

KONYA GIDA VE TARIM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL ÜRETİM VE TEKNOLOJİLERİ

ANABİLİM DALI

PHALAENOPSIS SP. ORKİDELERİNİN

MİKROÇOĞALTIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ee Ö***N**

KONYA

MART, 2023

KONYA GIDA VE TARIM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PHALAENOPSIS SP. ORKİDELERİNİN

MİKROÇOĞALTIMI

Ee Ö***N**

Danışman: Prof. Dr. A**y S****N**

Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Anabilim Dalı

Meram-KONYA

MART, 2023

E**e Ö***N tarafından hazırlanan “**Phalaenopsis sp. Orkidelerinin Mikroçoğaltımı**” adlı bu çalışma, 27/03/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile BİTKİSEL ÜRETİM VE TEKNOLOJİLERİ ANABİLİM DALI’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. A****y S****N
Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi

Başkan : Doç. Dr. M*****a Y*****R
Selçuk Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi D***k K***İ H*****H
Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. H. Ö***n S*****E

Anabilim Dalı Başkanı V.

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. S****r B****L

Enstitü Müdür V.

ÖZET

PHALAEENOPSIS SP. ORKİDELERİNİN MİKROÇOĞALTIMI

Ö***N, E**e

Yüksek Lisans Tezi, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. A****y S****N

Mart 2023, 53 sayfa

Bu tez çalışmasında, Phanaelopsis sp. bitkisi tohumlarının in vitro çimlenmesi üzerine temel besi ortamları ve giberellik asit ile sitokininler grubunda yer alan bazı büyüme düzenleyicilerinin etkisi tek grup öntest- sontest modeli ile araştırılıp sonrasında in vitroda oluşturulan fidelerden farklı eksplantlar alınarak doğrudan organogenez ile bu bitkilerin in vitro çoğaltımı amaçlanmıştır. Knudson C, Lindemann, Orchimax, aktif kömürlü Orchimax ve Murashige & Skoog besi ortamları ile 6-BA, Kinetin, AHS, TDZ, 2-IP ve GA₃ bitki düzenleyicilerinin çimlendirme üzerine etkisi tespit edilmiştir. Çimlenen fidelerden alınan eksplantlar daha sonrasında doğrudan organogenez ile üretilerek en uygun doku parçası ve bitki büyüme düzenleyicisi bulunmuştur. Bunun sonucunda en kısa sürede çimlenmeyi (gün) aktif kömürlü Ochimax temel besi ortamının (OM+) verdiği görülmektedir. Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri içerisinden artan TDZ derişimi ile çimlenme yüzdesi arasında negatif ilişki gözlenmiştir. TDZ hariç diğer bitki büyüme düzenleyicilerinin derişime bağlı pozitif bir korelasyonu olmakla birlikte çimlenme üzerinde kontrole göre istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Doğrudan organogenez çalışmalarında en verimli besi ortamının 5.0 ppm 6-BA ile desteklenmiş ortam olduğu görülmüştür. TDZ içeren ortamlardan düşük verim elde edilmiştir. Özellikle 1.0 ppm TDZ'nin kontrol grubuna göre de daha düşük verim sağladığı gözlenmiştir. Kök uzaması bakımından tüm sitokininler ve derişimleri kontrole göre olumlu etki göstermiştir. Ancak bu büyüme düzenleyicilerinin kendi aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: Phalaenopsis, mikroçoğaltım, direkt organogenez

ABSTRACT

MICROPROPAGATION OF PHALAENOPSIS ORCHIDS

O***N, E**e

Master of Science Thesis, Department of Plant Production and Technologies

Supervisor: Prof. Dr. A****y S****N

March 2023, 53 pages

In this study, the effects of basic nutrient media and some growth regulators in the group of gibberellic acid and cytokinins on in vitro germination of plant seeds were investigated with a single group pretest-posttest model. The effects of Knudson C, Lindemann, Orchimax, Orchimax with activated charcoal and Murashige & Skoog media and 6-BA, Kinetin, AHS, TDZ, 2-IP and GA3 plant regulators on germination were determined. The explants taken from the germinating seedlings were then produced by direct organogenesis and the most suitable tissue fragment and plant growth regulator were found. As a result, it is seen that Ochimax basic nutrient medium (OM+) with activated charcoal gives germination in the shortest time (days). A negative correlation was observed between increasing TDZ concentration and germination percentage among the plant growth regulators used. Except for TDZ, other plant growth regulators had a positive correlation depending on the concentration, but there was no statistical difference on germination compared to the control. In direct organogenesis studies, it was observed that the most productive medium was supplemented with 5.0 ppm 6-BA. Low efficiency was obtained from media containing TDZ. Especially, 1.0 ppm TDZ was observed to provide lower efficiency than the control group. In terms of root elongation, all cytokinins and their concentrations showed a positive effect compared to the control. However, the difference between these growth regulators was not statistically significant.

Keywords: Phalaenopsis, micropropagation, direct organogenesis

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans sürecim boyunca, tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesi süreçlerinde rehberliği, desteği, sağladığı katkılar ve birlikte geçirdiğimiz tüm değerli zaman için yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam Prof. Dr. A****y S****N'e

Ders dönemi ve çalışmalarım esnasında yardım ve desteklerini hissettiğim, bilimsel araştırma ortamı ve ilhamı sağlayan Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Anabilim Dalı'ndaki saygı değer hocalarıma,

Arkamda desteğini, güvenini ve sevgisini her zaman hissettiğim sevgili aileme ve dostlarıma sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

E**e Ö***N

Mart-2023

YEMİN METNİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “PHALAENOPSIS SP. ORKİDELERİNİN MİKROÇOĞALTIMI” adlı çalışmanın tarafımdan bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve bunu onurumla doğrularım.

Mart, 2023

E**e Ö***N

İmza

İÇİNDEKİLER	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
YEMİN METNİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	4
2.1. Orchidaceae (Salepgiller veya Orkidegiller)	4
2.2. Phalaenopsis sp.....	7
2.2.1. Phalaenopsis sp. Çevresel Etkiler.....	11
2.3. Bitki Doku Kültürü.....	14
2.4. Mikroçoğaltım	18
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. Bitki Materyali.....	25
3.2. Temel Besi Ortamları	26
3.3. Yöntem	26
3.3.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Belirlenmesi	26
3.3.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması	26
3.3.3. Tohumların Canlılık Yüzdelerinin Belirlenmesi	27
3.3.4. Aktif kömür tozu	29
3.4. Kapsüllerin sterilizasyonu	29
3.5. İn Vitro Kültürlerin Başlatılması.....	29
3.6. Phalaenopsis sp. Tohumlarının İn Vitro Çimlendirilmesi.....	29
3.7. Farklı Besi Ortamlarının Tohumların Çimlenmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	30
3.8. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Tohumların Çimlenmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	30
3.9. Eksplantlardan Doğrudan Organogenezle Mikroçoğaltım	32
3.10. İstatistik Analizleri	32
4. BULGULAR	33
4.1. Tohumların Canlılık Yüzdeleri.....	33
4.2. Temel Besi Ortamlarının <i>in vitro</i> Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	33
4.2.1. Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin <i>in vitro</i> Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkileri.....	34
4.3. Sürgün Oluşturma Çalışmaları	35

4.3.1. Sürgün Ucu Eksplantlarından Doğrudan Organogenez.....	36
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	41
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	53



SİMGELER ve KISALTMALAR

2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetikasit
6-BA	6-Benziladenin
2-İP	2-İzopentiladenin
°C	Derece Sembolü
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
GA3	Giberellik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IAA	İndol-3-asetikasit
IBA	İndol-3-bütirikasit
KCM	Knudson C besi ortamı
KİN	Kinetin
LM	Lindemann besi ortamı
-OM	Orchimax aktif kömürsüz besi ortamı
+OM	Orchimax aktif kömürlü besi ortamı
MS	Murashige and Skoog besi ortamı
½ MS	Yarı kuvvetteki Murashige and Skoog
m ²	Metre kare
ml	Mililitre
mm	Milimetre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
mg	Miligram
µmol s ⁻¹ m ²	Metrekareye bir saniyede düşen mikromol cinsinden ışık intensitesi
NAA	1-Naftalinasetik asit
PBY	Protokorm benzeri yapı
TDZ	Thidiazuron
VW&DB	Van Waes&DeBergh

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Phalaenopsis afrodit</i>	8
Şekil 2.2 <i>Phalaenopsis amabilis</i>	8
Şekil 2.3. <i>Phalaenopsis luddemanniana</i>	9
Şekil 2.4. <i>Phalaenopsis parishii</i>	9
Şekil 2.5. <i>Phalaenopsis schilleriana</i>	10
Şekil 2.6. <i>Phalaenopsis lobbii</i>	10
Şekil 2.7. <i>Phalaenopsis mannii</i>	11
Şekil 2.8. <i>Phalaenopsis amboinensis</i>	11
Şekil 2.9. Mikroçoğaltım yöntemiyle çimlendirilen ve gelişen bitkicikler.....	13
Şekil 2.10. Doku kültürü ortamında yetişen <i>Phalaenopsis</i> sp. fideleri.....	17
Şekil 2.11. Orkide tohumlarının in vitro ortamdaki ilerleme aşamaları.....	20
Şekil 3.1. Döllenen sonra oluşan tohum taslakları	25
Şekil 3.2. Tohum kapsülünün içinde bulunan tohumlar.....	26
Şekil 3.3. Orkide tohumlarının canlılık testi sonrası görünüşleri. Turuncu-kırmızı renkte boyananlar canlı, diğerleri canlılığını kaybetmiş tohumları göstermektedir... 27	27
Şekil 3.4. Orkide tohumlarının çimlenmesi	30
Şekil 3.5. OM- kültür ortamında çimlenen tohumlar	31
Şekil 3.6. OM+ kültür ortamında çimlenen tohumlar.....	31
Şekil 3.7. OM+ kültür ortamında büyüyen fideler.....	31
Şekil 3.8. Gelişen bitkiciklerden eksplant kesimi	32
Şekil 4.1. Sürgün eksplantlarının aktarımı.....	36
Şekil 4.2. Eksplantların kültür ortamında gelişimi.....	36
Şekil 4.3. Yaprak eksplantlarının durumu.....	36
Şekil 4.4. Sürgün eksplantlarının gelişimi	36
Şekil 4.5. Sürgün eksplantlarının uzaması	37
Şekil 4.6. Doku kültürü ortamında yetiştirilen ve dış ortama aktarılmaya hazır fideler.....	39
Şekil 4.7. Kültür ortamında gelişimi tamamlayan fide	39
Şekil 4.8. Mikroçoğaltım ile gelişen ve dış ortama aktarılacak fideler.....	40
Şekil 4.9. Dış ortama aktarılan fideler.....	40
Şekil 4.10. Dış ortamda büyüyen orkideler.....	40

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Yaygın kullanım alanları ve etkilerine göre bitki büyüme düzenleyicilerin sınıflandırılması.....	16
Tablo 3.1. Çimlendirme aşamasında kullanılan temel besi ortamları ve içerikleri.....	28
Tablo 3.2. Çimlendirme, mikroçoğaltım ve köklendirmede kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri.....	29
Tablo 4.1. Phalaenopsis sp. tohumlarının farklı besi ortamlarındaki çimlenme yüzdeleri ve süreleri	33
Tablo 4.2. Bazı büyüme düzenleyicilerinin Phalaenopsis tohumlarında çimlenme süresi ve çimlenme oranına etkileri	35
Tablo 4.3. Bitki büyüme düzenleyicilerinin Phalaenopsis sürgün ucu eksplantlarında sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri	38

1. GİRİŞ

Yeryüzündeki hayatın ve canlılığın devamını sağlayan bitkiler, güneş enerjisini fotosentezle kullanılabilir enerjiye dönüştürürler. Gıda, ilaç sektörü, kozmetik, giyim gibi birçok alanda ham madde olarak kullanılmaktadır. Bitkiler görüntüleri, kokuları ve renkleriyle de hayatımızı güzelleştiren ve daha yaşanabilir hale getiren canlılardır (Bektaş, 2014). Bitkilerin yokluğunda, insanlar ve diğer canlı organizmalar canlılığın gerekliliği biçiminde yaşayamazlar (Jamshidi-Kia vd., 2018). Hartmann, (2014) Bitkilerin yetiştirilip çoğaltılması, insanlığın birincil uğraşlarından biridir. Bu uğraş zamanımızdan on binlerce yıl önce evcil bitkileri ve hayvanları yetiştiren kişiler tarafından başlatılıp dünya üzerinde medeniyet olarak adlandırılan insan egemenliğini ortaya çıkarmıştır. Günümüzde beş önemli uğraşı bulunmaktadır;

- Belirli özelliklerin seçilmesi ve geliştirilmesi.
- Bitkileri üretme ve koruma.
- Verimi yükseltmek için daha kontrollü koşullar altında büyüme.
- Mahsul ürünlerini koruyarak uzun süreli kullanım ve diğer alanlara nakliye.
- Mahsulün dönüştürülmesi ve korunması.

