısı, KOEO: kallus oluşturan eksplant oranı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı										



Resim 4.31. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 14. günkü görünümü.



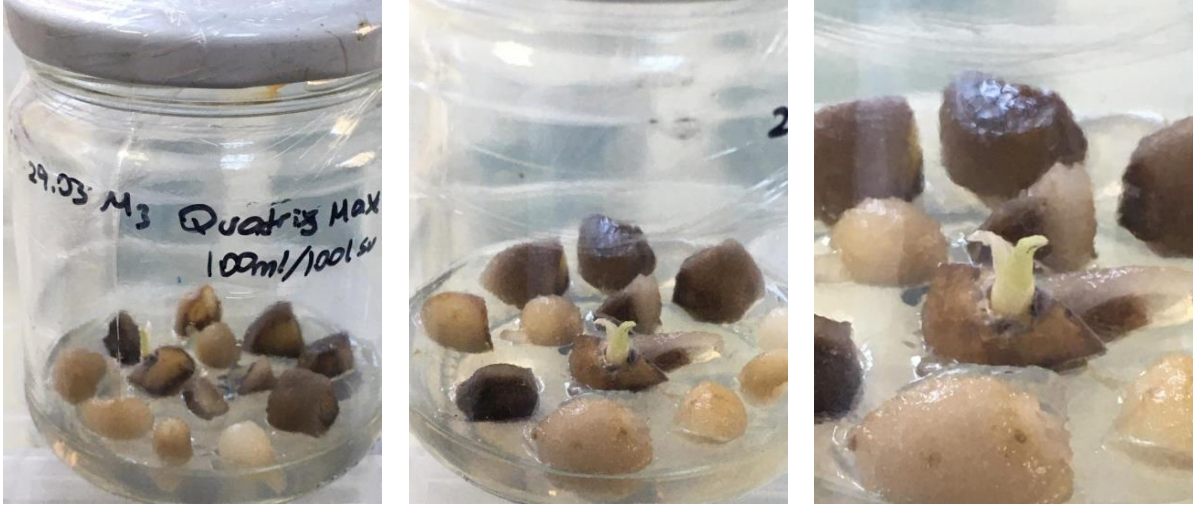
Resim 4.32. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kallus oluşturan eksplantın 14. günkü görünümü.



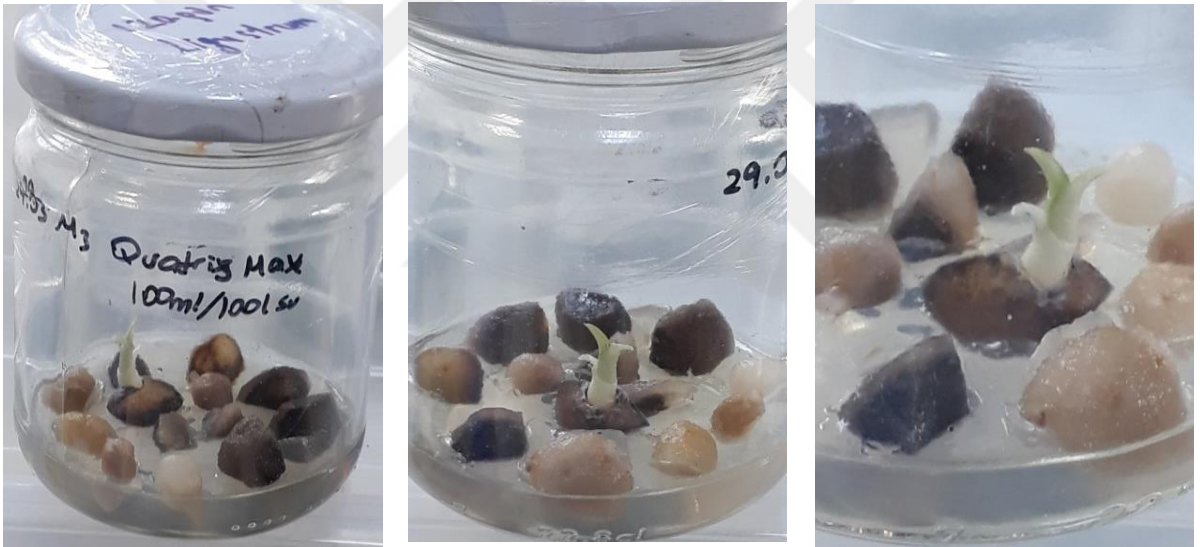
Resim 4.33. S13 uygulamasında uygulaması yapılp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 22. günkü görünümü.



Resim 4.34. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 29. günkü görünümü.



Resim 4.35. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 57. günü görünümü.



Resim 4.36. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 73. günü görünümü.



Resim 4.37. S13 uygulamasında uygulaması yapıp U15 besin ortamında kültüre alınan eksplantların 84. günkü görünümü.



Resim 4.38. S13 uygulamasında gelişen eksplantın aktarımından bir görüntü.

4.3. ST Sterilizasyon Denemesi Uygulamaları

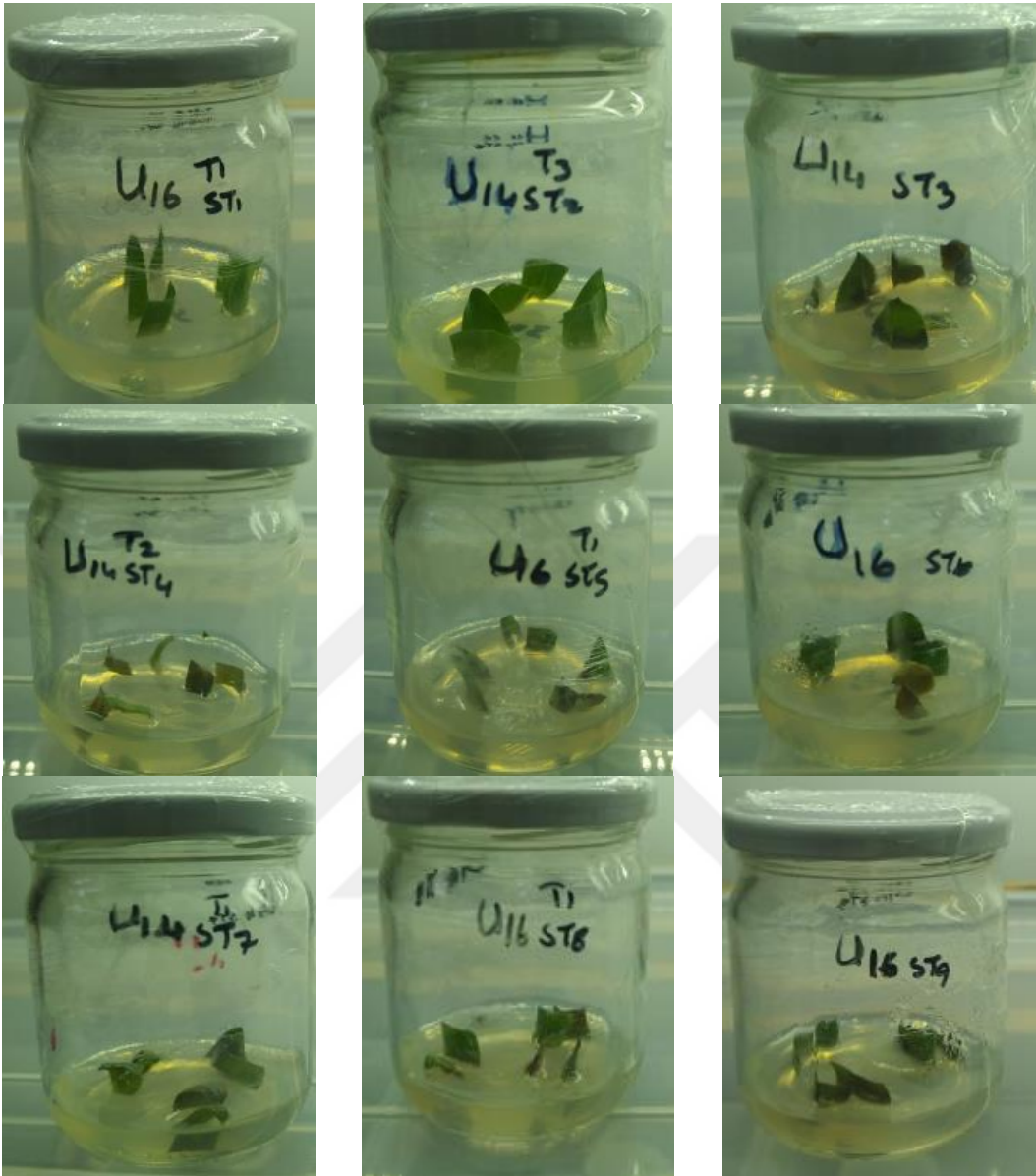
ST sterilizasyon uygulaması denemesinde aralık ayında salep orkidelerinden alınan yaprak eksplantı kullanılmış olup uygulanan sterilizasyon yöntemleri 3 tekerrürlü şekilde planlanarak yapılmış ve verileri 6. günde alınarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.14).

Sterilizasyon uygulaması yapıp kültüre alınan yaprak eksplantlarının canlılık oranı ve enfeksiyon oranı üzerinde yapılan istatistiksel değerlendirmede 6. günde sterilizasyon uygulamaları, canlılık oranı ve enfeksiyon oranı interaksiyonu faktörlerine bağlı olarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15’de verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında 6. günde sterilizasyon uygulamaları açısından istatistiksel anlamda bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Çizelge 4.15 incelendiğinde; ST1 (5 dk NaOCl) uygulamasında canlılık oranı %94,443 olarak en yüksek canlılık oranı ile karşımıza çıkmaktadır. ST2 (10 dk NaOCl) uygulamasına baktığımızda ise enfeksiyon oranı %58,335 iken canlılık oranı %91,665 olmuştur. ST3 uygulamasında kültüre alınan eksplantlar incelendiğinde canlı eksplant sonucu 3,33 adet, enfeksiyonlu eksplant sayısının ise 2,66 adet olarak yakın değerler olduğu görülmüştür. ST4’de ise canlılık oranı enfeksiyon oranından yüksek olarak %66,667 oranında olduğu saptanmıştır. ST5 uygulamasında ST4 uygulamasından farklı şekilde enfeksiyon oranı (%55,557) canlılık oranından yüksek olarak karşımıza çıkmıştır. Çalışmada modifiye edilerek oluşturulan bir diğer sterilizasyon uygulaması olan ST6’da ise yüksek (%77,77) canlılık oranı belirlenmiş

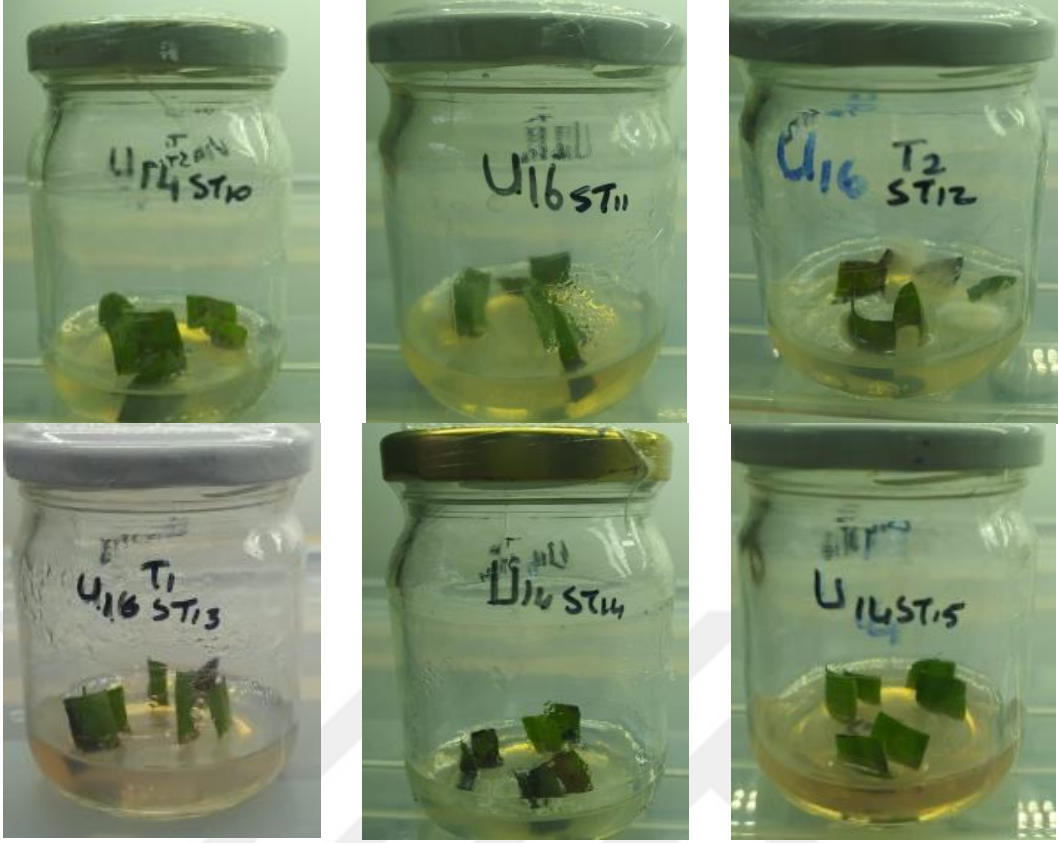
ve bu değer ile ST1 ve ST2 uygulamasından sonra üçüncü sırada yer alan uygulama olmuştur. ST7 uygulamasında canlılık oranı %55,557 ve enfeksiyon oranı %44,443 olmuştur. ST8 uygulamasının değerlerine bakıldığında ise canlılık oranı %50,000 olarak enfeksiyon oranından düşük olduğu görülmektedir. Ancak bu uygulamada KES sonucunun yüksek olduğu canlılık kayıplarında bu durumdan kaynaklı olabileceği kanaatine varılmıştır. Çalışmada kullanılan modifiye edilmiş sterilizasyon uygulamaları karşılaştırıldığında canlılık oranının oldukça düşük olduğu ST9 uygulamasında oranının %33,335 olduğu belirlenmiştir. ST10'da canlılık oranı ST6'dan sonraki yüksek canlılık oranı olmuş ve %72,223 olarak tespit edilmiştir. ST11 uygulamasında canlılık oranı enfeksiyon oranından düşük olmasına rağmen birbirine yakın değerler olduğu görülmektedir. ST12 uygulamasında enfeksiyon oranı % 72,223 olmuş ve bu değer ile enfeksiyon oluşma durumuna göre uygulamalar arasında 3. sırada yer almıştır. ST13 yöntemi sonucunda canlılık oranı %75,000 iken enfeksiyon oranı % 50,000 olarak saptanmıştır. ST14 yönteminde ise denemedeki en düşük canlılık oranı karşımıza çıkmakta ve bu değer %25,000 olarak belirlenmiştir. Denemedeki son sterilizasyon yöntem olan ST15 kontrol uygulamasında ise canlılık oranı 6. günde oldukça yüksek olmuş ve %77,000 değere sahip olmuştur. Resim 4.39' da ST denemesinde kültüre alınan farklı besin ortamlarındaki yaprak eksplantlarının görünümü verilmiştir.

Çizelge 4.14 ST uygulaması yapıp kültüre alınan yaprak eksplantlarının canlılık ve enfeksiyon oranları.

	Eksplant Tipi	KAES (adet)	CES (adet)	EES (adet)	KES (adet)	CO (%)	EO (%)
			6. gün				
ST1	Yaprak	6	5,66	0,33	0	94,443	16,670
ST2		6	3,66	2,33	0	91,665	58,335
ST3		6	3,33	2,66	1,66	55,553	66,670
ST4		6	4,0	2,0	1,0	66,667	50,000
ST5		6	2,66	3,33	1,33	44,443	55,557
ST6		6	4,66	1,33	2,0	77,777	22,223
ST7		6	3,33	2,66	1,66	55,557	44,443
ST8		6	2,0	4,0	4,33	50,000	66,667
ST9		6	1,33	4,66	1,33	33,335	77,777
ST10		6	4,33	1,66	0,66	72,223	27,777
ST11		6	2,66	3,33	2,66	66,670	55,553
ST12		6	1,66	4,33	1,66	41,665	72,223
ST13		6	3,0	3,0	4,0	75,000	50,000
ST14		6	1,0	5,0	2,66	25,000	83,333
ST15		6	4,66	1,33	0	77,000	22,223
LSD (%5) değeri						39,257 öd	85,713öd
KAES: kültüre alınan eksplant sayısı, CES: canlı eksplant sayısı, EES: enfeksiyonlu eksplant sayısı, KES: kararmış eksplant sayısı, CO: canlılık oranı, EO: enfeksiyon oranı							



Resim 4.39. Farklı ST uygulamalarına bağlı olarak yaprak eksplantlarının görünümü



Resim 4.39. Farklı ST uygulamalarına bağı olarak yaprak eksplantlarının görünümü.
(devamı).

5. TARTIŞMA

Orchidaceae familyası, dünyada geniş yayılıma sahip bir familya olup salep orkideleri bu familyaya mensup doğal orkide türleridir. Salep orkideleri yumrulu bitkilerdir ve bu yumrulardan salep elde edilmektedir. Salep elde etmek için kullanılan türler arasında özellikle *Orchis* sp. ve *Ophrys* sp. cinsleri de yer almaktadır. Ülkemiz salep orkideleri bakımından zengin bir ülke olduğundan dolayı salep orkidelerinin çeşitli amaçlarla fazlaca sökülmesi yapılarak nesilleri tehlike altına girmiştir. Doğadan toplanan her yumru ile bir sonraki yıl meydana gelecek bitki ve bu bitkinin üreteceği sınırlı sayıdaki yeni yumru oluşumu ve oluşabilecek çok sayıdaki tohumun ve bu tohumların çimlenmeleri ile yeni bitkilerin meydana gelmesi engellenmektedir. Salep tozu üretimi için en az 1 kg kuru yumruya ihtiyaç duyulmaktadır ki bu amaçla doğadan sökülmesi gereken yumru sayısının 1000-4350 adet arasında değiştiği belirlenmiştir (Özhatay, 2000). Salep orkidelerin çok küçük olan ve endospermi olmayan tohumlarının çimlenmesi için gerekli en uygun nem, sıcaklık, ışık, oksijen ve toprak şartları olsa dahi, mikorizal mantarlarla enfekte olmadan, çimlenme gerçekleşmemektedir ve bununla birlikte bu süre türden türe değişkenlik gösterip ortalama 2- 16 yıl arasında değişmektedir (Sezik, 1984; Arditti, 1967). Ayrıca salep orkidesi tohumlarının çimlenmesinden sonra protokormun oluşabilmesi ve büyümeye başlayabilmesi için de mikorizalarla uyumlu olması gerekmektedir (Leake, 1994; Peterson vd. 1996). Salep elde edilen türlerin nesillerinin tükenmesinin önlenmesi açısından *In vivo* ve *In vitro* koşullarda farklı üretim uygulamaları yapılmıştır. Bununla birlikte nesli tükenmekte olan ve üretimi doğal yollarla zaman alan salep orkidelerinin *In vitro* ortamda yetiştirilmesinin önemi giderek artmaktadır.

Bu çalışmada doğal ortamlarında yetişmeleri oldukça uzun zaman alan ve yapılan tahribat sonucunda nesilleri tehlike altında olan salep orkidelerinden *Orchis* sp. ve *Ophrys* sp. cinslerine ait türlerin *In vitro* kültürde farklı bitki büyüme düzenleyiciler (BAP, NAA, EpiBL, SA), nano bileşiklerden TiO₂ ve bunların kombinasyonlarının MS ortamına eklenmesiyle salep orkidelerinin mikroçoğaltımı ve bu eklenen bitki büyüme düzenleyicilerin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *In vitro* kültürde kullanılan temel sistem organesis yolu ile bitki rejenerasyonudur yani doğrudan bir bitki eksplantının kesilmiş yüzeylerindeki belirli somatik hücrelerin bir kısmının, bitki büyüme

düzenleyicilerinin özellikle de oksin ve sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicilerin etkisi sonucu bölünerek ve doku oluşturmasıdır. Oluşan dokuların organları ve daha sonra da bitkiyi oluşturması ile doğrudan organogenez veya bir somatik hücrenin sürekli bölünerek embriyo ve daha sonra da tam bir bitkiyi oluşturması ile doğrudan somatik embriyogenesis şeklinde olabilir. Dolaylı rejenerasyon ile her iki durumda da belirli bir kallus oluşumu aşamasından sonra da meydana gelebilmektedir (Babaoğlu vd., 2001). Bu bağlamda çalışmada eksplant tipi olarak salep orkidelerinin bitki kısımları (yumru, kök, gövde, çiçek, çiçek sapı) kullanılmıştır. Bununla birlikte canlılık ve gelişme oranı, kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı, eksplant başına düşen sürgün sayısı, yumru oluşturan eksplant oranı, eksplant başına düşen yumru sayısı, yumru çapı, kök oluşum oranı, sürgün uzunluğu parametreleri incelenip verilerinin alınması planlanmasına rağmen kültürlerde yaşanan kontaminasyondan dolayı canlılık oranı, enfeksiyon oranı, kallus oluşturan eksplant oranı parametrelerine ilişkin veriler alınmış, kültüre alınan eksplantlar üzerinde gelişmenin farklı evrelerinde gözlemler yapılmıştır.

Eksplantların yüzey sterilizasyonu için yumrulara 30 dk boyunca çeşme suyunun altında yıkanma, yıkanan yumruları %70'lik etil alkol çözeltisinde 3-4 dk süresince çalkalayıcıda (200 rpm) bekletme, birkaç defa steril saf su ile yıkama, %25'lik sodyum hipoklorit + Tween 20 içeren çözeltide 10 dk 200 rpm'de çalkalayıcıda bekletme, steril saf su ile yumrular tekrar yıkandıktan sonra steril kabin içerisinde %96'lık etil alkol kullanılarak yumruların yüzeyini 2 dk süreyle yakma olarak; sürgün ucu ve çiçek saplarında ise 10-15 dk çeşme suyu altında yıkama, %70'lik alkolde 3 dk çalkalayıcıda bekletme, %25'lik sodyum hipoklorit + Tween 20 içeren çözeltide 5 dk 200 rpm'de çalkalayıcıda bekletmeden sonra 3 kere saf su ile yıkanma olarak aşamalar planlanıp gerçekleştirilmesine rağmen canlılık oranı kültürlerde %0 olduğu gözlenmiştir. Sürekli tekrarlayan kontaminasyon sıkıntılarında dolayı yüzey sterilizasyon yöntemine karşı alternatif protokoller denenmiştir.

Oluşturulan modifiye sterilizasyon aşamalarında farklı NaOCl konsantrasyonları ve eksplantların bekletilme süreleri üzerinde değişiklik yaparak yüzey sterilizasyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir. NaOCl konsantrasyonları %1'lik , %1,5'lük , %2'lik gibi değişiklik göstermiştir. Sodyum hipoklorite Tween20 eklemesi yapılarak hazırlanan solüsyonlarda değişen konsantrasyonlar ve eksplant tiplerine bağlı olarak 5, 10, 15, 20, 25, 30 dk olacak şekilde bekletme süreleri revize edilerek sterilizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Nitekim Aytas (1994), *O. sphegodes* ve *Ophrys apifera* türlerinde yaptığı çalışmada sodyum hipokloriti

farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde uygulamış tohumun çimlenme oranı üzerindeki etkisini gözlemlemiştir. Çalışmanın sonucunda tohumların %1,5 sodyum hipoklorit içinde 15 dakika bekletilmesinin sterilizasyon için yeterli olacağını belirtmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise farklı sodyum hipoklorit konsantrasyonlarının *Dactylorhiza iberica* tohumlarının çimlenmesine etkilerini araştırılmış ve en yüksek çimlenme oranı (%17,7) tohumların %20 sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dk süre ile bekletilmesi uygulanmasıyla elde edilmiştir. Aynı çalışmada *Dactylorhiza urvilliana* tohumlarında ise %70,4 oranı ile en yüksek çimlenme %20'lik sodyum hipoklorit konsantrasyonunun 10 dakika uygulanmasında meydana geldiği belirtilmiştir (Özdener, 1994). Bununla birlikte Yararbaş (2008) *Orchis italica* ve *Ophrys tenthredinifera* 4 dakika ultrason uygulaması yapmış ve çalışmada kullanılan tohumların %1'lik sodyum hipokloritte 10 dakika sterilize edildiğini bildirmiştir. *Orchis italica*'da sodyum hipoklorit + ultrason uygulamasında 15 günde %81, kontrol uygulamasında 90 günde %89 çimlenme elde edildiğini bildirmiştir. Bu bağlamda *Serapias vomeracea* tohumlarının yüzey sterilizasyonunda %10, %20, %30'luk sodyum hipoklorit 5, 10, 15, 30, 45 ve 60 dakika uygulanmıştır. Bunun sonucunda en iyi çimlenmeler VWD-N ortamında en yüksek %50,3 ile 5 dakika %20 sodyum hipoklorit uygulamasından elde edilirken bunun devamında %25,4 ile 10 dakika %30 sodyum hipoklorit uygulamasında ve %21,7 ile 30 dakika %10 sodyum hipoklorit uygulamasından elde edildiği bildirilmiştir (Özkoç, 1991). Çalışmada yapılan yüzey sterilizasyonları prosedürlerinde kullanılan sodyum hipokloritin konsantrasyonları bahsedilen çalışmalardaki sodyum hipoklorit konsantrasyonlarına uyumlu şekilde gerçekleştirilmiştir. Özdener (1994), Yararbaş (2008), Özkoç (1991) gibi araştırmacıların yürüttükleri çalışmalarda görüldüğü üzere türlere bağlı olarak sodyum hipoklorit dozları ve uygulama süreleri çok değişkenlik göstermektedir.