Bitkiler dünyasında, yaşam kalitesini artırarak insanların sağlık ve psikolojilerine etkisi yüksek olan süs bitkileri mühim bir sektördür. Uzun ömürlü olmaları, estetik görünüşleri ve kokuları ile kullanıldıkları alanları daha canlı hale getirerek doğa ile iç mekanların bağını kurmaktadır (Akça, 2021).

Gürsan ve Erkal, 1998; akt. Yazgan vd., (2005) Süs bitkileri, genel kullanım alanlarına göre dört ana sınıfa ayrılmaktadır;

- Çiçekler
- Kesme Çiçekler
- Kesme Yeşillikler
- Saksılı Bitkiler

Yüzyıllardır görsel ve fonksiyonel olarak kullanılan süs bitkileri, günümüzde şehirleşmenin yarattığı olumsuzluklardan ve doğal yaşamdan uzaklaşmanın sonucunda daha yaşanılabilir alanlar oluşturmak ve ülkelerin ekonomik gelişimlerinde de ticari bir alan olarak kullanılmaktadır (Korkut vd., 1995; akt. Yazgan, vd., 2005). Londra, Paris, Berlin, Amsterdam, New York, Tokyo gibi şehirler ve çevrelerinde başlayan ticari süs bitkisi üretimi zamanla faaliyet alanları artarak hızla büyümüştür. Günümüzde dahi uygulanan temel bilgiler bu artışın sonucunda yapılan araştırma ve geliştirme çalışmalarının sonucunda meydana gelmiştir (Karagüzel vd., 2010). Pazarlama alanında süs bitkisi üretimi 1900'lı yılların son çeyrek diliminden itibaren neredeyse tüm ulusların gündeminde. Enternasyonel taşımacılığın gelişmesi ile süs bitkilerine yatırımlar artarak cazip bir sektör oluşturulmuştur (Uzun, 1991; akt. Genç, 2020). Orkidelerin, dünya çiçekcilik ticaretinde hem saksı bitkisi hem de kesme çiçek olarak %10'unu oluşturduğu değerlendirilmektedir. Özellikle Phalaenopsis bitkisi küresel üretim ve tüketim pazarlarında 500 milyon ABD dolarından yüksek bir paya sahiptir (Yuan vd., 2021). Çiçeklerinin renkleri, boyutları, şekilleri ve kokuları sebebiyle orkideler çok popüler bitkilerdir ve ticari olarak orkidelere olan talep giderek artmaktadır. Orkide tohumlarının çimlenebilme kabiliyetleri vahşi doğada oldukça düşüktür. Dolayısıyla bahçecilik sektörünün talebini karşılamak için in vitro çimlenmenin yapılması gerekmektedir (Park, Huh, & Paek, 2018). Dünya üzerinde çok geniş yayılışa sahip Orchidaceae familyasının 800 civari cinsi ve 30.000'e yakın türü belirlenmiştir (Arditti & Ghani, 2000). Asparagales takımına ait Orchidaceae (Salepgiller veya Orkidegiller) çiçekli bitkilerin ikinci büyük familyasıdır. 2018 yılında yapılan çalışmada Dünya'da yaklaşık 880 cins ve 29.199 tür bulunduğu ve buna her sene 300 yeni tür eklendiğinden tür sayısının 31.000 olması beklenmektedir (Hinsley et al., 2017). Kokuları, renkleri, çiçeklenme şekilleriyle çeşitlilik gösterirler ve çoğunluğu tropik bölgelerde yayılmış, subartik ve soğuk ılıman bölgelerde az yayılmışlardır (Simpson, 2019). Süs bitkisi olmakla beraber polisakkaritler ve alkaloidler gibi kimyasal metabolitler açısından da oldukça zenginlerdir. Bu nedenle dünyanın çeşitli bölgelerinde gıda ve ilaç sanayisinde de kullanımları vardır (Aytar ve Kömpe, 2021).

Bu tez çalışmasında, bir orkide türü olan Phanaelopsis sp. bitkisi tohumlarının in vitro çimlenmesi üzerine temel besi ortamları ve giberellik asit ile sitokinler grubunda yer alan bazı büyüme düzenleyicilerinin etkisi araştırılmış, sonrasında in vitroda oluşturulan fidelerden farklı eksplantlar alınarak doğrudan organogenez ile bu bitkilerin in vitro çoğaltımı hedeflenmiştir.



2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Bu bölümde tez çalışmasında yararlanılan ve tezin gelişiminde başvuru kaynakların derlemeleri yer almaktadır.

2.1. Orchidaceae (Salepgiller veya Orkidegiller)

Kökenleri 120 milyon yıl öncesine dayanan orkideler, yazılı kaynaklara bakıldığında M.Ö. 4000 yılına uzanan geçmişe sahiptir. M.Ö. 2800'lü yıllar itibariyle Çin'de bitkisel ilaç kaynağı olarak ayrıca Hintliler tarafından vedik dönemde (M.Ö 2000- M.Ö. 600) tıbbi ve afrodizyak etkilerinden dolayı kullanılmıştır. Orchidaceae (Salepgiller veya Orkidegiller) familyası özellikle hayvan tozlaşmasıyla bağlantılı çok ilginç çiçek polimorfizmine sahiptir (Dormont et al., 2020). Tozlayıcılar için çiçek içinde nektar içermemesine rağmen tüm orkide türlerinin nerdeyse üçte biri besin aldatmacası yaparak tozlayıcıları kendisine çekmektedir. Bununla birlikte bazı orkide türleri tozlayıcıların cinsel yapılarının taklit ederek ve kendilerini farklı bitkilerin çiçek sinyallerine benzeterek bunu yapmaktadırlar (Jersáková, Johnson, & Kindlmann, 2006). Bu nedenle orkidelerin çiçek morfolojisinde tür içi varyasyonlar oldukça yüksektir (Schiestl, 2005). Orkide türlerinin çoğu bu şekilde aldatıcı polimorfizmler göstermektedirler (Tollsten & Bergström, 1989). Çiçekli bitkilerin en geniş ve çeşitli ailelerinden biri olan orkideler doğadan aşırı toplanması ve habitat kaybından dolayı tüm çiçekli bitkiler içinde en çok tehdit altında olan ailelerdendir (Liu, Wang, Finnegan, & Gao, 2020). Orkidelerin fazla sayıda tür içermesi, zorunlu veya fakültatif biyotik etkileşimiyle kompleks yaşam geçmişine sahip olmaları ve bunların ortaya çıkardığı güçlüklerden dolayı bitki koruma için önemlidir. Orkide türlerinin hepsi çimlenme için mikorizal mantarlara ihtiyaç duyar. Çoğu orkidenin tozlaşması için hayvanlara ihtiyaç varken epifitik ve saprofitik orkidelerin büyüüp gelişmesi belirli özelliklere sahip ağaç konakçalarına bağlıdır (Fay, 2018). Orkidelerin birçoğu *Rhizoctonia sp.* funguslarıyla simbiyotik ilişkiye girerler (Andersen & Rasmussen, 1996). *Corallorhiza sp.* ve *Neottia sp.* türleri dışında fotosentez yapabilen orkidelerin fungusa olan ihtiyaçları ortadan kalkar. Bu simbiyotik ilişkide orkide tohumları bahar ve yaz aylarında baskınken, sonbahar ve kış aylarında fungus hücreleri baskındır. Tohum çimlenmesi gerçekleştiğinde yumurta şeklinde bir yapı oluşur. Aynı yapı kök

ucundan ve yapraktan gerçekleştirilen rejenerasyon sonucunda da oluşmaktadır. Dolayısıyla bu yapılar “protokorm benzeri yapı” olarak adlandırılır (Kamemoto, Amore, & Kuehnle, 1999). Günümüzde orkide türlerinin yaşayabilmeleri için doğada az sayıda bulunan tohumun çimlenip tuber oluşturması gerekmektedir (Gönülşen vd., 1996). Çok yıllık otsu bitki olan orkideler tuberli ve rizomlu yapıya sahiptirler. Yaprakları basit, pul şeklinde almaşık, iki sıralı, nadiren karşılıklı veya çevrel şeklidir. Çiçekler tek salkım, başak veya bileşik salkımdır ve er dişi, nadiren tek eşeyli, zigomorf, ender olarak aktinomorf simetriye sahiptir. Yapraklar 2 dairede periyant halinde olup her dairede 3 tepal vardır. İç dairenin orta yaprağı çoğunlukla nektaryum oluşturur. Androceum 1-2 stamenden oluşur. Gineceum 3 bileşik karpelli, yumurtalık altta ve tohum taslağı çok sayıdadır. Kapsül halinde olan meyve ufak ve bol tohumludur. Tohumların embriyosu küçük, farklılaşmamış ve besi dokusu (endosperm) yoktur (Bektaş, 2014b). Orkidelerin sahip olduğu tohumlar benzersiz ve çoğu Angiosperm bitkiden farklıdır. Çok ufak ve hafif oldukları için toz tohumlar olarak adlandırılır. Orkide kapsüllerinin (meyve) içinde çok miktarda bulunur. Kapsül içi tohum sayısı 4 milyona kadar ulaşabilmektedir. Orkide tohumlarının bu yapısı suda yüzmelerini ya da havada asılı kalmalarını sağlar (Arditti, 2013). Bu özelliklerinden dolayı orkide tohumlarının in vitro ortamlarda çimlendirilmesi dikkat gerektirir. Orkidelerin büyük bir kısmı basit yapraklı ve çok yıllık bitkiler olup gelişmelerine göre 4 gruba ayrılabilirler (Kreutz, 1998);

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

Ağaç üzerine hava kökleriyle tutunan (epifitik) orkideler, tropikal bölgelerde bulunan diğer bitkilerin üzerinde yaşarlar veya uygun şartların sağlandığı sera gibi ortamlarda ticari olarak üretilebilirler. Süs bitkisi olan bu epifitik orkideler gösterişli çiçeklere sahiptirler. Fotosentez yapabilir ve parazit değildirler (Bektaş, 2014). Farklı kullanım alanları ve buna göre ticari değerleri göz önüne alınarak orkide bitkilerinin değerlendirilmesi faydalı olacaktır.