Yürütülen bu araştırmada eksplant olarak yumru, çiçek, çiçek sapı, kök ve gövde kısımları kullanılarak kültüre alma işlemi gerçekleştirilmiştir. Salep orkideleri üzerine yapılan birçok çalışmada genellikle tohum çimlendirilmesi amaçlanmıştır. Orkide tohumlarının sert bir tohum kabuğuyla örtülü olmasıyla birlikte bu sert tohum kabuğunun zayıflatılması çimlenmenin gerçekleşebilmesi için önem taşıdığından dolayı sterilizasyonda kullanılan sodyum hipoklorit konsantrasyonları ve uygulanma süreleri daha kolay çimlenme için önemlidir (Bektaş, 2014). Bu yüzden yüzey sterilizasyonunda kullanılan sodyum hipokloritin konsantrasyonları daha yoğun şekilde kullanımı tercih edilmiştir. Çalışmamızda eksplant olarak salep orkidelerinin toprak altı organlarından olan yumru, çiçek, çiçek sapı,

kök ve gövdenin bir kısmı kullanılmasından dolayı ciddi kontaminasyon sıkıntıları yaşanmıştır. Bu bağlamda yumru, kök ve gövde kısımlarının yüzey sterilizasyonu için toprak partiküllerinden iyice temizlenmesi amacıyla sodyum hipoklorit konsantrasyonları yoğun olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Karasal orkideler olarak da adlandırılan salep orkideleri iki yumruya sahiptir. Bu yumrulardan biri bir önceki sene bitki oluşturan yumrudur ve daha küçük, kahverengi, pürüzlü yüzeye sahip ve büzüşmüş bir yapısı vardır. Diğer yumru ise, daha büyük, sert, şişkin ve parlak görünümlü olmasına rağmen yüzeyi pürüzlü ve gözenekli bir yapıya sahiptir ve bu yumru bir sonraki sene yeni bitki oluşumu için kullanılmaktadır (Kasperek ve Grimm, 1999; Sezik ve Baykal, 1991; Sezik ve Özer, 1983). Bu yüzden yumruların yüzeyinin gözenekli ve pürüzlü yapısından dolayı birçok hastalık etmenini yüzeylerinde barındırmaları nedeniyle yüzey sterilizasyonu aşamasında birçok probleme sebep olmaktadır. Bununla beraber salep orkidelerinin tohumlarının endospermi bulunmamakta, bu sebeple tohumları çimlenme aşamasında mikorizal funguslara ihtiyaç duymaktadır (Arditti, 1967; Sezik, 1984). Salep orkidelerinin doğal yaşamlarında mikorizalarla olan ilişkilerinden dolayı toprakaltı organlarından alınan eksplantların *In vitro* kültüründe yaşanan kontaminasyonlarının çoğunluğu fungus kaynaklı olmuş olması nedeniyle yüzey sterilizasyonu aşamalarına fungusit ile muamele de dahil edilmiştir. Çalışmamızda eksplantlara uygulanan sterilizasyon yöntemlerinde en iyi sonuçlar modifiye edilerek yeni oluşturulan sterilizasyon protokollerine fungusit eklenen denemelerde elde edilmiştir.

In vitro koşullarda salep orkidelerini kültüre almak için yürütülen bu çalışmada kültür ortamı olarak farklı bitki büyüme düzenleyiciler ve bunların farklı dozları ile kombinasyonları kullanılmıştır. Araştırmada MS besin ortamına 2 mg/l ve 4 mg/l BAP, 1 mg/l ve 2 mg/l NAA, 1 mM SA, 5 µM EpiBL, 30 mg/l TiO₂ eklenmiş ve 2 mg/l BAP'ın SA, EpiBL, TiO₂ ile kombinasyonları bununla birlikte 1 mg/l NAA'nın SA, EpiBL, TiO₂ ile kombinasyonları oluşturulmuştur. Aynı zamanda BAP ve NAA dozlarından kombinasyonlar oluşturulmuş 2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA ve 4 mg/l BAP+ 2 mg/l NAA kültür ortamı olarak kullanılmıştır. Bu besin ortamı kombinasyonlarına ek olarak bitki büyüme düzenleyici bulunmayan MS ortamı hazırlanarak Kontrol uygulaması oluşturulmuştur.

Yürütülen bu çalışmada farklı sterilizasyon yöntemleri deneyerek kurulan denemelerde kültür boyunca canlılığın devam ettiği kültürler olmasına rağmen birçoğunda kallus oluşumu veya herhangi bir sürgün, yumru veya doku gelişimi saptanmamıştır. Ancak, uygulamalar içerisinde yer alan farklı BAP ve NAA kombinasyonları içeren U14 ve U15

besin ortamlarında yumrulara kallus gelişimi görülmüş ve kültür boyunca bu gelişim devam etmiştir. U15 (2 mg/l NAA+ 4 mg/l BAP) besin ortamında kültüre alınan ve S8 uygulaması (30 dk %1,5 NaOCl+ Tween20) ile sterilizasyonu gerçekleştirilen yumru parçalarında kallus oluşturan eksplant oranı %4,55; S9 uygulamasında %8,33; S10 uygulamasında ise kallus oluşturan eksplant oranı %5,88 olarak gerçekleşmiştir. Bununla beraber yumru ve gövde eksplantları kullanılan S12 uygulamasında; yumru kallus oranı %22,0 ve gövde eksplantında kallus oluşturan eksplant oranı %4,55 olarak elde edilmiştir. S13 uygulamasında yumru eksplantlarında kallus oluşturan eksplant oranı %7,14, gövde ve kök kültüründe ise kallus oluşturan eksplant oranı %12,50 olmuştur. Nitekim benzer şekilde BAP ve NAA kombinasyonlarının kültür ortamında kullanıldığı çalışmalardan birinde *Cymbidium atropurpureum* da bitkinin nod kısımları materyal olarak kullanılmış ve en yüksek protokorm benzeri yapılar 5 mg/l NAA besin ortamında meydana gelirken MS ortamına eklenen BAP ile sürgün oluşumu elde edilmiştir. Besin ortamına 1 mg/l NAA+1 mg/l BAP ve 1,5 mg/l NAA+ 1 mg/l BAP ilave edilen uygulamada ise küçük yeşil protokorm benzeri yapılar meydana gelmiştir (Subramanium ve Taha, 2003). Benzer şekilde başka çalışmada *Dendrobium formosum* bitkisinin yumruları eksplant olarak kullanılmış ve 2,5 mg/l BAP ile 1 ve 2 mg/l NAA bulunan besin ortamlarında en iyi sürgün oluşumu elde edilmiştir (Nasiruddin vd., 2003). Yine, *Geodorum densiflorum* bitkisinin tohumlarının kullanıldığı araştırmada sürgün oluşumunda en iyi sonuç 2 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA kombinasyonu olan besin ortamından belirlenmiştir (Bhadra ve Hossain, 2003). Ekinoğlu (2017) tarafından salep orkidelerinden *Orchis laxiflora* bitkisinin mikroçoğaltımında sürgünler eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve aynı bitki büyüme düzenleyicilerin 0,5 mg/l BAP ve 0,5 mg/l NAA kombinasyonları ile en iyi sonuç meydana geldiği bildirilmiştir. *Vanda teres* orkidesinin tohumlarının kullanıldığı çalışmada VW besin ortamı kullanarak, bu besin ortamına 1 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, %2 sukroz, 2 g/l pepton ilave etmişler ve tohumlar kültür ortamına alındıktan 40-45 gün sonra çimlenme elde edildiğini bildirmişlerdir (Sinha ve Roy, 2004). MS ortamına 1 mg/l BAP ve 0,1 mg/l NAA eklenmesiyle oluşturulan besin ortamına eksplant olarak *Orchis latifolia*'nın filizlenen tomurcukları kullanılmış ve bunun sonucunda sürgün çoğalması elde edilmiştir (Sharma ve Chandel, 1996). Chen vd. (2007) tohum çimlendirme denemesi için *In vitro* koşullarda olgunlaşmamış *Phalaenopsis* tohumlarını kullanımı ve yapılan bu denemelerin sonucunda en iyi besin ortamı şeker (20 g/l) ve aktif kömür (1 g/l) içeren 1/3 MS ortamına 2 mg/l BA+ 0,2 mg/l NAA+ 50 g/l muz püresi ilave edilmesiyle oluşturulan besin ortam kombinasyonunda meydana geldiği belirtilmiştir.

Çalışmada U15 besin ortamında (2 mg/l NAA+ 4 mg/l BAP) S8 sterilizasyon uygulaması yapılarak kültüre alınan yumru parçalarında kültüre alındıktan 14 gün sonra kallus oluşumu gözlemlenirken; S9 sterilizasyon uygulamasında yumru eksplantlarında 18 gün sonra gözlemlenmiş, S10 uygulamasında ise yumru eksplantlarının 29 günlük kültüründe kallus oluşumu gözlemlenmiştir.

Sterilizasyon işlemi olarak modifiye edilmiş S12 uygulaması kullanılan U15 besin ortamında (2 mg/l NAA+ 4 mg/l BAP) yumru parçalarında olan eksplant da 47 günlük kültür süresinde kallus oluşturmuş bununla beraber 18. günde gövde eksplantında gelişme saptanmış ve 47 güne kadar bu devam etmiştir. İlerleyen süreçte gövde eksplantı enfeksiyon nedeniyle canlılığını yitirmiştir. 102 gün sonra yumru eksplantından sürgün oluşumu başlamış ve bir süre sonra başka besin ortamına aktarılmıştır. Fakat fenolik bileşiklerin etkisi ile gerek besin ortamında gerek eksplantta oluşan kararma nedeniyle kaybedilmiştir. Nitekim *Orchis laxiflora*'nın sürgünlerinin eksplant olarak kullanıldığı bir çalışmada sürgünden yumru oluşumunun 30. günden itibaren başladığı bildirilmiştir (Ekinoğlu, 2017).

Vanilla planifolia orkide türünün yaprak ve nod kısımlarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada yaprak eksplantlarından kallus oluşumu gözlemlenmiş ve bu kalluslar BAP ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu besin ortamına aktarıldıktan 40 gün sonra sürgün oluşumu meydana geldiği belirtilmiştir (Janarthanam ve Seshadri, 2008). Yürütülen bu tez araştırmasında da S13 sterilizasyon uygulaması yapılan ve 2 mg/l NAA+ 4 mg/l BAP (U15) besin ortamına alınan yumru, gövde ve kök kültüründe 14. günden itibaren kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Bununla beraber 84 gün sonra yumru eksplantında olan iyice gelişerek sürgün oluşumu gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda farklı bir eksplant tipinin kullanıldığı S11 sterilizasyon uygulaması (5 dk %2 NaOCl+ Tween20) yapılan ve besin ortamına 2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA kombinasyonu (U14) ilave edilen besin ortamında ilkbahar aylarında alınan çiçek, çiçek tomurcuğu ve çiçek sapı kültüre alınmıştır. Yapılan bu kültürde 26. günde kallus oluşumu gözlemlenmiş ve kallus oluşturan eksplant oranı %23,08 olarak belirlenmiştir. 35. güne kadar bu oran sabit kalmıştır. Özzambak ve Hepaksoy (1996) bir vişne çeşidinin *In vitro* çoğaltımında, sürgün uçlarını eksplant olarak kullanmış ve yüzey sterilizasyonunu, birkaç damla Tween 20 ilave edilip %2 NaOCl'de 20 dakika süre ile yapmıştır. En iyi sonuç, ilkbahar döneminde alınan ve 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA içeren MS besin ortamındaki kültürlerden almıştır.

Ayrıca çalışmada sadece yaprak eksplantının BAP ve NAA kombinasyonları bulunan besin ortamlarında kültüre alındığı denemelerde kurulmuştur. Bu denemelerde öncelikle enfeksiyondan dolayı kayıplar yaşanırken sterilizasyon yönteminin modifiye edilmesiyle canlılık oranı artmış fakat herhangi bir kallus oluşumu gözlemlenememiştir. Nitekim Poyraz (2012) *Erodium somanum* bitkisinin tohumlarını çimlendirerek elde ettiği bitkilerden aldığı yaprak ve yaprak saplarını eksplant olarak kullandığı çalışmasında BAP ve IBA kombinasyonunu denemiş, besin ortamlarında gelişme gözlemlendiğini belirtmiştir. Çalışmada S1 sterilizasyon uygulamasında yaprak eksplantları BAP ve NAA kombinasyonları bulunan besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Bu kültürün 15. günde eksplantların kültüre alındıkları besin ortamları arasında canlılık oranı ortalaması açısından istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Sonuçlara göre canlılık oranı 15. günde U1 (2 mg/l BAP), U4 (2 mg/l NAA), U14 (2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA), U15 (4 mg/l BAP+ 2 mg/l NAA) besin ortamlarında %100 oranla ile en yüksek canlılık oranlarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Yaprak eksplantları canlılıklarını korumalarına rağmen herhangi bir kallus gelişimi meydana gelmemiştir. Ayrıca çalışmada yaprak eksplantının kullanıldığı kültürlerde eksplantların karararak canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiştir.