Öncelikle orkideler süs bitkisi olarak yüksek ekonomik değere sahiptir. Bununla birlikte ilaç ham maddesi ve besin katkı maddesi olarak da değerlendirilmektedir. Bu başlık altında piyasada değerlendirilen orkide türlerinin sayısı binleri bulmaktadır. Bu bitkilerin ticareti yerel, ulusal veya uluslararası düzeyde yasal veya yasadışı da olabilmektedir. Bazılarının doğal olarak yetişmesinden dolayı ekolojik tahribatları, yok olma riskleri de üst düzeydedir. Ancak bu durum yapay olarak üretilip ticareti yapılan süs bitkisi orkidelerden ziyade doğadan toplanan ve farklı amaçlarla kullanılan türler için geçerlidir. Kontrollü olarak büyütülen saksılar ve yapay yolla üretilen kesme çiçekler küresel orkide ticaretinde kullanılırlar. Ticari olarak verilere bakıldığında üretilen orkidelerin büyük çoğunluğunu yapay üretilen orkideler oluşturmaktadır. Phalaenopsis, Cymbidium ve Dendrobium türleri ve hibritleri en değerli orkide türleridir. Singapur, Tayvan, Tayland gibi ülkeler önde gelen ihracatçı orkide üreticileridir. Amerika Birleşik Devletleri, Japonya ve Güney Kore en fazla orkide ithalatı yapan ülkeler arasında yer almaktadır. Orkide ticaretinin hacmi sadece Hollanda'da 500 milyon euro civarındadır (Hinsley, 2018). Süs bitkisi dışında başka kullanımı olan orkideler de vardır. Bu orkideler yenilebilir olarak değerlendirilir. 1300'lü yıllarda üretilen vanilya bunların başını çekmektedir. Ticari olarak üretilen değerli vanilin ve çok miktarda lezzet artırıcı bileşik *Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews* kabuklarından kütleme işlemiyle üretilebilir (Aytar, 2021). Hindistan'da çok popüler bir bitkisel ürün olan Chyavaprash, *Habenaria intermedia* D. Don, *Habenaria edgeworthii* Hook.f. ex Collect ve *Malaxis wallichii* (Lindl.) Deb gibi orkidelerden hazırlanmaktadır (Hossain, 2011). Ülkemizde geleneksel önemi bulunan salepte bazı orkide türlerinden üretilmektedir. 35'ten fazla türün salep yapımında kullanıldığı biliniyor. *Himantoglossum* Spreng., *Ophrys* L., *Orchis* L., *Serapias* L., *Steveniella* Anacamptis Rich., *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski cinsi orkide türleri salep üretiminde en çok kullanılan bitkilerdir (Hinsley, 2018). Geleneksel Çin tıbbında ilaç olarak uygulanan bazı orkidelerde bulunmaktadır. *Gastrodia elata* Blume yumrularından üretilen Tian-Ma, *Bletilla striata* (Thunb.) Rchb. f.'nın yumrularından üretilen Bai-Ji ve *Dendrobium*'dan üretilen Shi-Hu bunlara örnektir (Hinsley, 2018; Aytar, 2021).

2.2. Phalaenopsis sp.

Phalaenopsis, yaklaşık 92 tür ve tescil için kaydedilen 35.129 hibrit ile en bilinen orkide cinsidir (Chia-Chi Hsu, 2022). Karl Ludwig Blume tarafından ilk defa keşfedilen ve Phalaena adında bir kelebeğe benzediğinden dolayı Phalaenopsis (Kelebeğe benzeyen) olarak adlandırılan tür, Dendrobium türleriyle birlikte en önemli orkideler arasında yer alır. Yaygın olarak güve orkidesi olarak adlandırılan Phalaenopsis orkideleri ayrıca küresel çiçek pazarındaki en popüler ve karı en yüksek süs bitkilerindendir (Guo and Lee 2006). Çiçeklerinin güzelliği ve kolay yetiştirilebilmesi bu orkide türlerinin popülerliğini artırmaktadır. Filipinler, Srilanka'nın batısında yer alan tropikal ormanlar ve Asya'nın doğu bölgesi doğal yaşam alanlarıdır. Çiçekleri çeşitli renklerde olup binlerce hibriti üretilen Phalaenopsis ev ortamına uyum sağlayabilmektedir ve yılda 2 kez çiçeklenen çiçekleri 2 ile 6 ay arasında solmadan kalabilmektedir. Epifitik olarak ağaç üzerinde parazit olmadan yaşamakta olup besinlerini yağmur ve ağaç üzerinde biriken besinlerden alırlar (Bektaş, 2014). Phalaenopsis'in iki türü vardır. Birinci tipte yapraklar kalın ve etli, uzun-eliptik ve uçta geniştir. Çiçeklerin yaprakları çanak yapraklardan daha geniştir ve dudakta iki çekici merkez lob ve uzantılar bulunur. Çiçekli gövde 60 cm uzunluğa kadardır ve 15 veya daha fazla çiçek açar. Bu gruba ait türler *Phalaenopsis parishii*, *P. aphrodite*, *P. stuartiana*, *P. schilleriana* ve *P. sanderiana*'dır. İkinci tipte, bitkiler kısa saplıdır ve daha az çiçek açar. Çiçekler, eşit boyutta çanak yapraklar ve taç yapraklarla ve herhangi bir uzantı olmaksızın daha küçüktür. Bu gruba ait türler *Phalaenopsis cormi-cervi*, *P. leuddemanniana*, *P. equestris* ve *P. mannii*'dir.

Phalaenopsis afrodite: Bu türün anavatanı Filipinler'dir. Yaprakların üst yüzü koyu yeşil, alt yüzü mor, obovattır. Çiçeklenme dallı ve kemerlidir. Çiçekler 10 cm çapında, yeşilimsi sarı renktedir ve Ocak-Şubat aylarında üretilir.



Şekil 2.1. *Phalaenopsis afrodit*

Phalaenopsis amabilis: Bu türün anavatanı Java adası, Endonezya, Avustralya ve Yeni Gine'dir. Yapraklar etli, kösele, obovat (ters yumurta şeklinde) ve donuk yeşil renktedir. Çiçeklenme ince, kavisli, 90 cm uzunluğunda ve 6 ila 20 çiçeklidir. Çiçekler 10 cm çapında, saf beyazdır ve Aralık-Ocak aylarında üretilir.



Şekil 1.2. *Phalaenopsis amabilis*

Phalaenopsis luddemanniana: Bu türün anavatanı Filipinler'dir. Yapraklar parlak mumsu sarımsı yeşil, serttir. Çiçek durumu düzensiz zikzak şeklinde, kısa kemerli ve 2 ila 7 çiçeklidir. Çiçekler 3-4,5 cm çapında, kokulu, uzun ömürlü, kremi beyaz renkte, menekşe moru ile işaretlenmiştir. Çiçekler ilkbahar mevsiminde üretilir.



Şekil 2.2. *Phalaenopsis luddemanniana*

Phalaenopsis parishii: Bu tür Kuzey Hindistan bölgesine özgüdür. Yapraklar koyu yeşil, eliptiktir. Çiçek durumu 5 ila 9 çiçekli, salkımlı, 10 cm uzunluğundadır. Çiçekler beyaz, mor lekeli ve sarı dudaklıdır ve Mart-Nisan aylarında üretilir.



Şekil 2.3. *Phalaenopsis parishii*

Phalaenopsis schilleriana: Bu türün anavatanı Filipinler'dir. Yapraklar büyük, koyu yeşil, enine gümüş beyaz benekli bantlarla işaretlenmiştir. Çiçeklenme çok uzun, 90 cm boyunda, dallı, kemerli ve çok sayıda pembe çiçek taşıyor. Çiçekler 7,5 cm çapındadır ve Şubat-Nisan aylarında üretilir.



Şekil 2.4. *Phalaenopsis schilleriana*

Phalaenopsis lobbii: Bu türün anavatanı Doğu Himalaya'dan Çin ve Hindistan'a kadardır. Yapraklar 5-10 cm uzunluğundadır. Çiçeklenme 8-12.5 cm uzunluğunda ve 3 ila 7 çiçeklidir. Çiçekler küçük, 1.2-2.0 cm çapında, beyazdır ve çanak yapraklar taç yapraklardan daha büyüktür. Dudak, küçük beyaz bir şerit ile ten rengindedir. Çiçeklenme zamanı Ocak-Mart aylarıdır.



Şekil 2.5. *Phalaenopsis lobbii*

Phalaenopsis manni: Bu türün anavatanı Doğu Nepal'den Güney Yunnan'a kadardır. Çiçekler koyu kırmızı ve koyu altın sarısıdır, beyaz dudak sarı boğaz işaretleriyle vurgulanır.



Şekil 2.6. *Phalaenopsis mannii*

Epifitik bir orkide olan *Phalaenopsis amboinensis*, kesme çiçek endüstrisinde ticari kullanım için büyük bir potansiyele sahiptir. Doğal olarak yavaş büyüdüğü için vejetatif olarak çoğaltılması zordur. Bu nedenle, doğal popülasyonlarını tehlikeye atmamak için çoğaltma yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Utami E. S. W., & Hariyanto S., (2019).



Şekil 2.7. *Phalaenopsis amboinensis*

2.2.1. *Phalaenopsis* sp. Çevresel Etkiler

Işık; Güve orkideleri dolaylı ışıkta iyi iş çıkarır. Bu nedenle sağlıklı *Phalaenopsis*, ılıman iklimlerin çoğunda iç mekanlarda, pencere eşikleri, güneş odası ve gölgeli seralarda ve yapay ışık altında yetiştirilebilir. Işık ihtiyacı kışın 1000-1500 fit, yazın

ise 800-1200 fit mumdur. Phalaenopsis yapay ışık altında yetiştirilebilir. Phalaenopsis, floresan ışıklar altında 9-12 inç veya 400 watt yüksek yoğunluklu deşarj ışıkları veya yüksek basınçlı sodyum ışıklar altında 4 ila 6 fit büyütülebilir. Phalaenopsis'in şubat ayına kadar büyüyen bir çiçeği yoksa, onu daha fazla ışık alacağı bir yere taşıyın. Doğru ışık miktarının göstergesi, yaprakların koyu yeşil değil sarı-yeşil görünmesidir. Koyu yeşil yapraklar veya eski yapraktan daha uzun ve dar büyüyen yeni yaprak, ışığın çok düşük olduğunu gösterir. Çok fazla ışık yaprakta beyaz, kuru, yanık alanlara neden olur ve kısa çiçek başaklarına sahip olur. Yetersiz ışık, çiçeksiz sulu, sarkık, koyu yeşil yapraklarla sonuçlanır. Bulutlu kış koşullarında yapay ışık takviyesi yapılmalıdır, oysa doğrudan güneş ışığı bitkiye zarar verir, bu nedenle bitkiyi aydınlık bir pencereye yakın yerleştirmek iyidir. Serada 750-1500 ayak mum ışığı mantıklıdır. İç mekanlarda yetiştirilen Phalaenopsis, sıcak ve doğrudan güneş ışığından kaçınmak için Kuzey Doğu penceresine yerleştirilmelidir. Özellikle büyüyen yapraklar ve kökler ve çiçek indüksiyonu için vejetatif aşamada büyümeyi hızlandırmak için daha yüksek ışık yoğunluğu önerilir. Phalaenopsis çiçek açarken düşük ışık yoğunluğunu (100 fit mum) tolere edebilir.

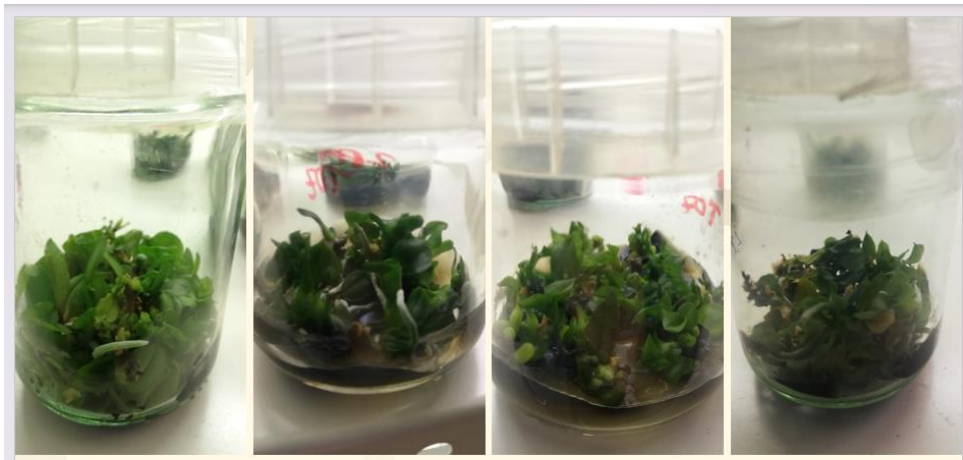
Sıcaklık: Phalaenopsis tropik bir bitkidir ve dolayısıyla 15°C'den düşük ve 32°C ve üzerindeki sıcaklıklardan kaçınılmalıdır. Optimum büyüme için büyüme döneminde ortalama sıcaklığın 26-27°C, çiçeklenme döneminde ise 19-21°C olmasına özen gösterilmelidir. Kış aylarında sıcaklık 18 ila 20°C arasında tutulmalıdır. 18°C'lik bir sıcaklık, yetersiz ışık veya yüksek gündüz sıcaklıkları koşullarında tomurcukların indüklenmesinin arttırılması gerektiğinde özellikle gereklidir. Hava hareketi ne kadar fazla olursa, bitkilerin o kadar sıcak olabileceğini ve sararmadan o kadar yüksek ışık seviyelerini kabul edeceklerini ve çok soğuksa saksının çok ıslak kalacağını ve büyümenin zarar göreceğini unutmayın. Kışın geri kalanında minimum gece sıcaklığının 15°C -20°C olmasına özen gösterilmelidir. 30°C'nin üzerinde sıcak yetiştiriciler olmalarına rağmen, büyümeyi durdurma eğilimindedirler ve bu nedenle havalandırmayı iyileştirerek veya zemini buğulayarak vb. sonuçta yapraklarda sarı çökük noktalara neden olan üşüme yaralanmasına neden olur. Ayrıca, daha düşük sıcaklık (tavsiyenin altında) büyümeyi yavaşlatır ve çiçek açmadan önce tomurcukların düşmesine neden olur. Daha yüksek sıcaklık ve daha yüksek nem bitkiyi etkilemeyecektir. Phalaenopsis, tencerede yeterli su varsa birkaç saat daha yüksek sıcaklığa (30°C ila 35°C) tolere edebilir. Phalaenopsis, tomurcuk gelişimi

sırasında bir ay boyunca soğuk sıcaklık gerektirir. Daha yüksek sıcaklık çiçeklenmeyi geciktirir ve çiçek tomurcuğu gelişimi sırasında 28°C ve üzerinde tomurcuğu durdurur.