Yürütülen bu çalışmada yapılan ST sterilizasyon uygulamalarında salep bitkilerinden alınan yaprak eksplantları kültüre alınmıştır. ST sterilizasyon uygulamaları arasında canlılık ve enfeksiyon oranı ortalamalarında istatistiksel anlamda önemli bir fark elde edilmemiştir. En yüksek canlılık oranı ST1 (%94,443) ve ST2 (%91,665) saptanmıştır. Fakat canlılık oranı oldukça yüksek olmasına rağmen herhangi bir kallus oluşumu gözlemlenmemiştir. Janarthanam ve Seshadri (2008) yapmış olduğu çalışmada ise *Vanilla planifolia* orkide türünün yaprak eksplantlarından kallus oluşumu gözlemlenmiş ve bu kalluslar BAP ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu besin ortamına aktarıldıktan 40 gün sonra sürgün oluşumu meydana geldiği belirtilmiştir.

Kültür ortamının yeterli ışığa sahip olup olmaması kültür boyunca sonuç almada oldukça etkili olmakla birlikte çalışmamızda yaprak eksplantlarının kültürü esnasında 1200 lüks ışık şiddeti altında, 14 saat /gün aydınlık ortamda gerçekleştirilmiştir fakat herhangi bir gelişme söz konusu olamamıştır. Örneğin, Sheela vd. (2004) *Oncidium flexuosum* bitkisinin yapraklarının eksplant kaynağı olarak çalışmalarında kullanmış ve en iyi sonuçları karanlık ortamda yapılan denemelerde aldıklarını bildirmişlerdir. Dolayısı ile yürütülen bu araştırmada da kültür ortamında karanlık koşullar sağlanmış olsaydı farklı sonuçların elde edilebileceği kanaatine varılmıştır.

Kültür ortamlarımızda bulunan kombinasyonlardan olan 5 µM EpiBL ve bunun BAP ve NAA ile kombinasyonlarının kullanıldığı kültürlerde kallus gelişimi gözlemlenmemiştir. Nitekim yapılan bir çalışmada *Limonium sinuatum* (L.) Mill mikroçoğaltımın da 5 µM (BAP, EpiBL, NAA, GA₃) ilave edilmiş ve kontrol ortamında alt kültüre alınmıştır. Bunun sonucunda NAA bulunan besin ortamında %100 kök oluşturmuş, BAP bulunan besin ortamında en yüksek sürgün çoğalma elde edilmiştir. Sürgün uzaması ve büyümesi açısından kültürün ilk iki haftasında GA₃, altıncı haftada ise NAA en fazla boy artışının olduğu ve en uzun sürgünlerin olduğu besin ortamı olarak belirlenmiştir. EpiBL'nin diğer bitki büyüme düzenleyicilerine ve kontrol uygulamalarına göre istatistiksel bir farklılık oluşturmadığı saptanmış ve EpiBL'nin farklı konsantrasyonlarda, oksin ve sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicileri ile kombine edilerek denenmesi, EpiBL'nin etkisinin daha net ortaya çıkarabilmesi açısından yararlı olabileceği belirtilmiştir (Eken vd., 2019).

Bakteriyel kontaminasyon, bitki doku kültürü prosedürlerinde ciddi bir problemdir. Nano-TiO₂, bakterilerin öldürülmesi veya yayılımının engellenmesi için kapsamlı bir şekilde araştırması yapılmış ve bu bağlamda, *Solanum tuberosum* L. da yapılan çalışmada doku kültürü ortamına farklı miktarlarda TiO₂ eklenmiş ve kültürden dört hafta sonra antimikrobiyal aktivite yüzdelerinin verileri alınarak değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda *In vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlardaki TiO₂'nin MS ortamındaki mikroorganizmaları azaltabildiği ve kaldırdığı bildirilmiştir (Safavi, 2014). Başka bir çalışmada, nano gümüş (NS) ve nano dioksit titanyumun (TiO₂) bakteriyel kontaminasyonu ortadan kaldırma potansiyelini değerlendirmeyi planlayan araştırmacı, NS ve TiO₂'yi MS ortamına ekleyerek kültür ortamı olarak kullanmıştır. Tütün eksplantları, modifiye MS ortamında kültüre alındıktan dört hafta sonra değerlendirilmiştir. Sonuç olarak NS ve TiO₂'nin tütün bitkisi doku kültürü prosedürlerinde bakteriyel kontaminasyonun engellenmesi için iyi bir potansiyele sahip olduğunu gösterdiği saptanmıştır (Safavi, 2011). Ancak bu çalışmada MS besin ortamında kullanılan TiO₂'nin bakteriyel kontaminasyonu engellediği saptanamamış, TiO₂'nin bulunduğu kültürlerde de enfeksiyon olduğu gözlenmiştir.

Bununla birlikte besin ortamlarında TiO₂'nin tek konsantrasyonu olarak 30mg/l kullanılmış ve herhangi bir kallus gelişimi gözlemlenememiştir. Dolayısı ile yürütülecek yeni çalışmalarda TiO₂'nin farklı dozlarının kullanımı ile enfeksiyonları engelleyici etkisinin ortaya konulabileceği düşünülmüştür. Nitekim benzer amaçla yapılan başka bir çalışmada *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi eksplantları kültüre alınmış ve 10, 20, 30 ve 40 mg/ml

konsantrasyonlarında TiO₂ içeren MS ortamında mikroorganizmaların azaldığı ve eksplantların çok iyi büyüme gösterdiği belirtilmiştir. Bir başka çalışmada ise *Petroselinum crispum* *In vitro* kültüründe MS ortamına eklenen TiO₂'nin konsantrasyonundaki artışın çimlenme yüzdesi, çimlenme oranı, kök ve sürgün uzunluğu, canlılık oranı, klorofil yoğunluğu üzerinde önemli bir artışa neden olduğu ve en iyi TiO₂ konsantrasyonunun 30 mg/ml olduğu belirtilmiştir (Dehkourdi ve Mosavi, 2013). Benzer şekilde Chutipaijit ve Sutjaritvorakul (2018) *Oryza sativa* L. ssp. indica tohumları, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon sıklığını değerlendirmek için incelenmiştir. Embriyojenik kallus, 10-50 mg/l TiO₂ nanopartikülleri ile modifiye edilmiş bitki rejenerasyon ortamına aktarılmış ve bununla birlikte en yüksek bitki rejenerasyon sıklığı ve bitki sayısının rejenere kallus sayısına oranı, 40 mg/l TiO₂ nano parçacıkları ile modifiye edilmiş bitki rejenerasyon ortamında meydana gelmiştir. Rejenere sürgünler, bitki büyüme düzenleyicileri olmayan NB ortamında köklenmiş ve bu bitkicikler toprakta aktarılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda artan taleple birlikte salep orkidelerinin varlığı ve korunması oldukça önemli olmuştur. Bununla birlikte, salep orkidelerinin doğal ortamından sökümü yapılarak ticaretinin yapılması ciddi bir sorunlarımızı çıkarmaktadır. Endospermi bulunmadığı ve küçük tohuma sahip olmasıyla birlikte mikorizalarla yaşam kurarak doğal alanlarında yetişmeleri büyük önem taşımakta ve tohumdan yeni bitki oluşumu uzun zaman almaktadır. Nesillerinin tükenmesini önlemek amacıyla kültürünün yapılarak üretiminin gerçekleştirilmesinin önemi giderek artmaktadır. Doğal ortamında bitkiye dönüşümünün, yumru oluşturmalarının ve yumru ile üretiminin uzun zaman almasından dolayı klasik kültürünün yapılmasının yerine doku kültüründe üretiminin yapılması avantajlı olacağı düşünülmektedir. Doku kültürü geleneksel yöntemlerle zor üretimi yapılan, bitki hastalıklarına dayanıklı, bitki gen kaynağının korunması ve ıslah amaçlı çalışmalar açısından avantaj sağlamaktadır.

Bu bağlamda bahsedilen avantajların salep orkidelerinde sağlanabilmesi amacıyla yapılan çalışmada *In vitro* kültürde farklı bitki büyüme düzenleyiciler ile farklı eksplant tipleri kullanılmıştır. Besin ortamı olarak MS ortamı kullanılmış ve bu besin ortamına 2 mg/l ve 4 mg/l BAP, 1 mg/l ve 2 mg/l NAA, 1 mM SA, 5 µM EpiBL, 30 mg/l TiO₂ eklenmiş ve 2 mg/l BAP'ın SA, EpiBL, TiO₂ ile kombinasyonları bununla birlikte 1 mg/l NAA'nın SA, EpiBL, TiO₂ ile kombinasyonları oluşturulmuştur. Aynı zamanda BAP ve NAA dozlarından kombinasyonlar oluşturulmuş 2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA ve 4 mg/l BAP+ 2 mg/l NAA kültür ortamı olarak kullanılmıştır. Bu besin ortamı kombinasyonlarına ek olarak Kontrol besin ortamı (bitki büyüme düzenleyici bulunmayan MS ortamı) kullanılmıştır. Eksplant tipi olarak *Orchis* sp. ve *Ophrys* sp. salep orkidelerinden elde edilen yumru, çiçek, çiçek sapı, kök ve gövde kısımları kullanılmıştır.

Çalışmada sterilizasyon için uygulanan başlangıç sterilizasyonunda eksplantlar tamamen enfeksiyon olması nedeniyle canlılık kayıpları yaşanmış ve eksplantların tamamı canlılığını yitirdiği için herhangi bir gelişmede görülmemiştir. Kullanılan eksplant kaynaklarının salep orkidelerinin toprak altı organları olan yumru, kök, gövde kısmı olmasından dolayı bu eksplantlardaki toprak partiküllerinin ve bitkinin barındırdığı hastalık etmenlerinin temizlenmesi amacıyla sterilizasyon yönteminde yoğun uygulamalar

yapılmıştır. Bu nedenle sterilizasyon prosedürü modifiye edilerek farklı sterilizasyon protokolleri denenmiştir. Bu bağlamda sodyum hipokloritin konsantrasyonu ve uygulama süreleri üzerinde değişiklikler yapılmış, buna ek olarak bazı fungusitlerden de yararlanılmıştır. Modifiye edilen sterilizasyon yöntemlerinde canlılık oranının yüksek olduğu sterilizasyon uygulamaları fungusitle muamele aşaması bulduran sterilizasyon uygulamaları olmuştur. Bununla birlikte doz ve süre bakımından uygulanan sterilizasyon yöntemlerinde en iyi sonuç 5 dakika 100 ml/100 lt Azoxystrobin+Difenoconazole olan fungusit uygulamasında meydana gelmiştir. Bununla beraber sodyum hipoklorit konsantrasyonu ve uygulama süresi olarak en iyi sonuç %1,5 sodyum hipoklorit+ 1-2 damla Tween 20 eklenmiş çözeltide eksplantların 30 dakika steril edilmesinden alınmıştır. Yumru eksplantlarının kullanıldığı sterilizasyon uygulamasında 20-30 dk %1,5-2 konsantrasyonda sodyum hipoklorit uygulanmasında en iyi sonuç elde edilmiş ve canlılık oranı yüksek olmuş, kültür boyunca canlılıklarını korumuşlardır. Yaprak, çiçek sapı ve çiçek eksplantlarında en iyi sonucu veren sterilizasyon yöntemi %2 sodyum hipoklorit ve 1-2 damla Tween 20 içeren çözeltide 5-15 dk bekletilme uygulaması olmuştur. Fungusit uygulamasında bekletilme süresi olarak en iyi sonuç yumru eksplantlarında 5 dakika, çiçek ve yaprak eksplantlarında 3 dakika olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada yaprak eksplantının kültüre alındığı S1 sterilizasyon uygulamasında kültürün 15. gününde eksplantların kültüre alındıkları besin ortamları arasında canlılık oranı ortalaması açısından istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Buna göre canlılık oranı 15. günde U1 (2 mg/l BAP), U4 (2 mg/l NAA), U14 (2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA), U15 (4 mg/l BAP+ 2 mg/l NAA) besin ortamlarında %100 oranla ile en yüksek canlılık oranlarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. S1 uygulamasına benzer şekilde eksplant olarak yaprakların kültüre alındığı ST sterilizasyon uygulamaları ST sterilizasyon uygulamaları arasında canlılık ve enfeksiyon oranı ortalamalarında istatistiksel anlamda önemli bir fark elde edilmemiştir. En yüksek canlılık oranı ST1 (%94,443) ve ST2 (%91,665) saptanmıştır. Ayrıca çalışmada yaprak eksplantının kullanıldığı kültürlerde fitotoksik etkilerden dolayı eksplantların kararak canlılıklarını yitirdikleri gözlemlenmiş ve herhangi bir gelişim sağlanmamıştır.

Kültüre alınan eksplantlarda sterilizasyon işlemi yapıp kültür boyunca bu eksplantların canlı kalması sağlanmış olsa bile kültüre alındıkları besin ortamında herhangi bir gelişim gözlenemeyen uygulamalar olmuştur. Kallus gelişimi BAP ve NAA kombinasyonları olan U14 (2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA) ve U15 (4 mg/l BAP+ 2 mg/l NAA) besin ortamlarında gerçekleşmiştir.

Besin ortamı olarak 2 mg/l NAA+ 4 mg/l BAP içeriğe sahip MS besin ortamında kültüre alınan ve eksplant olarak yumru kullanılan kültürlerde en fazla kallus oluşturan eksplant oranı oluşumu modifiye S12 sterilizasyon uygulaması sonucunda %22,0 olarak meydana gelmiştir. Bu kallus oluşturan eksplant oranını yine eksplant olarak yumru parçası kullanılan S8 uygulaması (30 dk %1,5 NaOCl+ Tween20) %4,55 ile; S10 uygulaması %5,88 ile; S13 uygulaması %7,14 ile; S9 uygulaması sonucu ise %8,33 olarak takip etmektedir.

U15 besin ortamında kültüre alınan gövde ve kök kısımlarının eksplant olarak kullandığı kültür ortamlarında en yüksek kallus oluşturan eksplant oranı S13 uygulamasında %12,50 olmuştur. S12 uygulaması sonucunda ise %4,55 oran ile gövde ve kök eksplantlarında kallus oluşumu meydana gelmiştir.

Çalışmada, yine U15 besin ortamında S8 sterilizasyon uygulaması yapılarak kültüre alınan yumru parçalarında, kültüre alındıktan 14 gün sonra kallus oluşumu gözlemlenirken; S9 uygulamasında yumru eksplantlarında 18 gün sonra gözlemlenmiş, S10 uygulamasında ise yumru eksplantlarının 29 günlük kültüründe kallus oluşumu gözlemlenmiştir. S12 sterilizasyon uygulaması yapılarak U15 besin ortamında kültüre alınan yumru eksplantlarında 47 günlük kültür süresinde kallus oluşturmuştur. Bununla beraber 18. günde gövde eksplantında gelişme saptanmış ve 47. güne kadar bu devam etmiştir. İlerleyen süreçte gövde eksplantı enfeksiyon nedeniyle canlılığını yitirmiştir. Denemede U15 besin ortamındaki yumru eksplantında 102 gün sonra sürgün oluşumu başlamış, bir süre sonra başka bir besin ortamına aktarılmış olmasına rağmen fenolik maddelerin etkisi ile kararma nedeniyle canlılığını kaybetmiştir. S13 uygulaması ile sterilizasyonu gerçekleştirilen ve 2 mg/l NAA+ 4 mg/l BAP (U15) besin ortamına alınan yumru, gövde ve kök kültüründe 14. günden itibaren kallus oluşumu gözlemlenmiştir. Bununla beraber 84 gün sonra yumru eksplantında sürgün oluşumu gözlemlenmiştir.

Çalışmada farklı eksplant tiplerinin kullanıldığı S11 sterilizasyon uygulaması yapılarak 2 mg/l BAP+ 1 mg/l NAA kombinasyonu içeren U14 besin ortamında çiçek, çiçek tomurcuğu ve çiçek sapı kültüre alınmıştır. Bu kültürde 26. günde kallus oluşturan eksplant oranı gözlemlenmiş ve kallus oluşturan eksplant oranı %23,08 olarak belirlenmiş, 35. güne kadar KOEO'nı sabit kalmıştır. Ayrıca çalışmada sadece yaprak eksplantının BAP ve NAA kombinasyonları bulunan besin ortamlarında kültüre alındığı denemelerde kurulmuştur. Bu denemelerde öncelikle enfeksiyondan dolayı kayıplar yaşanırken sterilizasyon yönteminin

modifiye edilmesiyle canlılık oranı artmış fakat herhangi bir kallus oluşumu gözlemlenememiştir.

Kültür ortamlarımızda bulunan kombinasyonlardan olan 5 µM EpiBL ve bunun BAP ve NAA ile kombinasyonlarının kullanıldığı kültürlerde kallus gelişimi gözlemlenememiştir. Doku kültüründe TiO₂'nin besin ortamına eklenerek bakteriyel kombinasyonu engellediğinden bahsedilmesine rağmen çalışmada MS besin ortamında kullanılan TiO₂'nin bakteriyel kontaminasyonu engellediğine ilişkin bir sonuç elde edilememiş, TiO₂'nin bulunduğu kültürlerde de enfeksiyon olduğu gözlenmiştir. Besin ortamlarında TiO₂'nin tek konsantrasyonu olarak 30mg/l kullanılmıştır ve herhangi bir kallus gelişimi gözlemlenememiştir.

Yapılan bu çalışma ile salep orkidelerinin toprak altı ve toprak üstü organları eksplant olarak kullanılarak bitki oluşumu sağlanıp üretiminin yapılması amaçlanmasına rağmen yaşanan pandemi şartlarından dolayı beklenen sonuçların alınması oldukça güç olmuştur. Bununla beraber parametre olarak alınacak verilerin takibinin yapılması ülkemizde yapılan kapanmalardan dolayı aksamıştır. Ayrıca salep orkidelerinin *In vitro* kültürünün zor olması nedeniyle sterilizasyonda yaşanan sıkıntılarla birçok modifiye sterilizasyon yöntemleri çalışma kapsamında denenmiştir. Bu çalışma kapsamında salep orkidelerinin *In vitro* kültüre alınması aşamasında kullanılacak en uygun sterilizasyonu yöntemi belirlenmiş olmuştur. Bunun yanı sıra salep orkidelerinde yapılabilecek *In vitro* çalışmalarda uyguladığımız modifiye sterilizasyon yöntemleri önemli bir kaynak olabilir. Bununla beraber Kültür ortamlarında BAP ve NAA bulunan kombinasyonlarda kallus gelişimi gerçekleşmiştir. Bunun sebebi salep orkidelerinin temin edildiği iklim şartları veya yumruların uyanma dönemi olması ihtimaliyle oluşturulacak çalışmalarda bu dönemlere denk gelecek şekilde yeni çalışmaların planlanması olumlu sonuçların alınmasına katkı sağlayabilecektir. Kültür ortamlarında bulunan BAP ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerin farklı dozları ve SA, EpiBL ve nano TiO₂'nin tek dozu çalışma kapsamında kullanılmıştır. Herhangi bir gelişme görülmemesine rağmen salep orkidelerinin *In vitro* kültüründe ilk defa SA, EpiBL ve TiO₂ kullanılmıştır. Araştırmada SA, EpiBL ve TiO₂'nin tek dozu kullanılmış ve bunlar sadece BAP ve NAA'ın tek dozları (1mg/l NAA ve 2mg/l BAP) ile kombinasyonları oluşturulmuştur. SA ve EpiBL kullanılan besin ortamı kombinasyonlarında kallus gelişiminin görülmemesinin nedeni tek doz kullanılması olabilir ve bu bitki büyüme düzenleyicilerin etkilerinin belirlenebilmesi adına farklı konsantrasyonları ile çalışmalar

oluşturulabilir. Benzer şekilde enfeksiyon oluşumu üzerine etkisi beklenen nano TiO₂'nin de farklı çalışmalar kapsamında denenerek kontaminasyonlar üzerine etkinliği irdelenebilir.



KAYNAKLAR

- Aghdam, M. T. B., Mohammadi, H., & Ghorbanpour, M. (2016). Effects of nanoparticulate anatase titanium dioxide on physiological and biochemical performance of *Linum usitatissimum* (Linaceae) under well-watered and drought stress conditions. Brazilian journal of botany, 39(1), 139-146.
- Ağar, D. (2018) *Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter salep orkide tohumlarının *in vitro* çimlenmesi Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Akif Şen, M. (2016) *Türkiye'nin değişik yörelerinden toplanan orkidelerden elden edilen saleplerin özelliklerinin belirlenmesi ve geleneksel yöntemle Maraş usulü dondurma yapımında ürün kalitesine etkilerinin araştırılması* Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Aksakal, Ş. (2009) *Pamuk in vitro kültürlerinde 24-epibrassinolid'in etkisi* Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Aktaş, L. Y. ve Güven, A. (2005). Bitki savunma sistemlerinde hormonal sinyal moleküller ve çapraz iletişimleri. Çankaya University Journal of Arts and Sciences, 1(3), 1-12.
- Aktaş, Y. L. (2001) *Vitis vinifera L. cv. Sultani'de salisilik asit uygulamasının yaprak proteinleri içeriği üzerine etkileri* Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Alvarez, R., Farías, Y. ve Angarita, M. (2005). Effect of application of brassinosteroid (Biobras-16) on the growth and number of buds of 'Madame Delbard' and 'Lidia' roses. In Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Vol. 48, pp. 189-190. Interamerican Society for Tropical Horticulture.
- Amzallag, G. N. ve Vaisman, J. (2006). Influence of brassinosteroids on initiation of the root gravitropic response in *Pisum sativum* seedlings. Biologia plantarum, 50(2), 283-286.

- Andronova, E. V. ve Ivasko, 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.
- Ankudo, T. (2004). Immunomodulation of brassinosteroid functions in seeds of *Arabidopsis thaliana* (L.) (Doctoral dissertation, Halle (Saale), Univ., Diss., 2004).
- Antognoni, F., Ghetti, F., Mazzucato, A., Franceschetti, M., & Bagni, N. (2002). Polyamine pattern during flower development in the parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato. *Physiologia Plantarum*, 116(4), 539-547.
- Arditti, J., and Krikorian, A. D. (1996). Orchid micropropagation: the path from laboratory to commercialization and an account of several unappreciated investigators. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122(3), 183-241.
- Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33(1), 1-97.
- Arditti, J. (1982). *Orchid Biology. Review and perspectives. I.* Cornell Univ. Press. Ithaca: 1-390.
- Arditti, J. and Ernst, R. (1982). In: Stewart and Merwe, Van der, 263-277.
- Arditti, J. O. S. E. P. H., & Harrison, C. R. (1977). Vitamin requirements and metabolism in orchids. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives (USA)*.
- Arditti, J., and Ghani, A. K. A. (2000). Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *The New Phytologist*, 145(3), 367-421.
- Arslan, N. (2012). Ülkemizde CITES Listesinde Olan Bitki Türleri ve Salep. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Menemen İzmir.
- Ashraf, M., Akram, N. A., Arteca, R. N., and Foolad, M. R. (2010). The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(3), 162-190.
- Aybeke, M. (2002). Orkidelerde granuler polenler ve poliniumlar üzerinde *in vitro* çimlenme deneyleri. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 15, 71-80.