Karbondioksit: Phalaenopsis bir CAM (Crassulacean Acid Metabolism) bitkisidir ve geceleri CO₂ alır. CO₂ gereksinimi 600 ila 800 ppm arasında değişir.

Nem: Sıcaklık, nemi etkileyen ana çevresel faktördür. Phalaenopsis %50 veya daha yüksek nem ile daha iyi büyüebilir. Yeterli nemde bitkiler gür bir şekilde büyür ve sağlıklı görünür. Yetersiz nem, bitkinin bodurlaşmasına, tomurcukların erken dökülmesine, kurumuş ve buruşmuş yapraklara, çiçek kenarlarının kağıtsı dokusuna neden olur.

Havalandırma ve Hava sirkülasyonu: Yaprakların kurumasına yardımcı olmak için bitkiler arasında yeterli boşluk bırakmak ve hava hareketine (hafif esinti) izin vermek gerekir. Kapalı bahçelerde hava hareketini sağlamak için bir elektrikli fan kullanmak yaygındır. Bakteri ve mantar sporları bulaşabileceğinden bitkiler durgun havada bırakılmamalıdır. Doğal havalandırmanın iyileştirilmesi mümkün değilse, sıcak günlerde sıcaklığı düşürmek ve soğuk gecelerde bitkileri kurutmak için fanlar sürekli olarak kullanılmalıdır. Yetiştirme ortamındaki hava hareketi, iyi bir büyüme ve hastalık ve zararlıların daha az istila edilmesini sağlar. Tavan ve salınımlı fanlar, hobi seralarında veya kapalı yetiştirme alanlarında hafif hava akışı sağlamak için etkilidir. Her ikisi de bitkileri aşırı kurutmadan sürekli değişen hava akış düzeniyle geniş alanları kapsayabilir.



Şekil 2.8. Mikroçoğaltım yöntemiyle çimlendirilen ve gelişen bitkicikler

2.3. Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü çalışmalarını ilk kez bilim insanı Gottlieb Haberlandt bilime kazandırmıştır. Tüm bir bitki, doku, organ gibi kısımlardan aseptik şartlarda, yapay besi ortamı kullanılarak yeni bir bitki, doku veya bitkisel metabolitlerin üretilmesi amaçlanmaktadır. Doku kültürünün temel amaçları arasında yeni çeşit geliştirmek ve var olan çeşitlerde genetik varyabilite oluşturmak yer almaktadır. Bu sebeple genetik iyileştirme alanında bitki doku kültürünün önemli bir yeri vardır. Diğer bir taraftan çoğaltılması zor olan türlerin tekrar üretilmesi ve kaybolan türlerin muhafazasında doku kültürü uygulamaları kullanılmaktadır (Babaoğlu, 2001).

Bitki rejenerasyonu doku kültüründe kullanılan genetik iyileştirmelerde temel sistemdir. Kültüre alınan hücrelerin özelliklerine göre üç ayrı kısımda incelenmektedir;

- 1) Organize olmuş meristematik hücreleri ihtiva eden somatik dokulardan rejenerasyon
- 2) Meristematik olmayan somatik hücrelerden rejenerasyon
- 3) Mayoz bölünme geçirmiş gametik hücrelerden rejenerasyon

Birinci rejenerasyonda donör bitkiye benzer olan hücreler uç ve yan meristemlerden alınarak çoğaltılır. İkinci rejenerasyonda doğrudan bitkiden kesilmiş olan eksplanttan alınan belirli somatik hücrelerin bitki büyüme düzenleyicileriyle (oksin ve sitokinler) bölünerek organları ve bitkiyi (doğrudan organogenez) oluşturması veya tek bir somatik hücrenin devamlı bölünüp embrioyu ve sonrasında bütün bir bitkiyi oluşturması (doğrudan somatik embriyogenesis) şeklinde olmaktadır. Diğer bir taraftan her iki rejenerasyonda bir kallus, proto-kallus veya hücre süspansiyonu oluşumu devamında meydana gelebilir (dolaylı rejenerasyon). Üçüncü ve son olarak kromozom sayısının yarısı bulunan hücrelerden gelişen doğrudan veya dolaylı bitki rejenerasyonudur. Donör bitkinin sahip olduğu kromozom sayısının yarısı kadar kromozoma sahip sterilize olan haploid bitkiler elde edilir (Babaoğlu, 2001).

Bitki doku kültüründe karşımıza çıkan bazı temel kavramlar şunlardır (Arditti, 1984);

Hücre kültürü: Bitki üzerinden izole edilmiş in vitro kültür.

Meriklon: Meristem doku ve klonun birleştirilmesiyle oluşan terimdir.

Klon: 1903 yılında ilk kez keşfedilen ve Yunanca filiz, dal anlamına gelen *clon* kelimesinden türemiş bu kavram vejetatif çoğaltımın bir tipidir. Tohumdan çoğaltmanın haricinde daldırma, köklendirme, çelikleme gibi yöntemleri kapsamaktadır.

Eksplant: Organ, doku, kallus vb. bitki parçalarından doku kültürünün başlatıldığı parçadır.

Besi ortamı: Bitkiden alınan eksplantların kültüre alındığı katılaştırılmış veya sıvı çözeltilidir.

Meristem: Sürgün ucunun ön bölgesinde yer alan çok küçük bir kısımdır. Yaprak taslağı ve sürgün apikali bulunur.

Mikro çoğaltım: İlk kez 1960 yılında bitkilerin eşeysiz üretimi için yapılan aseptik uygulamaların genel adıdır. Hücre, doku ve organlardan bu işlemler ile eşeysiz üretim yapılabilmektedir. Tohumlardan *in vitro* çimlendirme yapmak için bu terim kullanılmamaktadır.

Protokorm: Orkidelerin çimlendirilmesinde kullanılan küçük, küresel, yumru benzeri yapılara verilen ve sıklıkla kullanılan bir terimdir.

Protokorm benzeri yapılar: Orkidelerin *in vitro* çoğaltımında eksplantlar veya kalluslardan üretimin şekillenmesinde kullanılan yapılara verilen isimdir.

Bitki doku kültürlerinin uygulama alanları çeşitli şekillerde yapılmaktadır. Bitki ıslahı uygulamaları da bu alanlardan biridir. Haploit bitki üretimi, embriyo kültürü, gerplazm koruma, somaklonal varyasyon, *in vitro* dölleme, *in vitro* seleksiyon ve protoplast füzyonu örnek olarak verilebilir. Bitki ıslahı çalışmalarının yanında ticari anlamda da kullanılan bitki doku kültürü özellikle sekonder metabolitlerin üretimi, hastaliksız bitki üretimi, sekonder tohum üretimi, kimerik bitkilerin üretilmesi ve mikroçoğaltım da en çok kullanılan uygulamadır (Bektaş, 2014). Bitkilerden embriyonun oluşması yalnızca döllenmiş yumurtanın var olmasıyla değil doku, organ ve somatik hücreleri kullanarak *in vitro* ortamda da gerçekleştirilebilmektedir. Vejetatif yollarla oluşan bu somatik embriyolar önce yüksek derecede oksin bulunan besi yerinde kültürlenip daha sonra oksinsiz kültür ortamına alınarak embriyo üretebilme özelliği geliştirilir (Monier, 1990).

Somatik embriyolardan gelişen bitkilerin zigotik embriyogenezle oluşan bitkilere göre farkı genetik çeşitliliğin olmamasıdır. Bu yolla üretilen bitkiler ana bitkinin klonudur (Bourman, 1994). Sentetik tohum üretimi, hızlı bitki yetiştirilmesi gibi çalışmalarda önemli potansiyele sahip olan somatik embriyogenez de seçilen eksplant, kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri, azot kaynağı ve çevre önem arz etmektedir.

Bitki büyüme düzenleyicileri in vitro besi ortamında hücre, doku ve organ eksplantlarından yeni bir bitki oluşturmak için kullanılmaktadır. Hastalısız bitki üretimi, klonal çoğaltım, sekonder metabolit, köklendirme, doku farklılaşması ve gelişmesi, kallus oluşumu gibi amaç edinilen çalışmalarda kullanılmaktadırlar. Bitkinin büyümesi, gelişmesi ve üremesinde sorumlu olan bitki büyüme düzenleyicileri esas olarak hücre farklılaşması, hücre bölünmesi ve hücre uzaması gibi olayların düzenlenmesini gerçekleştirmektedir. Oksinler ilk keşfedilen büyüme düzenleyicidir ve devamında gibberellinler, absisik asit, etilen ve sitokininler de bulunmuştur. En fazla bilinen bu beş hormonun yanında jasmonatlar, salisilatlar, oligosakkaritler, poliaminler de kullanılmaktadır ve yeni bitki büyüme düzenleyicileri de listeye eklenmeye devam etmektedir (Gaspar ve ark., 1996; Haberer ve Kieber, 2002).

Tablo 2.1. Yaygın kullanım alanları ve etkilerine göre bitki büyüme düzenleyicilerin sınıflandırılması (Gaspar ve ark., 1996; Haberer ve Kieber, 2002).