- Aytaş, T. (1994) *Bazı Ophrys L.(Orchidaceae) türlerinden simbiyotik fungusların izolasyonu ve Ophrys apifera Hudson tohumlarının asimbiyotik ve simbiyotik ortamlarda çimlendirilmesi üzerine bir araştırma* Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., & Akbudak, M. A. (2001). Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri. *Bitki Biyoteknolojisi*, 1, 1-35.
- Bajguz, A., & Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant physiology and biochemistry*, 47(1), 1-8.
- Baktır, İ. (2010). *Plant growth regulators: properties and uses in agriculture*. Hasad Publishing.
- Baran, A., & Doğan, M. (2014). Tuz stresi uygulanan soyada (*Glycine max* L.) salisilik asidin fizyolojik etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 18(1), 78-84.
- Barroso, J., Fevreiro, P., Oliveira, M. M., & Pais, M. S. S. (1990). *In vitro* seed germination, differentiation and production of minitubers from *Ophrys lutea* Cav., *Ophrys fusca* Link and *Ophrys speculum* Link. *Scientia horticultrae*, 42(4), 329-337.
- Barthlott, W., Lauer, W., & Placke, A. (1996). Global distribution of species diversity in vascular plants: Towards a world map of phytodiversity (globale verteilung der artenvielfalt höherer pflanzen: Vorarbeiten zu einer weltkarte der phytodiversität). *Erdkunde*, 317-327.
- Baskin, C. C. and Baskin, J. M. (1998). Seeds: ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination. Elsevier. *Annals of Botany* 86(3):705-707
- Baytop, T. ve Sezik, E. (1968). Türk salep çeşitleri üzerinde araştırmalar. *Journal of the Faculty of Pharmacology*, 4, 61-68.
- Behnamnia, M., Kalantari, M. ve Rezanejad, F. (2009) Exogenous application of brassinosteroid alleviates drought-induced oxidative stress in *Lycopersicon esculentum* L., *Gen Appl Plant Physiol*, 35 (1-2): 22-34.
- Bektaş, E. (2014). *Orchis sancta l. ve Serapias vomeracea (BURM. F.) briq. türlerinin bitki doku kültürü yöntemiyle üretimi* Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Bektaş, E. (2016). *Dactylorhiza urvileana*'nın *in vitro* asimbiyotik çimlendirilmesi ve fidelerinin oluşturulması. Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 17(1), 89-95.
- Bektaş, E., Cüce, M., & 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(2), 336-342.
- Bhadra, S. K., & Hossain, M. M. (2003). *In vitro* germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. Plant Tissue Cult, 13(2), 165-171.
- 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.
- Bozdemir, H. (2016) *Orchis sancta L. türünün in vitroda çoğaltılması üzerine farklı konsantrasyonlardaki karbon formlarının etkisi* Yüksek Lisans Tezi, Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Siirt.
- Bozyel, M. E., & Gönüz, A. (2017). Vegetative Anatomy and Morphology of *Ophrys lutea* ssp. minör in Çanakkale. In Interactive conservation platform for orchids native to Greece and Turkey (ICON) International Final Conference (Vol. 18, pp. 21-34).
- Charnysh, M., Batuleu, A. V., & Demidchik, V. (2016). The effect of brassinosteroids on growth and development of *Phalaenopsis* protocorm-like bodies. Proceedings of Fourth International Symposium on Plant Signaling and Behavior, Saint Petersburg, Russia, 19-24 June 2016. Saint Petersburg: SINEL Co.Ltd., 2016. – P. 136-137.
- Chen, J. T., Gow, W. P., & Chang, W. C. (2007). Zygotic and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. Orchid Science and Biotechnology, 1(2), 40-43.
- Chen, L. G., Liu, Z. L., & Zhuo, R. X. (2005). Synthesis and properties of degradable hydrogels of konjac glucomannan grafted acrylic acid for colon-specific drug delivery. Polymer, 46(16), 6274-6281.
- Chung, Y., Maharjan, P. M., Lee, O., Fujioka, S., Jang, S., Kim, B., ... & Choe, S. (2011). Auxin stimulates DWARF4 expression and brassinosteroid biosynthesis in Arabidopsis. The Plant Journal, 66(4), 564-578.

- Chutipajit, S., & Sutjaritvorakul, T. (2018). Application of activated charcoal and nanocarbon to callus induction and plant regeneration in aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *Chemical Speciation & Bioavailability*, 30(1), 1-8.
- Ciğerli, S. (2018) *Farklı salisilik asit dozlarının bazı Amerikan asma anaçlarının tuzluluğa olan dayanımları üzerine etkilerinin in vitro koşullarda belirlenmesi* Yüksek lisans tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Cleland, C. F., & Ajami, A. (1974). Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiology*, 54(6), 904-906.
- Clements, M. A., Muir, H., & Cribb, P. J. (1986). A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bulletin*, 437-445.
- Clouse, S. D., & Sasse, J. M. (1998). Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual review of plant biology*, 49(1), 427-451.
- Couée, I., Hummel, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., & El Amrani, A. (2004). Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(1), 1-10.
- Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K. W., & Barrett, R. L. (2003). Orchid conservation: a global perspective. *Orchid conservation*, 124.
- Çağlayan, K., Özavcı, A., & Eskalen, A. (1997). Kahramanmaraş yöresinde doğal yayılış gösteren salep orkidelerinin *In vitro* da sürgün ucu kültürü ile çoğaltılabilme olanakları üzerinde araştırmalar. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2, 11-24.
- Çağlayan, K., Özavcı, A., & Eskalen, A. (1998). Doğu Akdeniz bölgesinde yaygın olarak yetişen bazı salep orkidelerinin embriyo kültürü kullanılarak *In vitro* koşullarda çoğaltılmaları. *Tr. J. of Agriculture and Forestry* 22 (1998) 187-191
- Çığ, A. (2012) *Van'da doğal olarak yetişen salep orkidelerinin simbiyotik ve asimbiyotik olarak in vitro ve in vivo ortamlarda çoğaltılması* Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Das, A. and Ghoshall, K. K. (1989). In vitro germination behaviour of some orchids seeds developed in plains of West Bengal. *Indian Agriculturist*, 33:2, 103-109; 8ref.

- Dastyaran, M. (2015). Effect of Humic Acid and exogenous Putrescine on vase life and leaf macro elements status of hydroponic cultured rose (*Rosa hybrid cv.'Dolce Vita'*). *Agricultural Communications*, 3(1), 43-49.
- Davis, P. H. (1984). *Flora of Turkey*. University of Press, Edinburg. 8: 450-551.
- Dehkourdi, E. H. and Mosavi, M. (2013). Effect of anatase nanoparticles (TiO₂) on parsley seed germination (*Petroselinum crispum*) *in vitro*. *Biological trace element research*, 155(2), 283-286.
- Deniz, İ. G. (2009) *Antalya ilinde yayılış gösteren Ophrys L.(Orchidaceae) cinslerine ait türler üzerinde taksonomik bir araştırma* Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya.
- Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, K. F., & Krishna, P. (1999). Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant molecular biology*, 40(2), 333-342.
- Dijk, E. (1988). Mykorrhizen der Orchideen. III. Physiologische Aspekte bezüglich Kohlenstoff und Stickstoff. *Die Orchidee*, 39, 196-200.
- Divi, U. K. and Krishna, P. (2009). Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *New biotechnology*, 26(3-4), 131-136.
- Dogan, M. and Kayacier, A. (2004). Rheological properties of reconstituted hot salep beverage. *International Journal of Food Properties*, 7(3), 683-691.
- Dressler, R. L. (1981). *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press.
- Eberhard, S., Doubrava, N., Marfa, V., Mohnen, D., Southwick, A., Darvill, A., & Albersheim, P. (1989). Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell-layer explant morphogenesis. *The Plant Cell*, 1(8), 747-755.
- Eken, L. ve Şirin, U. (2016). Süs Bitkilerinde Kullanılan Bitki Büyüme Düzenleyici Maddeler ve Yeni Yaklaşımlar. VI. Süs Bitkileri Kongresi, 325-330.
- Eken, L., Kabakçı, M., Dayar, İ., Şirin, U., Özzambak, M. E. (2019). The Effects Of Epibrassinolide And Some Other Plant Growth Regulators On Micropropagation Of *Limonium sinuatum* (L.) Mill.. *Researches in Landscape and Ornamental Plants*, 179-196.

- Ekinoğlu, D. N. (2017) *Salep orkidelerinin mikroçoğaltımı* Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Ellialtıoğlu, Ő. ve Gümüş, C. (2011). Orkidenin Doku Kùltürü ile Çoğaltılması. I. Salep Orkidesi Çalıştayı, 24-25.
- El-Quesni, F. E. M., Kandil, M. M., & Mahgoub, M. H. (2007). Some studies on the effect of putrescine and paclobutrazol on the growth and chemical composition of *Bougainvillea glabra* L. at Nubaria. *American-Eurasian J Agric Environ Sci*, 2(5), 552-558.
- El-Sabwa, M. M. N. (2012). Effect of some plant growth regulators on growth and flowering of *Salvia splendens* L. plant (Doctoral dissertation, Cairo University).
- Erdem, H. E. (2004) *Biyolojik çeőitliliđinin ekonomik değerinin belirlenmesi: Yabani orkide örneği* Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ernst, R., & Arditti, J. (1990). Carbohydrate physiology of orchid seedlings. III. Hydrolysis of maltooligosaccharides by *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. *American journal of botany*, 77(2), 188-195.
- Erzurumlu, G. ve Doran, İ. (2011). Türkiye’de salep orkideleri ve salep kùltürü. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 15(1), 29-34.
- Farhoosh, R. and 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(4), 660-666.
- Fos, M., Proano, K., Alabadi, D., Nuez, F., Carbonell, J., & Garcia-Martinez, J. L. (2003). Polyamine metabolism is altered in unpollinated parthenocarpic pat-2 tomato ovaries. *Plant Physiology*, 131(1), 359-366.
- Franck-Duchenne, M., Wang, Y., Ben Tahar, S., & Beachy, R. N. (1998). *In vitro* stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53(2), 79-84.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(4), 272-289.

- Gast, K. (1999, November). Methyl jasmonate and long term storage of fresh cut peony flowers. In VII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants 543 (pp. 327-330).
- Gerçekçioğlu, R., Bilginer, Ő., Soylu, A. (2008). Genel Meyvecilik. ISBN 978-605-395-076-9 480 s. 2008.
- Ghorbani, A., Zarre, S., Gravendeel, B., & de Boer, H. J. (2014). Illegal wild collection and international trade of CITES-listed terrestrial orchid tubers in Iran. *Traffic Bulletin*, 26(2), 52-58.
- Gönülşen, N. (1983). Salep Bitkilerinden *Orchis anatolica* Boiss.'. Doku Kùltürü ile Üretimi. Ege Bölgesi Araştırma Enstitüsü Yayınları, İzmir.
- Gönülşen, N., Önal, M. K., Ercan, N., Yıldızördü, K., Őekerođlu, E., Biçici, M., & Eskalen, A. (1995). Ege ve Doğu Akdeniz Bölgesi'nde doğal yayılış gösteren *Orchidaceae* familyasına ait bazı türlerin *in vitro* ve *in vivo* koŐullrda üretimleri üzerinde araştırmalar.
- Güler, N., Gönüz, A., Hürkan, K., & Döver, E. (2008). Çan (Çanakkale-Türkiye) İlçesi Doğal YayılıŐlı Bazı *Orchidaceae* Taksonları Üzerine Gözlemler. Çan Değerleri Sempozyumu, 28(29), 143-168.
- 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. ve Ellialtıoğlu, Ő. (2005). *Orchis laxiflora* Lam. Tohumlarının Asimbiyotik Olarak Çimlendirilmesi ve *In vitro* Koşullarda Bitkiye DönüŐümü Üzerine Araştırmalar.
- Gümüş, C., Sezik, E., Ellialtıoğlu, Ő. (2008). Batı Karadeniz Bölgesi'nde yetişen ve salep elde edilen bazı orkide (*Orchidaceae* sp.) türlerinin doku kùltürü ile çoğaltılması üzerinde bir araştırma. III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi. 8-10 Kasım 2006, İzmir, 179-187.
- Gürel, A., Hayta, Ő., Nartop, P., Bayraktar, M. ve Fedakar, S. (2013). Bitki Hücre, Doku ve Organ Kùltürü Uygulamaları. İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları, 58,221.
- Haberer, G. and Kieber, J. J. (2002). Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology*, 128(2), 354-362.

- Hadley, G. and Harvais, G. (1968). The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. *New Phytologist*, 67(2), 441-445.
- Hagsater, E., Dumont, V., & Pridgeon, A. M. (1996). Orchids: status survey and conservation action plan (Vol. 28). IUCN.
- Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), 1773.
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A. J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Komeda, Y. (2000). ACAULIS5, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *The EMBO journal*, 19(16), 4248-4256.
- Harvais, G. (1973). Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture. *Canadian Journal of Botany*, 51(2), 327-332.
- Harvais, G. and Hadley, G. (1967). The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytologist*, 66(2), 217-230.
- Harvais, G. and Pekkala, D. (1975). Vitamin production by a fungus symbiotic with orchids. *Canadian Journal of Botany*, 53(2), 156-163.
- Hatipoğlu, A., Ringe, F., & Korkut, A. (1984). Toprak orkidelerinin doğal yetiştirme alanlarında bir vejetasyon süreci içerisindeki biyolojik ritminin gözlenmesi ve toprak orkidelerinin üretimi. *Ege Üniversitesi, Giessen İşbirliği Haftası ve Sempozyumu*, 29.
- Hong, F., Zhou, J., Liu, C., Yang, F., Wu, C., Zheng, L., & Yang, P. (2005). Effect of nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological trace element research*, 105(1), 269-279.
- Hossain, M. M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advance an overview. *Fitoterapia*, 82(2), 102-140.
- Ingold, C. T. and Hudson, H.J. (1993). *The biology*, Sixth Edition (Chapman Hall). London, 224
- Islam, M. O., Akter, M., & Prodhan, A. K. M. A. (2011). Effect of potato extract on *in vitro* seed germination and seedling growth of local *Vanda roxburgii* orchid. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 9(2), 211-215.
- Işın, M. P. (2008). Salep, spiced winter drink and cure-all (Salep, Rahat-ı Can Sıhhatü'l-Ebdan Talim-i Nefayis). 1. Uluslararası Tıp Tarihi Kongresi, 10, 20-24.

- İlçim, A. (2011). Orkide Türleri ve Yayılış Alanları, Kahramanmaraş, Türkiye, 1. Salep Orkidesi Çalıştayı, 24-25 Mayıs Kahramanmaraş,13s.
- Janarthanam, B. and Seshadri, S. (2008). Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 44(2), 84-89.
- Jorgensen, B. I.(1998). Hardy and half hardy terrestrial orchids as potential new potplants. Proceedings of the Third International Symposium on New Floricultural Crops. 1-4 October. Perth, Western Australia. 195-205.
- Kandil, M. M., Ibrahim, M. M., El-Hanafy, S. H., & El-Sabwah, M. M. (2015). Effect of putrescine and uniconazole on some flowering characteristics and some chemical constituent of *Salvia splendens* F. plant. Intl. J. Chem. Technol. Res, 8(9), 174-186.
- Karakuş, B. (2015) *Bazı salep orkidelerinin in vitro ortamda çimlenme, protokorm ve bitkicik oluşumunu etkileyen faktörleri araştırılması* Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Kasperek, M. and Grimm, U. (1999). European trade in Turkish salep with special reference to Germany. *Economic Botany*, 53(4), 396-406.
- Kayıkçı, S. ve Oğur, E. (2012). Hatay ilinde yayılış gösteren bazı orkide türleri üzerine bir inceleme. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 22(2), 1-12.
- Keithley, J. K. and Swanson, B. (2005). Glucomannan and obesity: a critical review. *Alternative therapies in health and medicine*, 11(6), 30-35.
- Kemeç, Y., Hürkan, K., ve Aki, C. (2015). *In vitro* pollen germination of orchids traditionally used to produce salep. *European Journal of Environmental Sciences*, 5(2).
- Kemeç, Y. (2015) *Çanakkale çevresinde yayılış gösteren bazı salep orkidelerinin farklı besin ortamlarında in vitro çoğaltımı* Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Kısakürek, Ş., Arpacı, B. B., Özdemir, A., Dalfesoğlu, K., Ergun, N., & Kaya, Y. (2009). Kahramanmaraş Doğal Florasında Yetişen ve Salep Üretiminde Kullanılan Bitkilerin Kültüre Alınabilme Olanakları. TAGEM Araştırma Sonuç Raporları.

- Kireççi, O. A. (2006) *Bazı sentetik hormonların (giberillik asit, spermin, spermidin, putresin) fesleğen,(Ocimum basilicum) bitkisinde morfolojik yapı ve uçucu yağ kalitesine etkisi* Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Klessig, D. F. and Malamy, J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant molecular biology*, 26(5), 1439-1458.
- Kocak, M., Izgu, T., Sevindik, B., Tutuncu, M., Curuk, P., Simsek, O., ... & Mendi, Y. Y. (2014). Somatic embryogenesis of Turkish *Cyclamen persicum* Mill. *Scientia Horticulturae*, 172, 26-33.
- Koopowitz, H. (2001). *Orchids and their conservation*. Timber Press (OR).
- Kreutz, C. (1998). *Die Orchideen der Türkei-Beschreibung, Ökologie, Verbreitung Gefährdung, Schutz: 766p*. CAJ Kreutz Selbstverlag, Landgraaf/Raalte.
- Kreutz, C. A. J. (2000). *Flora of Turkey and East Aegan Islands*. Vol: 11.
- Kreutz, C. A. J. (2002). Türkiye'nin orkideleri, salep, dondurma ve katliam. *Yeşil Atlas*, 5, 98-109.
- Kudryashova, O. A., Volotovich, A. A., Vasilevskaya, T. I., Varavina, N. P., Rupasova, Z. A., & Khripach, V. A. (2012). Effects of 24-epibrassinolide on *in vitro* micropropagation of highbush blueberry. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(4), 586-593.
- Kumlay, A. M. ve Eryiğit, T. (2011). Bitkilerde büyüme ve gelişmeyi düzenleyici maddeler: bitki hormonları. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 1(2), 47-56.
- Leake, J. R. (1994). The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*, 127(2), 171-216.
- Lee, T. T. and Skoog, F. (1965). Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18(2), 386-402.
- Leslie, C. A. and Romani, R. J. (1988). Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid. *Plant physiology*, 88(3), 833-837.
- Liu, H., Wang, M., Wen, Z., Cui, C., Deng, J. (2014). Effects of Brassinosteroid Sprayed in Different Stages on the Florescence and Ornamental Quality of *Chrysanthemum*. *Hubei Agricultural Sciences*.2014-01

- Liu, K., Fu, H., Bei, Q., Luan, S. (2000). Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiology*, 124(3), 1315-1326.
- Luzzatto, T., Yishay, M., Lipsky, A., Ion, A., Belausov, E., & Yedidia, I. (2007). Efficient, long-lasting resistance against the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* in calla lily provided by the plant activator methyl jasmonate. *Plant Pathology*, 56(4), 692-701.
- Malabadi, R. B. and Nataraja, K. (2007). Brassinosteroids influences *in vitro* regeneration using shoot tip sections of *Cymbidium elegans* Lindl. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6(2), 308-313.
- Malabadi, R. B., Teixeira da Silva, J. A., Nataraja, K., Mulgund, G. S. (2008). Shoot tip transverse thin cell layers and 24-epibrassinolide in the micropropagation of *Cymbidium bicolor* Lindl. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 2(2), 44-48.
- Mandeh, M., Omidi, M., Rahaie, M. (2012). *In vitro* influences of TiO₂ nanoparticles on barley (*Hordeum vulgare* L.) tissue culture. *Biological trace element research*, 150(1), 376-380.
- Martín-Mex, R., Vergara-Yoisura, S., Nexticapán-Garcés, Á., & Larqué-Saavedra, A. (2010). Application of low concentrations of salicylic acid increases the number of flowers in *Petunia hybrida*. *Agrociencia*, 44(7), 773-778.
- Martin-Mex, R., Villanueva-Couoh, E., Herrera-Campos, T., & Larque-Saavedra, A. (2005). Positive effect of salicylates on the flowering of African violet. *Scientia horticultrae*, 103(4), 499-502.
- Mead, J. W. and 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.
- Meir, S., Droby, S., Davidson, H., Alsevia, S., Cohen, L., Horev, B., & Philosoph-Hadas, S. (1998). Suppression of *Botrytis* rot in cut rose flowers by postharvest application of methyl jasmonate. *Postharvest Biology and Technology*, 13(3), 235-243.

- Meir, S., Droby, S., Kochanek, B., Salim, S., & Philosoph-Hadas, S. (2003, August). Use of methyl jasmonate for suppression of *Botrytis* rot in various cultivars of cut rose flowers. In VIII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants 669 (pp. 91-98).
- Mingyu, S., Fashui, H., Chao, L., Xiao, W., Xiaoqing, L., Liang, C., Zhongrui, L. (2007). Effects of nano-anatase TiO₂ on absorption, distribution of light, and photoreduction activities of chloroplast membrane of spinach. *Biological Trace Element Research*, 118(2), 120-130.
- Monier, M. (1990). Induction of embryogenesis in callus culture. In: Pollard, J.W., Walker, J.M. (eds.), *Plant Cell and Tissue Culture*. 141-148, Humana Press, New Jersey.
- Murashige, T. and Skoog, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Nahed, G. A. A., Lobna, S. T., Soad, M. I. (2009). Some studies on the effect of putrescine, ascorbic acid and thiamine on growth, flowering and some chemical constituents of gladiolus plants at Nubaria. *Ozean J. Appl. Sci*, 2(2), 169-179.
- Nakajima, N., A. Shida, S. Toyama, (1996). Effects of brassinosteroid on cell division and colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts. *Jap. J. Crop. Sci.*, 65: 114-118.
- Nasiruddin, K. M., Begum, R., & Yasmin, S. (2003). Protocorm like Bodies and Plantlet Regeneration from *Dendrobium formosum* Leaf Callus. *Asian Journal of Plant Sciences*.
- Nemhauser, J. L. and Chory, J. (2004). BRING it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), 265-270.
- Oğuz, B., Sarı, A. O. ve Bilgiç , A. (2005). Ege Bölgesinde Yayılış Gösteren Bazı Salep orkidelerinin Üretim Olanaklarının Araştırılması. Proje Sonuç Raporu. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Menemen, İzmir.
- Oh, M.H. and Clouse, S.D. (1998). Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Rep.*, 17: 921-924.

- Önal, K. (1999). Ege Bölgesinde Doğal Yayılış Gösteren *Orchidaceae* familyasına ait bazı türlerin *in vitro* koşullarda üretimleri üzerinde araştırmalar. Turkish J. of Agriculture and Forestry. 23(5):1057-1064.
- Özdener, Y. (1994) *Dactylorhiza urvilleana* (Steudel) Bauman ve *Künkele* ve *D. iberica* (Bieb. Ex Willd) Soo (Orchidaceae) türlerinin köklerinden fungusların izole edilmesi, bu türlere ait tohumların simbiyotik ve asimbiyotik kültür ortamlarında çimlenme ve gelişmesi üzerinde bir araştırma Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Özen, H. Ç. ve Onay, A. (1999). Bitki büyüme ve gelişme fiziolojisi. Dicle Üniversitesi Basımevi. Diyarbakır, 166.
- Özhatay, N. (2000). Europe's medicinal and aromatic plants: their use, trade and conservation. A Traffic Network Report, 12, 31.
- Özhatay, N., Koyuncu, M., Atay, S., & Byfield, A. (1997). Türkiye'nin doğal tıbbi bitkilerinin ticareti hakkında bir çalışma. Doğal Hayatı Koruma Derneği.
- Özkoç, İ. (1991) *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Briq. subsp. *laxiflora* (Soo) Gölz et. Reinhard ve *Orchis laxiflora* Lam.(Orchidacea) tohumlarının simbiyotik ve asimbiyotik kültürlerde çimlenme ve gelişmesi üzerinde araştırılması Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Özkoç, İ. ve Dalcı, M. (1991). Bazı orkide türlerine ait tohumların çimlenmesi üzerine yüzeysel sterilizasyonda kullanılan sodyum hipokloritin etkisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Dergisi, 3(1), 116-122.
- Özsavcı, A. (1995) *Kahramanmaraş bölgesinde doğal yayılış gösteren bazı salep orkidelerinin in vitroda yumru oluşturma yeteneklerinin araştırılması* Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Özzambak, E. and Hepaksoy, S. (1996). Investigations on *In vitro* proliferation of sour cherry cv. Heimanns Rubinweichsel. In III International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 447 (pp. 155-156).

- Palaz, E. B., Özdemir, A., Kaya, Y. (2012). Bazı Salep Orkide Türlerine Ait Tohumların Asimbiyotik Çimlendirilmesi Üzerine Yapılan Araştırmalar, II.Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.293-300, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Pant, B. (2013). Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of Plant Science*, 7(10): 448-467.
- Peterson, R. L., Uetake, Y., Bonfante, P., & Faccio, A. (1996). The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells. *Canadian Journal of Botany*, 74(12), 1861-1870.
- Petrou, N., Petrou, M., Deniz, İ.G., Sezik, E., Georgiadis, C., Gletsos, M. (2016). Current Status and Best Practice Analysis for Greek and Turkish native orchid flora conservation. *Interactive Conservation Platform for Orchids Native to Greece-Turkey (Antalya)*.
- Pierik, R. L. M. (1987, August). In Vitro Culture Of Higher Plants As A Tool In The Propagation Of Horticultural Crops. In *International Symposium on Propagation of Ornamental Plants* 226 (pp. 25-40).
- Pridgeon, A., (1995). *The illustrated encyclopaedia of orchids*.
- Poyraz, H. (2012) *Endemik Erodium somanum'un bitki doku kültürü yöntemi ile mikroçoğaltımı* Yüksek Lisans Tezi, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Qiuming, C., Hui, Y., & Xiaoyan, L. (2008). Effects of salicylic acid on the activities of antioxidant systems in lily plants under high temperature stress. *Journal of China Agricultural University*.
- Ramírez, S. R., Gravendeel, B., Singer, R. B., Marshall, C. R., & Pierce, N. E. (2007). Dating the origin of the *Orchidaceae* from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*, 448(7157), 1042-1045.
- Rao, S.S.R., Vardhini, B.V., Sujatha, E., Anuradha, S. (2002). "Brassinosteroids- a new class of phytohormones", *Current Science*, 82 (10): 1239- 1245.
- Raskin, I. (1995). Salicylic Acid. In: *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Davies (ed.), Kluwer Acad. Pub., London., 188-205 p.