BBD	Fonksiyonu	En Yaygın Kullanılanlar
Oksinler	<ul style="list-style-type: none"> - Köklenmenin teşvik edilmesi - Apikal dominansı - Işığa yönelme - Yan sürgün gelişiminin baskılanması - Hücre gelişimi - Kallus oluşumunun uyarılması, hücre süspansyonlarının eldesi ve somatik embriyo oluşumu - Kallus oluşumu, organogenez ve somatik embriyo oluşumu (sitokininlerle birlikte) 	<ul style="list-style-type: none"> - IBA (indol butirik asit) - IAA (indol asetik asit) - 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetik asit) - NAA (naftalen asetik asit)
Sitokininler	<ul style="list-style-type: none"> - Hücre bölünmesi, yeniden farklılaşma, rejenerasyon ve sürgün çoğaltımı - Çiçeklenmenin geciktirilmesi - Yaprak dökülmesinin engellenmesi - Sürgünlerde köklenme ve embriyogenezin engellenmesi - Çimlenmenin artırılması - Yaşlanmanın geciktirilmesi 	<ul style="list-style-type: none"> - BAP/BA (benzilaminopürin/6-benziladenin) - KIN (kinetin) - Adenin Sülfat - 2iP (izo pentil adenin) - TDZ (thidiazuron) - Zeatin
Giberellinler	<ul style="list-style-type: none"> - Meristemlerden bitki rejenerasyonunun uyarılması - Sürgün boyunun uzaması - Kallus gelişimini, organogenez ve adventif kök oluşumunun engellenmesi - Bitkilerde çiçeklenmenin artırılması 	<ul style="list-style-type: none"> - GA3 (Gibberellik asit)

Absisik Asit	<ul style="list-style-type: none"> - Somatik embriyoların olgunlaşması - Yaprak ve meyve dökülmesi (absisyon), - Dormansi - Stomaların kapanması 	- ABA (Absisik asit)
Etilen	<ul style="list-style-type: none"> - Meyve olgunlaşması, senesens ve yaprak absisyonunun teşvik edilmesi - Yüksek derişimlerde, mikrotübül ve mikrofibrillerin yerleşimlerini etkileyerek, hücre uzamasının azaltılıp, hücre genişlemesinin artırılması - <i>İn vitro</i> kültürlerde, alt kültür sonrasında zamana bağlı olarak, büyüme ve organogenezin inhibe edilmesi - Kallus ve süspansiyon kültürlerinde büyümede, gövde ve kök uzaması, aksillar ve adventif tomurcuk oluşumu, embriyogenez 	
Diğer	<ul style="list-style-type: none"> - Poliaminler (polen olgunlaşması, vejetatif sürgün formasyonu, köklenme ve somatik embriyogenez). - Oligosakkarinler (oksin varlığında kallus oluşumunun teşvik edilmesi, oksin yokluğunda yan kök sayısında artış sağlanması (örneğin, buğday embriyo kültürlerinde) - Salisilatlar (çiçeklenme ve tuber oluşumunun uyarılması, bazı patojenlere karşı hastalık direncinin oluşturulması için sistemik sinyaldir, çimlenmenin inhibe edilmesi) - Jasmonatlar (patates meristem kültürlerinde tomurcuk formasyonunun teşvik edilmesi, rizogenezin uyarılması ve kallus oluşumunun geciktirilmesi) 	



Şekil 2.9. Doku kültürü ortamında yetişen Phalaenopsis sp. fideleri

2.4. Mikroçoğaltım

Bitkisel hormonları kullanarak bitkilerin büyüme ve gelişmelerini destekleyen bir yöntem olan mikroçoğaltım bitki doku kültüründe en çok kullanılan prosedürdür (Lee, 2017). Mikroçoğaltım, bir bitkiyi oluşturabilme kabiliyeti bulunan eksplantların in vitro ortamda gelişerek hızlı ve kitlesel çoğaltımının mümkün olmasıdır. Bu yöntem geleneksel yöntemlere göre daha avantajlıdır. Mikroçoğaltım ile vejetatif gelişimi zor ve yavaş bitkilerin üremesine olanak sağlanabilmektedir (George et al., 2008). Morel tarafından 1965 senesinde uygulanan mikroçoğaltım, ilk kez orkide sürgünlerinin in vitro ortamda çoğaltılması için kullanılmıştır. Böylelikle ekonomik değeri yüksek bitkilerin arzının karşılanması daha mümkün hale gelmiştir (Hatipoğlu, 1995).

Mikroçoğaltım 4 aşamada gerçekleşmektedir (Ural, 2021);

- **Başlangıç Aşaması:** Eksplantların steril ortamda besi ortamına alınması ve in vitro şartlarda gelişimin sağlanmasıdır.
- **Sürgün Çoğaltma Aşaması:** Köklendirme aşaması için ihtiyaç olan sürgün gelişiminin sağlanması amaçlanmaktadır. İlk aşama da kullanılan besi ortamı burada da kullanılmaktadır. Bu iki aşamada sürgün gelişimi ve kardeşlenme beklendiği için sitokin miktarı oksinden daha fazladır.
- **Köklendirme Aşaması:** Sürgün gelişimi uygun sayıda olduğu takdirde bunların köklenmesinin gerçekleştirildiği aşamadır. Köklenmeyi desteklemesi için ortama oksin ilave edilmektedir ve makro element oranı yarıya düşürülmektedir.
- **Dış Koşullara Alıştırma Aşaması:** In vitro ortamda gelişen eksplantların dış ortama alıştırıldığı aşamadır. Hazır besi ortamından dışarı aktarılan bitkiciklerin ölmemesi için bu aşama kademeli olarak yapılmalıdır. Bitkiciklerin düşük neme maruz kalmaması sağlanmalıdır.

Bitki biyoteknolojisinin temelleri 1838 yılında Schwann ve Schleiden'in Totipotency teorisi ile ortaya konuldu (Schleiden, 1838 and Schwann, 1839). Bu teori bitki hücrelerinden yeni bir bitki gelişebileceğini öne sürmektedir. İlk başlarda laboratuvar çalışmalarının başarısız olması nedeniyle bu teori geniş çapta kabul görmemiştir. Haberlandt tarafından 1902 yılında hücre kültürü ortaya atıldı (Krikorian, et al, 2003). Böylece bitki doku kültürünün çok sayıda bitki hücresiyle yeni bir bitki oluşturabilme kapasitesinin (totipotensi) var olduğu belirtildi. Tamamen aseptik koşullar altında bitki

eksplantları kullanılarak (sürgün, kök, gövde, polen, embriyo) sentetik besin ortamına aktarılıp kontrollü nem, sıcaklık ve ışık altında büyütülür. Ekonomik değeri yüksek bitkilerin üretilmesinde en iyi ve en kısa yollardan biri olan bu yöntem gelişmiş ülkelerde kullanılmaktadır. Bitkilerin ihtiyaç duyduğu besin maddeleri, kültür şartları ve hormonlar yeterli olursa mikroçoğaltım ile bütün bitkileri üretmek mümkündür (Hartman ve Kester, 1975; Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Bu mikroçoğaltım teknikleri kullanılarak orkideler de vejetatif yöntemlerle hızlı ve çok sayıda üretilebilir. Aka-Kacar vd. (2001), mikroçoğaltımın zaman, hız ve kullanılması gereken alandan kazanç sağlayarak ekolojik şartlardan bağımsız bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Bu doğrultuda Orchidaceae ailesine ait bitkilerden, olgunlaşmış veya olgunlaşmamış tohumlar, meristem, yaprak, sürgün ve kök ucu gibi bitki eksplantları kullanılarak kültür ortamında yetiştirme çalışmaları yapılmıştır. (Crafts ve Miller, 1974; Arditti vd., 1981; Hadley, 1982; Malmgren, 1992; Özkoç ve Dalcı, 1993; Stewart ve Kane, 2006; Yamazaki ve Miyoshi, 2006; Valetta vd., 2008; Bektaş vd., 2013). Endospermi bulunmayan orkide tohumları doğada çimlenebilmek için *Rhizoctonia sp.* türü mantarla ile simbiyotik bir ilişki kurarlar. Tohumların ototrofik aşamaya ulaşmak üzere yeterli olmayan besin içeriğini bu fungusları sindirerek karşıladığı belirtilmiştir (Harvais ve Hadley, 1976). Endofitik fungusların karbonhidratları parçalayarak absorbe ettiği ve bunları orkide dokusuna aktardığı kanıtlanmıştır (Hadley, 1982). Crafts ve Miller (1974), mikorizal fungusların sitokinini ürettiklerini ve bu sitokinlerin doğal ortamda yetişen orkidelerde tohum çimlenmesine etkisi olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca tohum çimlenmesinde kültür ortamında bulunan organik azotunda olumlu bir etkisi olduğu rapor edilmiştir (Stewart ve Kane, 2006). Van waes ve Debergh (1986), yaptıkları bir çalışmada inorganik azotun tohum çimlenmesinde inhibe edici bir etki gösterdiği belirtilmiştir. *Orchis coriophora* L. türünde yapılan bir çalışmada olgunlaşmış tohumların inorganik azot kaynağı içeren ortamda az çimlendiği, organik ve inorganik azotun ikisini de içeren ortamda daha çok çimlendiği rapor edilmiştir. Bunun nedeninin ortamda bulunan organik azot kaynağı olan triptondan kaynaklandığı düşünülmektedir (Bektaş vd., 2013).

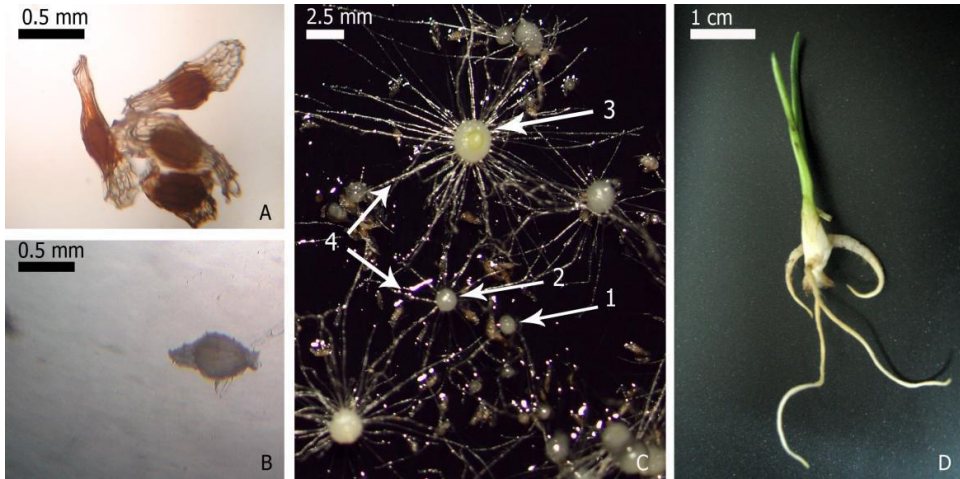
Ilıman kuşak orkidelerde en uygun pH'ın 5.8 olduğu kaydedilmiştir (Van Waes ve Deberg, 1986). Orkide tohumlarında çimlenme ve fide gelişimi için en uygun sıcaklığın 20- 25 °C olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Arditti, 1967; 1979). Bununla beraber orkide tohumlarının çimlenmesinde en olumlu etki gösteren hormonların

sitokininler olduğu sonucuna varılmıştır ama bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin değişiklik gösterebileceği bildirilmiştir (Arditti ve Harrison, 1977).

Yüzey sterilizasyonu da çimlenmede önemli etkenlerden biridir. Harvais ve Hadley (1967), civa klorür kullanmışlardır. Bunun yanı sıra kalsiyum hipoklorit (Warren, 1981), sodyum hipoklorit (Van Waes ve Debergh, 1986) ve hidrojen peroksit (Bektaş vd., 2013) gibi farklı kimyasallar kullanılmıştır.

Embriyo gelişim safhalarına göre orkide tohumlarının çimlenme süreci bölümlendirilmiştir (Yamazaki ve Miyoshi, 2006). Buna göre oluşan 5 aşama şu şekildedir;

- Emriyonun şiştiği ve tohum kabuğunu doldurduğu “çimlenme öncesi safha”
- Tohum kabuğunun kırıldığı “çimlenme safhası”
- Embriyonun tohum kabuğundan çıktığı “protokorm safhası”
- Protokormun üzerinde rizoidlerin oluştuğu “rizoid safhası”
- Protokormdan farklılaşarak ilk sürgün ucunun oluştuğu “sürgün safhası”



Şekil 2.10. Orkide tohumlarının in vitro ortamdaki ilerleme aşamaları (Bektaş vd., 2013)

Utami, E. S. W., & Hariyanto, S., (2019) *Phalaenopsis amboinensis* tohum çimlenmesi ve bitkicik gelişmesi üzerine en uygun ortam ve organik takviyeleri belirledi. Üzerinde dört ay geçmiş elle tozlanan orkide tohumları, MS ve VW kültür ortamının farklı derişimlerine ekildi: Murashige ve Skoog (MS), 1/2 MS, Vacin ve Went (VW) ve 1/2

VW. VW ortamında optimum tohum çimlenmesi, yani %90,7 elde edildi. VW ortamı fide oluşumunda iyi bir sonuç verdi ve 10 haftalık kültürlerde protokormdan fide gelişmesine %51.4'üne izin verdi. VW ortamına muz homojenatı (10 g·L⁻¹) ile birlikte %15 (v/v) hindistancevizi suyu ilave edildiğinde, bitkiciklerin boyu en yüksek uzunluğa ulaştı ve en yüksek kuru ağırlığa (sırasıyla 62.1 mm ve 15.5 g) sahip oldular.). Bitkiciklerin kökleri ve yaprakları bu ortamda güçlü bir biçimde büyümüştür. In vitro tohum çimlendirme ile yenilenen bitkiler, sera koşullarında içerisine aktarılarak iklime alıştırmış ve yaşama oranı %85'in üzerinde tespit edilmiş.