- Rasmussen, H. N., Johansen, B. B., & Andersen, T. F. (1991). Symbiotic *in vitro* culture of immature embryos and seeds from *Listera ovata*. *Lindleyana*, 6, 134-139.
- Rasmussen, H., Andersen, T. F., & Johansen, B. (1990). Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (*Orchidaceae*) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant, Cell & Environment*, 13(2), 171-177.
- Renz, J. and Taubenheim G. (1984). *Orchidaceae*. in: Davis, P.H. et al., Eds. The Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburg University Press, Edinburg. 8: 450552.
- Roy, A. R., Patel, R. S., Patel, V. V., Sajeev, S., & Deka, B. C. (2011). Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): An *In vitro* protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 325-331.
- Rubinowska, K. and Michalek, W. (2009). Influence of putrescine on leaf senescence of *Helianthus annuus* L. potted plants. *Annals of Warsaw University of Life Sciences- SGGW. Horticulture and Landscape Architecture*, 30.
- Rubluo, A., Chavez, V., & Martinez, A. (1989). *In vitro* seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (*Orchidaceae*) in its natural habitat. *Lindleyana*, 4(2), 68-73.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *The plant cell*, 8(10), 1809.
- Safavi, K. (2014). Effect of titanium dioxide nanoparticles in plant tissue culture media for enhance resistance to bacterial activity. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci*, 3, 163-166.
- Safavi, K., Mortazaeinezhad, F., Esfahanizadeh, M., & Asgari, M. J. (2011). *In vitro* antibacterial activity of nanomaterial for using in tobacco plants tissue culture. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 79, 372-373.
- Sakhanokho, H. F. and Kelley, R. Y. (2009). Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red'). *African Journal of Biotechnology*, 8(8).
- Saljooghian, Pour M., Omid, M., Majidi, I., Davoodi, D. and Ahmadian, P. (2010). *In vitro* plantlet propagation and microtuberization of meristem culture in some of wild and commercial potato cultivars as affected by NaCl. *African J. Agric. Res.* 5 : 268-74.

- Sandal, G. (2009) *Doğu akdeniz bölgesi'nde yetişen orkideler ve yetiştirme ortamı nitelikleri ile tehdit faktörlerinin araştırılması* Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Saniewski, M. and Wegrzynowicz-Lesiak, E. (1994). Methyl jasmonate-induced leaf abscission in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Plant Bioregulators in Horticulture* 394, 315-324.
- Sardoei, A. S., Mohammadi, G. A., & Rahbarian, P. (2013). Interaction effect of salicylic acid and putrescine on vase life of cut *Narcissus* flowers. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(12), 1569-1576.
- Sardoei, A.S., Shahdadneghad, M., Yazdi, M.R., S Gholamshahi, S. (2014). Growth Response of *Petunia hybrid* to Zinc Sulphate and Salicylic Acid. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research* Volume 2, Issue 3, 2014: 622-627.
- Sasaki, H. (2002). Brassinolide promotes an adventitious shoot regeneration from cauliflower hypocotyl segments. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 71: 111-116.
- Sasse, J. M. (1997). Recent progress in brassinosteroid research. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 696-701.
- Sasse, J.M. (2003). “Physiological actions of brassinosteroids: an update”, *Journal of Plant Growth Regulation*, 22: 276–288
- Savaldi-Goldstein, S. and Chory, J. (2006). “Brassinosteroids”, Editors: Taiz, L., and Zeiger, E., “Plant Physiology, Fourth Edition”, ISBN: 0878938567, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 617-634
- Sazak, A. (2004) *Bazı orkide türlerine ait tohumların simbiyotik ve asimbiyotik olarak çimlendirilmesi ve fide gelişimi* Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Seven, S. (2017) *İspanak (Spinacia oleracea L.) bitkisinde tuz stresi ile epibrassinolid arasındaki ilişkinin araştırılması* Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Sevindik, B., & Mendi, Y. Y. (2016). Somatic embryogenesis in *Crocus sativus* L. In **In Vitro** Embryogenesis in Higher Plants (pp. 351-357). Humana Press, New York, NY.

- Sezik, E. (1967) *Türkiye'nin salepgilleri, ticari salep çeşitleri ve özellikle muğla salebi üzerinde araştırmalar* Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Sezik, E. (1969). Muğla civarında salep elde edilen bitkilerin mahalli isimleri. Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University, 5, 77-79.
- Sezik, E. (1984). Orkidelerimiz, Sandoz Kültür Yayınları.
- Sezik, E. (1988). Trakya'da yetişen Orchidaceae Türleri. Trakya florası sempozyumu bildiri özetleri. Trakya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi. 28–29 Nisan, Edirne.
- Sezik, E. (1991). Unknown Side of Turkey- An Orchids Paradise, Imagine, 12, 11-15..
- Sezik, E. (2002). Turkish orchids and salep. Acta Pharmaceutica Turcica, 44, 151-157.
- Sezik, E. ve Baykal, T. (1988). Maraş Salebinin Menşei ve Maraş Civarının Orkideleri. Tübitak Temel Bilimler Araştırma Grubu Proje No: TBAG, 664.
- Sezik, E. ve Özer, B. (1983). Kastamonu Salebinin Menşei ve Kastamonu Civarının Orkideleri. Tübitak Research Project, Temel Bilimler Araştırma Grubu Projesi, TBAG, 424.8
- Sezik, E., İşler, S., Güler, N., Orhan, Ç., Aybeke, M., Deniz, İ. G., & Üstün, O. (2007). Salep ve Orkidelerin Tahribi, TÜBİTAK Araştırma Projesi Raporu. TBAGÇ-SEK/23 (103T008), Ankara.
- Shahbaz, M. and Ashraf, M. (2007). Influence of exogenous application of brassinosteroid on growth and mineral nutrients of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions. Pakistan Journal of Botany, 39(2), 513.
- Sharma, N. and Chandel, K. P. S. (1996). *In vitro* conservation of *Orchis latifolia*: a threatened, medicinal terrestrial orchid. Indian Journal of Plant Genetic Resources, 9(1), 109-113.
- Sheelavantmath S.S., Murthy H.N., Pyati A.N., Ashok Kumar H.G., Ravishanker B.V. (2000). *In vitro* propagation of the endangered orchid, *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. through rhizome section culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60, p. 151- 154.
- Sinha, P. and Roy, S. K. (2004). Regeneration of an indigenous orchid, *Vanda teres* (Roxb.) Lindl. through *in vitro* culture. Plant Tissue Culture, 14(1), 55-61.

- Smith, T. A., Bagni, N., & Fracassini, D. S. (1979). The formation of amines and their derivatives in plants. In (EJ Hewitt, CV Cutting eds)" Nitrogen Assimilation of Plants.
- Snow, R. (1985). Improvements in methods for the germination of orchid seeds. American Orchid Society bulletin (USA).
- Stehmann, J. R. (2009). Plantas da floresta Atlântica (Vol. 1). R. C. Forzza, A. Salino, M. Sobral, D. P. da Costa, & L. H. Y. Kamino (Eds.). Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Subramaniam, G. and Taha, R. M. (2003). Morphogenesis of *Cymbidium atropurpureum In-Vitro*. Malaysian Journal of Science, 22(1), 1-5.
- Surgun, Y., Yılmaz, E., Bekir, Ç. Ö. L., Bürün, B. (2012). Sixth Class Of Plant Hormones: Brassinosteroids. Journal of Science in Celal Bayar University, 8(1), 27-46.
- Süberoğlu, N. (1987) *Saleplerin tohumla üretilmeleri* Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
- Tamer, C. E., Karaman, B., & Çopur, O. U. (2006). A traditional Turkish beverage: Salep. Food Reviews International, 22(1), 43-50.
- Tatte, S., Singh, A., & Ahlawat, T. R. (2015). Effect of polyamines on postharvest quality and vasselife of rose var. Samurai. The Bioscan, 10(2), 675-678.
- Tekinşen, K. K. ve Güner, A. (2009). Kahramanmaraş yöresinde yetişen saleplerin kimyasal bileşiminin ve bazı fizikokimyasal niteliklerinin araştırılması. SÜ BAP Proje, (06401061).
- Telcioglu, A. ve Kayacier, A. (2007). The effect of sweeteners and milk type on the rheological properties of reduced calorie salep drink. African Journal of Biotechnology, 6(4).
- Tutar, M., Çiçek, F., Karık, Ü. ve Sarı, A. O. (2013). Ege Bölgesinde Salep Elde Etmede Yaygın Olarak Kullanılan Orkideler. Ekoloji 2013 Sempozyumu Bildiri Özetleri Kitabı, 2-4 Mayıs, Tekirdağ, s.201.
- Ueda, J. and Saniewski, M. (2006). Methyl jasmonate-induced stimulation of chlorophyll formation in the basal part of tulip bulbs kept under natural light conditions. Journal of fruit and ornamental plant research, 14, 199.

- Vahid, S., Hossein, J., & Mohammad, S. Y. (2011). A comparison of various models for obtaining the intrinsic viscosity of salep gum and sweeteners mixture in dilute solutions. *International Food Research Journal*, 18(4), 1457.
- Valletta, A., Attorre, F., Bruno, F., & 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 der Krieken, W. M., Kodde, J., Visser, M. H. M., Blaakmeer, A., Groot, K. D., Leegstra, L., & Tsardakas, D. (1997). Increased induction of adventitious rooting by slow release auxins and elicitors. In *Biology of root formation and development* (pp. 95-104). Springer, Boston, MA
- Van Waes, J. M. and Debergh, P. C. (1986). *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*, 67(2), 253-261.
- Warren, R. (1981). Orchids from seed-Part II: Sowing the seed, *The Orchid Review*, 89, 149-151.
- Whigham, D. F. and Willems, J. H. (2003). Demographic studies and life-history strategies of temperate terrestrial orchids as a basis for conservation. *Orchid conservation*.
- Withner, C. L., Nelson, P. K., & Wejksnora, P. J. (1974). The anatomy of orchids. *The orchids: scientific studies*, 267-347.
- Wotavová-Novotná, K., Vejsadová, H., & Kindlmann, P. (2007). Effects of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species. *Biologia plantarum*, 51(1), 198-200.
- Xiao-li, P., J ing-ping, R. A. O., & Yan-long, Z. (2007). Effect of exogenous salicylic acid on vase life of cut flowers of 'Prato'lily and related physiological influence. *Acta Horticulturae Sinica*, 34(1), 189.
- Yararbaş, R. T. (2008) *Bazı orkide türlerinin in vitro koşullarda çoğaltılması, çiçeklenmesi* Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yıldız, K. ve Yılmaz, H. (2016). Jasmonlar (Jasmonik asit ve Metil jasmonat) Yeni Bir Bitkisel Hormon Grubu Olabilir Mi?. *Derim* , 18 (2), 89-95.

- Yılmaz, G, E. ve Bürün, B. (2015). 24-Epibrassinolid Ön Uygulaması Yapılmış Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Tohumlarının NaCl Stresi Koşullarında Çimlenmesi ve Fide Gelişimi. Afyon Kocatepe University Journal of Science & Engineering, 15(3).
- Yokota, T. (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. Trends in plant science, 2(4), 137-143.
- Zheng, L., Hong, F., Lu, S., & Liu, C. (2005). Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. Biological trace element research, 104(1), 83-91.
- Zheng, L., Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C., Hao, H., Xiaoqing, L., Fashui, H. (2008). Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. Biol Trace Elem Res 121:69–79. doi:10.1007/s12011-007-8028-0
- Zullo, M. and Adam, G. (2002). Brassinosteroid phytohormones: structure, bioactivity and applications. Brazilian Journal of Plant Physiology, 14, 143-181.

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİLİMSEL ETİK BEYANI

“SALEP ORKİDELERİNİN *In vitro* ÇOĞALTIMINDA BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN ETKİSİ” başlıklı Yüksek Lisans tezindeki bütün bilgileri etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiz atıf yaptığımı bildiririm. İfade ettiklerimin aksi ortaya çıktığında ise her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

Merve KABAKCI

... / ... / ...

ÖZ GEÇMİŞ

Soyadı, Ad : KABAĞCI, Merve

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi (Yıl)
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2018

BURLAR ve ÖDÜLLER

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
-----	-----------	-------

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

RESEARCHES IN LANDSCAPEAND ORNAMENTAL PLANTS, Bölüm adı:
(CHAPTER: 10 THE EFFECTS OF EPIBRASSINOLIDE AND SOMEOTHER PLANT
GROWTH REGULATORS ONMICROPROPAGATION OF *Limonium sinuatum* (L.) Mill.
) (2019)., EKEN LEYLA, KABAĞCI MERVE, DAYAR İSMAİL, ŞİRİN UĞUR,
ÖZZAMBAK MUSTAFA ERCAN, Gece Kitaplığı , Editör:MURAT ZENCİRKIRAN,
Basım sayısı :1, ISBN:978-625-7958-27-1, İngilizce(Bilimsel Kitap), (Yayın No: 5859854)

2. PROJELER

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

KABAKCI MERVE, EKEN LEYLA, ŞİRİN UŐUR (2019). Bazı Bitki Eterik Yağlarının Kesme iek *Lilium sp.*'da Vazo mrü Üzerine Etkisi.. VII. Süs Bitkileri Kongresi ve I. Uluslararası Süs Bitkileri Kongresi (zet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:5899686)

KABAKCI MERVE, EKEN LEYLA, DAYAR İSMAİL, ŞİRİN UŐUR, ÖZZAMBAK MUSTAFA ERCAN (2019). Epibrassinolide ve Diğer Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *Limonium sinuatum* (L.) Mill 'un Mikrooğaltımına Etkileri.. VII. Süs Bitkileri Kongresi ve I. Uluslararası Süs Bitkileri Kongresi (zet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:5900280)

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