Phalaenopsis amabilis çiçekleri elle tozlanarak ve tohum gelişim analizi yapılmak üzere tozlaşmadan (DAP) 90, 105 ve 120 gün sonra meyveleri toplandı. Tohum başı embriyo hücre sayısı, 40-6-diamidino-2-fenilindol ile boyanıp ve konfokal bir mikroskopla bakılarak sonrasında sayıldı. 90'dan 120 DAP'ye meyve gelişimi sırasında embriyo başına çimlenme yüzdesi ve hücre sayısı sırasıyla %14'ten %61'e ve %41'den %66'ya yükseldi. Olgun, esmerleşen (140 DAP) *Phalaenopsis Sogo Lit-Angel* ve *Phalaenopsis sp.* üreme hattı 9450 tohum kapsülleri, 196, 80 veya 18°C'de donana ve 10 gün boyunca 4°C'de çözülene veya soğutulana kadar çimlenemedi. 140 DAP tohumundaki çimlenebilirlik, dondurma ve çözme işleminden sonra çatlamış testa ile ilişkilendirildi. *P. amabilis* tohumları 5, 10 veya 15 dakika süreyle %0, 5, 10 veya %15 kalsiyum hipoklorit (CH) ile muamele edildi. 90 DAP meyvesinden işlenmemiş tohumların yüzde doksan altısı, ekimden sonraki 40 gün içinde (DAS) protokormlar üretti. Tohumları 10 veya 15 dakika boyunca %5 CH'ye maruz bırakmak çimlenmeyi sırasıyla %85 ve %73'e düşürdü. 5, 10 veya 15 dakika süreyle %10 veya %15 CH'ye maruz bırakma, %40'tan daha düşük tohum çimlenme yüzdeleri üretti. Protokormlar, %0 veya %5 CH ile muameleden sonra kök kolları geliştirdi ve primordia'yı 50 DAS ve ortalama bir yaprak ve kökü 85 DAS kadar geliştirdi. Daha yüksek konsantrasyonlar protokorm gelişimini geciktirdi veya inhibe etti. Yeşil meyveler 120 DAP, en yüksek protokorm yüzdesini üretirken, esmerleşen meyveden elde edilen 140 DAP tohumları uykudaydı ancak soğuk uygulamalar çimlenmeyi artırdı (Mweetwa, A. M., Welbaum, G. E., & Tay, D., 2008).

Enoki, S., & Takahara, Y. (2014), *Phalaenopsis* için oldukça verimli ve basit bir mikro çoğaltma sistemi, skotomorfogenez ile elde edilen uzun protokorm benzeri cisimler (ePLB'ler) kullanılarak geliştirildi. Büyüme noktası eksizyonu olmayan normal protokorm benzeri cisimler (nPLB'ler) farklı ışık koşulları altında kültürlendiğinde (koyu: 0 mmol·m⁻²·s⁻¹, düşük ışık: 2 mmol·m⁻²·s⁻¹, yüksek ışık: Sırasıyla 80 mmol·m⁻²·s⁻¹, fotosentetik foton akı yoğunluğu), PLB proliferasyon etkinliği karanlıkta, yüksek ışık ve düşük ışık koşullarına göre daha yüksekti. Ek olarak, sürgün oluşum yüzdesi karanlık koşullarda (%8,0), düşük ışık (%66,0) ve yüksek ışık koşullarına (%68.2) göre daha düşüktü ve karanlık koşullar altında kültür sırasında çok az PLB sürgün geliştirdi. Karanlık koşullar altında kültürlemeden sonra elde edilen İkincil ePLB'ler, nPLB'lerin yaklaşık iki katı uzunluğundaydı. 2 hafta boyunca düşük ışık koşullarına alıştırdıktan sonra ePLB'ler apikal kısımlarında kısmi bir kesi yapılarak yüksek ışık koşullarına aktarıldı. Yüksek ışık koşullarında, ePLB'lerden, aynı kısmi insizyonlarla tedavi edilen nPLB'lerden 6 kat daha fazla sayıda ikincil PLB elde edildi. Bu çalışmanın bulguları, PLB'lerin karanlık koşullarda kültürlenmesinin, PLB çoğalmasına müdahale edebilecek sürgün oluşumunu baskıladığını ve yüksek ışık yoğunluğuna maruz kaldıktan sonra nPLB'lere kıyasla bu ePLB'lerden çok sayıda ikincil PLB'nin elde edilebileceğini gösterdi.

Karbon kaynağı olarak çeşitli sükroz konsantrasyonlarının ve farklı ortamlardaki doğal katkı maddelerinin *Phalaenopsis* hibriti 'Pink'in bitki büyümesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bitkicikler, %0, %10 ve %20 hindistan cevizi suyu (CW) veya havuç suyu (CJ) ile 0, 10, 20, 30 ve 40 g/L sükroz ilave edilmiş iki besiyerinde (Murashige ve Skoog ve Vacin ve Went) kültüre alınmıştır. Dört aylık kültürden sonra, her iki ortamla takviye edilen sukroz ve CW kombinasyonu, tüm sükroz konsantrasyonlarında artan CW konsantrasyonları ile bitkiciklerin çoğunun yavaş büyüme ve hayatta kalma sıklığı (%0-80) olduğu rapor edildi. Bununla birlikte, CW içermeyen sadece 20 g/L sükroz içeren her iki ortamda bitkicik büyümesi, kök sayısı, kök uzunluğu, yaprak sayısı, yaprak uzunluğu, yaprak genişliği, taze ağırlık, kuru ağırlık ve bitki boyu açısından optimaldi. MS ortamı ile takviye edilen sukroz ve CJ kombinasyonu, %100 hayatta kalma sıklığı ile genel olarak iyi bitki büyümesi ile sonuçlandı. Sakaroz (20 g/L) ve CJ'nin (%10) MS ortamıyla takviye edilmesi, kök uzunluğunu, yaprak uzunluğunu, yaprak genişliğini ve bitki boyunu artırdı.

Bitkicik büyümesi ayrıca 20 g/L sükröz ve VW ortamıyla takviye edilmiş %10 CJ kombinasyonunda da optimaldi. Bu çalışmanın sonuçları, sakaroz (20 g/L) ve CJ (%10) kombinasyonu üzerinde kültürlenmiş *Phalaenopsis* hibrit 'Pembe'nin MS veya VW ortamı ile desteklendiğini bu türün bitkicik büyümesi için kullanılabileceğini göstermektedir (Zahara vd., 2017).

Phalaenopsis Little Steve çeşidinin yaprak parçalarının eksplant olarak kullanıldığı çalışma da 2,4-D (0,45; 2,26 ve 4,52 µM), kinetin (2,32; 4,65; 13,95 µM), BA (2,22; 4,44; 13,32 µM) ve TDZ (2,27; 4,54; 13,62 µM) dozları denenmiştir. Besi ortamı olarak, 10 mg/L Myo-inositol, 0.5 mg/L niasin, 0.5 mg/L pridoksin HCl, 2 mg/L glisin, 1 g/L pepton, 170mg/L NaH₂PO₄, 2,2g/L gelrit ve 20g/L şeker karışımı ihtiva eden ½ MS kullanmıştır. TDZ'nin ve BA'nın, yaralanmış yaprak parçalarında embriyo oluşturduğu, KİN'in etkili olmadığı gözlenmiştir. 2,4-D'nin ise engelleyici etkisinin olduğu tespit edilmiştir (Kuo vd., 2005).

0,1 mg naftalenasetik asit (NAA) ve 1 mg 6 benzilaminopurin (BAP) içeren New Dogashima Medium (NDM) kullanılarak 1 veya 2 yaprak primordiaya sahip çiçek sapı tomurcuklarının sürgün uçlarından yüksek çoğalma kapasitesine sahip Yeşil Protokorm Benzeri Gövdeler (PLB) indüklendi. Bu PLB'ler aynı ortam üzerinde alt kültürlendi. Bir yıl içinde tek bir çiçek sapındaki birkaç tomurcuktan 10.000'den fazla PLB elde edildi. Bitki büyüme düzenleyicisi (PGR) içermeyen NDM'ye aktarıldıktan sonra, PLB bitkicikler haline geldi. Bu çalışmada formüle edilen mikro çoğaltma yöntemi 12 farklı genotipe uygulanabilirdi. Bu sonuçlar, metodolojinin *Phalaenopsis* ve *Doritaenopsis*'in vejetatif çoğaltımı için ticari ölçekte kullanılabileceğini göstermektedir (Tokuhara ve Mii, 1993).

Ernst (1994), yaptığı çalışmada 0.23-11.35 (thidiazuron, TDZ) içeren besiyerinde in vitro olarak yetiştirilen *Phalaenopsis* veya *Doritaenopsis* (Orchidaceae) çiçek sapı bölümlerinin genellikle daha yüksek seviyelerde protokorm benzeri cisimler (PLB) üreten çoklu sürgünler geliştirdiğini belirtmiştir. Artan TDZ konsantrasyonu ile çoğalma artarken sürgün ve kök gelişimi azalmıştır. Daha düşük bir TDZ aralığında (0.23-1.14 gM) *Phalaenopsis* protokormlarında benzer etkiler gözlenmiştir.

Ket vd. (2004), yaptıkları çalışmada seçkin bir mücevher orkide çeşidinin (*Anoectochilus formosanus*) *in vitro* klonal yayılımı için hızlı ve verimli bir prosedür ana hatlarıyla verilmiştir. 1 mg dm⁻³ benziladenin veya 1-2 mg TDZ ile desteklenmiş Hyponex (H3) ortamı üzerindeki sürgün ucu eksplantlarında çoklu sürgün proliferasyonu indüklendi. TDZ’li kültür ortamına aktif kömürün eklenmesi çoklu sürgün oluşumunu (eksplant başına 11,1 sürgün) destekledi. Bununla birlikte, yenilenen sürgünler yavaş bir büyüme hızına sahipti ve uzamayı başaramadı. Bu problem, sürgün kümelerinin %2 sukroz ve 0.5 g dm⁻³ aktif kömür ile takviye edilmiş hormonsuz bir H3 ortamına aktarılmasıyla aşıldı. Aynı ortamda rejenera edilen sürgünlerde %100 oranında köklenme sağlanmıştır.

Gümüş ve arkadaşları (2008), Batı Karadeniz Bölgesi’nde salep eldesi için kullanılan 6 farklı orkide türünde *in vitro* çalışmışlardır. Çalışmada MS, ½ MS, VW &DB ve Knudson C ortamlarını denemiş ve en yüksek çimlenme oranını *D. nieschalkiorum* türünden %24,41 ile VW&DB ortamından elde edildiğini bildirmişlerdir. Protokorm oluşumunun ise sadece 3 türde meydana geldiği ve en yüksek protokorm oluşum oranının % 13,11 ile *D. nieschalkiorum*’dan elde edilmiştir.

Sheelavanthmath ve arkadaşları (2005), *Aerides crispum* orkide türünün PBY’lerini kullanarak geniş çapta üretim için yeni bir metot geliştirmeye çalışmışlardır. Hindistan cevizi sütü ve farklı derişimlerdeki çeşitli sitokin ve oksinlerle destekli MS ortamında protokormları ve 21 yaprak parçalarını kültüre almışlardır. PBY oluşumu için en uygun ortamın, 1 µM 6-BA ile desteklenen ortam olduğu ve bu ortamdan eksplant başına ortalama 49,1 adet PBY elde edildiği bildirilmiştir. Oluşan PBY’ler bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamına alınarak 6-8 hafta içerisinde fideler oluşturulmuştur. Fidelerin daha sonra sera ortamlarında saksılara alındığı ve fidelerin %85’inin canlılığını sürdürdüğü gözlemlenmiştir.

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

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çimlendirme ve doku kültürü ile mikroçoğaltım için bitki büyütme odasından yararlanıldı. Oda sıcaklığı $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ ve havalandırma 24000 BTU'lık klima ile sağlandı. Işıklandırma 2500 Lüks ve 8/16 (karanlık/aydınlık) fotoperiyot olacak şekilde ayarlandı.

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada tohumları değerlendirilecek bitki örnekleri Koçtaş mağazasından elde edildi. Henüz çiçekleri tomurcuk aşamasında olan bitkiler satın alınarak laboratuvar ortamına getirildi ve 25°C de çiçeklerin tam açılmasına kadar bekletildi. Bu süre zarfında sulama ve orkideler özel sıvı gübre ile besleme yapıldı. Çiçeklerin tam açılmasından sonra dölleme işlemleri gerçekleştirildi. Bunun için stamen filamentlerinden ayrıldı ve stilus kesildikten sonra ovaryuma yerleştirildi. Bu işlem aynı çiçek üzerinde gerçekleştirildi. Elle dölleme işlemi bittikten sonra bitkiler büyütme ortamına alınarak kontrollü şartlarda büyümeleri sağlandı. Dölleme sonucu oluşan sağlıklı kapsüller elde edilinceye kadar bu işlem sürdürüldü. Kapsüllerin rengi yeşilden sarıya dönmeye başladığında ana bitkiden alınarak tohum elde etme işlemine başlandı.



Şekil 3.1. Döllemeden sonra oluşan tohum taslakları



Şekil 3.2 Tohum kapsülünün içinde bulunan tohumlar

3.2. Temel Besi Ortamları

Çalışmanın ilk aşaması olan çimlendirme deneylerinde farklı inorganik ve organik içeriğe sahip dört değişik besi ortamı değerlendirildi. Bu temel besi ortamları Tablo 2’de sunulmaktadır.

3.3. Yöntem

3.3.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Belirlenmesi

Phalaenopsis sp. tohumlarının çimlendirilmesi ve mikroçoğaltım çalışmalarında sadece sitokininler ve sitokinin benzeri büyüme düzenleyicisi olan Thidiazuron kullanılmıştır. Tablo 3’ de verilen tüm büyüme düzenleyicilerinin derişimleri literatür verisine dayanarak belirlenmiştir (Babaoğlu ve ark 2002). Bitki büyüme düzenleyicileri Tablo 3’te sunulmuştur.

3.3.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması

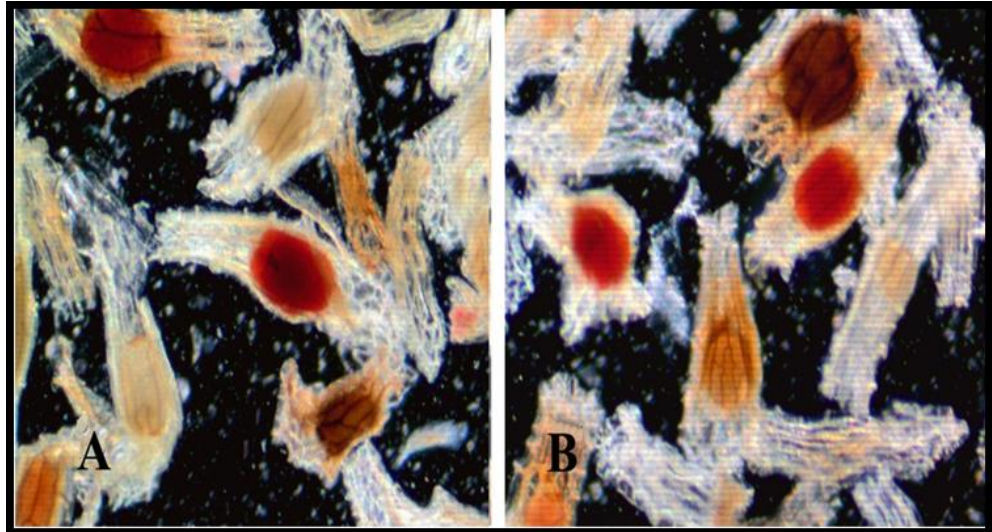
Tablo 2’de yer alan tüm temel besi ortamları ticari olarak piyasada satılmaktadır (Duchefa Biochemie, Netherlands). Bu besi ortamlarının her biri için reçete edilen miktar tartılıp, 500 mL saf suda çözüldü. Besi ortamlarına, Orchimax hariç, %2 sukroz ilave edildi. Tüm ortamlar %0,6 agar ile katılaştırıldı (Phytoagar, Duchefa Biochemie, Netherlands) ve karbon kaynağı olarak 20 gram/litre sukroz ile desteklendi. Bitki büyüme düzenleyicilerinin eklenmesinin ardından çözeltinin hacmi 1000 mL’ye

tamamlanıp, pH'sı 5,7-5,8'e ayarlandı. Besi ortamları, otoklavlanabilir kapaklı şişeler içerisinde, 1,5 atm basınçta, 121 °C'de, 15 dakika süre ile sterilize edildi. Otoklavdan çıkarılan besi ortamları hafifçe çalkalanarak agarın homojen dağılması sağlandı ve transfer odasında soğumaya bırakıldı. Yüksek sıcaklıkta etkisini kaybeden bitki büyüme düzenleyicileri 0,22 µm çapındaki filtrelerle sterilize edildi ve otoklavdan sonra besi ortamı soğumadan ortama eklendi. 40 °C civarına kadar soğutulan besi ortamları, sterilize kabin içerisinde kültür kaplarına aktarıldı.

Orchimax aktif kömürlü veya kömürsüz besi ortamları daha sonraki mikroçoğaltım ve köklendirme çalışmalarında temel besi ortamı olarak kullanıldı.

3.3.3. Tohumların Canlılık Yüzdelerinin Belirlenmesi

Tohumların sterilizasyon öncesi ve sonrası canlılık testleri literatürde verilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir (Lauzer ve ark., 1994). Her bir deneme grubuna ait tohumlar, %1'lik TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride, Sigma-Aldrich, Austria) çözeltisine konulmuştur ve karanlıkta, 30 °C'de, 48 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda, tohumlar binoküler mikroskop altında incelendi ve turuncu-kırmızı renkte görünen tohumlar canlı olarak kabul edilmiştir. Elde edilen verilere göre, tohumların yüzey sterilizasyonunda kullanılan kimyasalların ve farklı derişimlerinin, tohumların canlılıkları üzerindeki etkileri belirlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 3.3. Orkide tohumlarının canlılık testi sonrası görünüşleri. Turuncu-kırmızı renkte boyananlar canlı, diğerleri canlılığını kaybetmiş tohumları göstermektedir (Bektaş, 2014).

Tablo 3.1. Çimlendirme aşamasında kullanılan temel besi ortamları ve içerikleri (Bektaş,2014).

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

OM:Orchimax aktif kömürsüz besi ortamı, KCM: Knudson C besi ortamı, LM: Lindemann besi ortamı, +OM: Orchimax aktif kömürlü besi ortamı, MS: Murashige ve Skoog besi ortamı

Tablo 3.2. Çimlendirme, mikroçoğaltım ve köklendirmede kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri

OKSİNLER	SİTOKİNİNLER VE SİTOKİNİN BENZERİ TDZ
	6-benziladenin (Benzilaminopürin), 6-BA
İndol-3-butirik asit, IBA	2-izopentiladenin [6- γ - γ -(dimetilallilamino) pürin], 2-iP
Naftalen asetik asit, NAA	Kinetin (6-furfurilaminopürin), KİN
	Adenin hemisülfat
	Thidiazuron [1-fenil-3-(1,2,3-thiadiazol-5yl)urea], TDZ

Yukarıda verilen büyüme düzenleyicilerine ek olarak sadece çimlendirme denemelerinde giberellik asit (GA₃) kullanıldı.

3.3.4. Aktif kömür tozu

Aktif kömür tozu, kültür ortamında oluşabilecek fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması için kullanılmaktadır. Bu çalışmanın ilgili bölümlerine sadece %1'lik aktif kömür kullanıldı.

3.4. Kapsüllerin sterilizasyonu

Yaklaşık altı aylık sürecin sonunda renk değişimi ile takip edilen kapsüller anaç bitkiden alınarak önce çeşme suyunda bir dakika yıkandı. Ardından %70'lik etil alkole daldırılarak kapsüller 1 dakika bekletildi. Sonrasında steril bistüri ile boylamasına açılan kapsüllerde bulunan tohumlar olabildiğince seyreltik olarak önceden hazırlanan besiyerlerine yerleştirildi. Mikroskop altında her kültür kabı (magenta) da 200 civarı tohum bulundurulmasına özen gösterildi.

3.5. İn Vitro Kültürlerin Başlatılması

3.6. Phalaenopsis sp. Tohumlarının İn Vitro Çimlendirilmesi

Tohumların çimlendirilmesi çalışmalarında, besi ortamlarının ve bitki büyüme düzenleyicilerinin çimlenme üzerine olan etkileri araştırıldı. Bunun için aşağıda verilen iki ayrı aşamaya yer verildi.



Şekil 3.4. Orkide tohumlarının çimlenmesi

3.7. Farklı Besi Ortamlarının Tohumların Çimlenmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Tezin başlangıç aşamasını temsil eden bu kısımda kapsüllerden ayrılan tohumlar dikkatlice Tablo 2’de verilen besi ortamlarına ekimleri yapıldı. Tohumları taşıyan magentalar, 3 ay boyunca Materyal ve Metod’un ilk kısmında verilen fiziksel ortamı içeren bitki büyütme odasında kültüre alındı. Tohumların ekiminden sonra besiyerinde kaç tohum olduğuna dair sayım yapıldı. Sonrasında birer haftalık gözlemlerle kültürlerde çimlenme takip edildi. 2 ay sonra kültür kaplarındaki çimlenen tohum sayısı tespit edilerek, canlı tohum sayısına göre çimlenme yüzdeleri belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre tohumların çimlenebileceği en uygun ortam belirlendi. Çimlenme ve protokorm oluşum oranları yüzde (%) olarak verilmiştir.

3.8. Farklı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Tohumların Çimlenmesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Bir önceki çalışma sonucu değerlendirilerek ikinci aşamada temel besi ortamı olarak Orchimax aktif kömürlü besi ortamı kullanıldı. Bu besi ortamına sadece üç farklı derişimlerde sitokininler, sitokinin benzeri TDZ ve giberellik asit (GA_3) değerlendirildi. Bu derişimlerin seçimine her büyüme düzenleyicisinin önerilen düşük, orta ve en yüksek etkin dozlar seçildi. Seçilen büyüme düzenleyicileri ve derişimleri aşağıdaki gibidir;

6-BA (1.0, 2.5 ve 5 ppm), 2-iP (1.0, 2.5 ve 5 ppm), Kinetin 1.0, 2.5 ve 5 ppm), Adenin hemisülfat (AHS) (10, 50 ve 100 ppm), TDZ (0.1, 0.5 ve 1.0 ppm), Gibberellik Asit (0.5, 2.0 ve 5.0 ppm). Kontrol grubu olarak büyüme düzenleyicisi içermeyen Orchimax aktif kömürlü besi ortamı kullanıldı. Bir önceki yöntemde bahsedilen ekim işlemi uygulandı ve magentalara ekilen tohumların sayımı yapıldı.

Denenen her besi ortamında çimlenme sürelerinin belirlenebilmesi için, kültür kaplarının günlük takibi yapıldı. Tohumların ekiminden 2 ay sonra kültür kaplarında çimlenen tohum sayısı saptandı. Her bir denemeden elde edilen sonuçlar yüzde (%) olarak hesaplandı ve kontrol ile karşılaştırarak, çimlenmeyi teşvik eden en etkili bitki büyüme düzenleyicisi ve derişimi belirlendi.



Şekil 3.5. OM- kültür ortamında çimlenen tohumlar



Şekil 3.6 OM+ kültür ortamında çimlenen tohumlar Şekil 3.7 OM+ kültür ortamında büyüyen fideler

3.9. Eksplantlardan Doğrudan Organogenezle Mikroçoğaltım

Çimlenme sonucu oluşan fideler dördüncü aydan itibaren alt kültüre alındı. Bunun için büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol grubuna ait bitkicikler seçildi. Bu bitkilerden alınan eksplantlar (0.5-1.0cm) aşağıda verilen büyüme düzenleyicilerini içeren Orchimax aktif kömürlü besi ortamı aktarıldı;

Kinetin (1.0, 5.0 ve 10 ppm), 6-BA (1.0, 5.0 ve 10 ppm), Adenin hemisülfat (50, 100 ve 200 ppm), 2-iP (5.0, 10 ve 20 ppm), TDZ (0.1, 0.5 ve 1.0 ppm). Kontrol grubu olarak yine yukarıda anılan ve büyüme düzenleyicisi içermeyen besi ortamına alınan eksplantlar kullanıldı. Sonuçlar sürgün oluşumu yüzdesi, yaprak oluşturma sayısı ve karama gibi parametrelere bakılarak değerlendirildi.



Şekil 3.8. Gelişen bitkiciklerden eksplant kesimi

3.10. İstatistik Analizleri

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

4. BULGULAR

4.1. Tohumların Canlılık Yüzdeleri

Doğrudan kapsülün açılmasıyla elde edilen tohumların canlılık yüzdeleri ve kontaminasyon oranı sırasıyla %72 ± 4,0 ve %6 ± 0,4 olarak saptandı. Her deneme öncesinde, tohumların canlılık testleri yapıldı. Elde edilen canlılık yüzdeleri göz önünde bulundurularak tohumların çimlenme oranları hesaplandı.

4.2. Temel Besi Ortamlarının *in vitro* Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Materyal ve Metod kısmında verilen, her biri kendine has içeriklere sahip 5 temel besi ortamına ekilen *Phalaenopsis* olgun tohumları, söz konusu ortamlarda yaklaşık dört ay bekletildikten sonra değerlendirmeye alındı. Değerlendirme için çimlenme süreleri ve çimlenme yüzdeleri esas alındı. Çimlenme yüzdelerinin belirlenmesinde, tohumların canlılık oranı göz önünde bulunduruldu. Tohumlar magentalarda bulunan agarla katılaştırılmış besi ortamı üzerine iyice yayıldı. Tohumların çimlenme süreleri ve yüzdeleri stereo mikroskop altında değerlendirildi. Çimlenme süreleri ve yüzdeleri Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 4.1. *Phalaenopsis* sp. tohumlarının farklı besi ortamlarındaki çimlenme yüzdeleri ve süreleri

	KCM	LM	OM	OM+	MS
Çimlenme (%)	22,40±1,8d	29,20±2.4c	49,90±3,9b	57,90±3,10a	36,20±3,0b
Çimlenme süresi (gün)	62	57	32	28	42

Aynı satırdaki benzer harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre (P<0,05) farklı değildir.

Tablo 4' de verilen değerlere göre en kısa sürede çimlenmeyi (gün) aktif kömürlü Ochimax temel besi ortamının (OM+) verdiği görülmektedir. Bunu 32 gün ile aktif kömürsüz Orchimax (OM) izlemiştir. Knudson C (KCM) ve Lindemann besi ortamlarında sırasıyla 62. ve 57. günlerde çimlenmenin başladığı gözlenmiştir. Bitki doku kültürü çalışmalarında sıklıkla yer verilen Murashige & Skoog (1962) ortamında ise çimlenme 42. günde gözlenmiştir.

Tüm denemelerde kök rizoidlerinin oluşması çimlenmeye başladıkları anlamına gelmektedir. Dördüncü ayda değerlendirilen çimlenme yüzdeleri karşılaştırıldığında, en yüksek çimlenme yüzdesinin Orchimax aktif kömürlü besi ortamında olduğu tespit edilmiştir (%57,90). Bu besi ortamını (%49,90) çimlenme yüzdesi ile aktif kömürsüz Orchimax besi ortamı izlemiştir. MS besi ortamı ise denenen tüm ortamlara göre orta derecede çimlenme yüzdesine sahip olduğu gözlenmiştir. Buna karşın, en düşük çimlenme yüzdesi, (%22,40) ile Lindemann besi ortamında belirlenmiştir. Knudson C besi ortamının da düşük çimlenme oranına sahip olduğu bulunmuştur (%29,40). En yüksek çimlenme değerinin canlılık yüzdesi ile orantılanması sonucu büyüme düzenleyicisi içermeyen OM+ besi ortamında çimlenme oranı (%80,04) olarak hesaplanmıştır.

4.2.1. Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *in vitro* Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkileri

Çalışmanın bu aşamasında ikinci grup kapsüllerden alınan tohumların canlılık yüzdeleri ve kontaminasyon oranı sırasıyla $70 \pm 3,6$ ve $6 \pm 0,6$ olarak saptandı. Kontrol grubu olarak büyüme düzenleyicisi içermeyen aktif kömürlü Orchimax (OM+) kullanıldı. Bazı sitokinler, sitokin benzeri TDZ ve giberellik asit için seçilen derişimlerin çimlenme süresi ve gününe olan etkisi Tablo 5 de verilmiştir. Çimlenme yüzdeleri dördüncü ayın başında alınan değerlerdir.

TDZ'nin farklı derişimlerini içeren OM+ besi ortamından elde edilen çimlenme sonuçlarına göre, artan TDZ derişimi ile çimlenme yüzdesi arasında negatif ilişki gözlenmiştir. En yüksek çimlenme yüzdesi %58,75 ile 0,1 ppm, en düşük ise %50,55 ile 1,0 ppm derişimde bulunmuştur.

Kinetin (KİN) tohum çimlenmesinde etkisine bakıldığında en yüksek derişimin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda fark olmamasına karşılık pozitif bir etkisi olduğundan söz edilebilir. Çimlenme yüzdeleri %59,8 ila %60,50 arasında olduğu hesaplanmıştır. Diğer bir büyüme düzenleyicisi 6-BA'da da benzer durum söz konusudur. 1,0; 2,5 ve 5,0 ppm'lik derişimlerde çimlenme yüzdeleri 58,8%; 59,5% ve 60,6% olarak bulunmuştur. Burada da derişime bağlı pozitif bir korelasyon olmakla birlikte, TDZ hariç, diğer gruplar ve kontrole göre istatistiksel bir fark bulunmamıştır.

Tablo 4.2. Bazı büyüme düzenleyicilerinin Phalaenopsis tohumlarında çimlenme süresi ve çimlenme oranına etkileri

BBD	Derişim (ppm)	Çimlenme (gün)	Çimlenme (%)
	0.1	30	58,75±1,5a
TDZ	0.5	32	54,60±2,7b
	1.0	32	50,55±1,8b
KİN	1,0	30	58,9±2,9a
	2,5	29	59,8±3,4a
	5,0	30	60,50±3,6a
6-BA	1,0	32	58,8±3,1a
	2,5	33	59,5±4,7a
	5,0	30	60,6±4.9a
2-İP	1,0	32	57,8±4.2a
	2,5	30	58.9±2.8a
	5,0	30	58,7±1,5a
AHS	10,0	30	57,8±2,4a
	50,0	30	59,4±3,6a
	100,0	30	59,5±4.0a
GA₃	0,5	29	58,9±3,6a
	2,0	29	60.00±2.7a
	5,0	28	62,55±3,5a
Kontrol		29	59,10±2,35a

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

Bu çalışmada diğer büyüme düzenleyicilerine göre çok yüksek derişimleri değerlendirilen adenin hemisülfat'ın (AHS) da kontrol grubuna göre önemli etkisi olmadığı gözlenmiştir. 10, 50 ve 100 ppm AHS'ın da artan derişimleri çimlenme üzerine olumlu etkisi gözlenmiş olsa da istatistiksel fark göstermemiştir.

Giberellik asit (GA₃)'in çimlenme üzerine olumlu etkisi görülse de istatistiksel anlamda fark taşımamıştır. Yine de 5,0 ppm giberellik asit uygulamasının canlı tohum yüzdesi ile karşılaştırıldığında yaklaşık %90'a varan çimlenme oranına ulaştığı hesaplanmıştır.

4.3. Sürgün Oluşturma Çalışmaları

Çalışmanın son aşaması olan doğrudan organogenez için eksplant kaynağı olacak fideler (bitkicikler) yetiştirmek üzere, farklı ortamlarda çimlenen sağlıklı bitkiler 5,0 ppm 6-BA ve 5,0 ppm kinetin içeren ortamlarda ayrı ayrı büyütüldü. Bu bitkiler her ay taze besi ortamlarına aktararak alt kültürü yapıldı. Beşinci ayın sonunda sürgün, yaprak ve kök oluşturan genç fidelerin sürgün ucu kök ve yapraklarından yaklaşık 10 mm'lik eksplantlar alındı.



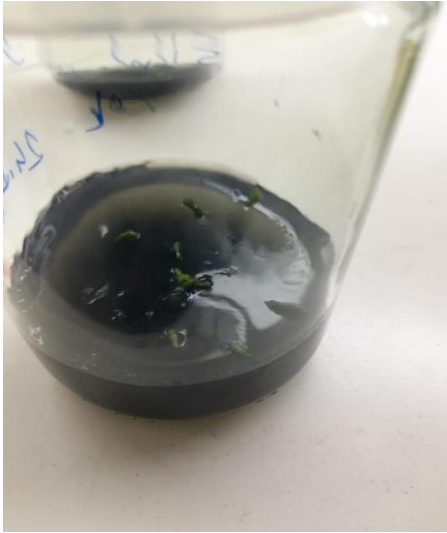
Şekil 4.1 Sürgün eksplantlarının aktarımı



Şekil 4.2 Eksplantların kültür ortamında gelişimi

4.3.1. Sürgün Ucu Eksplantlarından Doğrudan Organogenez

Sadece sürgün uçlarından pozitif yanıt alındı. Kök ve yaprak eksplantları %100 oranında kararmayla sonuçlanan yanıt verdi. Dolayısı ile sadece sürgün uçlarından alınan eksplantlarla ilgili veriler Tablo 6 da yer almaktadır.



Şekil 4.3 Yaprak eksplantlarının durumu



Şekil 4.4 Sürgün eksplantlarının gelişimi

Burada değerlendirilen ilk parametre sürgün oluşumuna yanıttır. Diğer bir deyişle her bir eksplantın sürgün verme kapasitesidir. Besi ortamları içeren her bir magentaya aktarılan 10 eksplant (toplam 100 eksplanttan) alınan % verim değerleri Tablo 6'da

verilmiştir. Buna göre en verimli besi ortamının 5,0 ppm 6-BA ile desteklenmiş ortam olduğu görülmüştür. 0,1; 0,5 ve 1,0 ppm TDZ içeren ortamlardan düşük verim elde edilmiştir. Özellikle 1,0 ppm TDZ'nin kontrol grubuna göre de daha düşük verim sağladığı gözlenmiştir (%41). Eksplanttan elde edilen sürgün veriminde kinetin ve 2-iP'nin de etkili olduğu saptanmıştır. Diğer bitki büyüme düzenleyicisi AHS'nin de diğer uygulamalara göre çok etkili olmadığı görülse de kontrol grubuna göre olumlu yönde farklılık sağlamıştır. Dört aylık fidelerde uzama miktarına bakıldığında eksplant veriminin aksine TDZ'nin yüksek oranda sürgün uzamasına yol açtığı görülmüştür. Özellikle 0,5 ppm TDZ diğer gruplara göre daha yüksek verim sağlamıştır. Ancak daha yüksek TDZ (1,0 ppm) sürgün boyu uzamasının olumsuz etkilendiği gözlenmiştir (62,40 mm). Sürgün uzamasında denenen diğer grup AHS de kontrole göre sürgün uzaması sağlamıştır. Burada derişim ile sürgün uzaması arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Burada 200 ppm AHS'nin kayda değer bir sürgün uzaması sağladığı görülmüştür (53,55 mm). Kinetin' in sürgün uzamasına etkisinde düşük derişimlerin olumlu etki gösterdiği, yüksek derişimin ise negatif etkide bulunduğu görülmüştür. Sürgün uzaması bakımından en verimli kinetin derişiminin 5.0 ppm olduğu bulunmuştur. 6-BA'nın tüm derişimleri de kontrol grubuna göre daha etkili sonuçlar vermiştir. Derişimler arasında en yüksek verim 5,0 ppm olsa da diğer 6-BA derişimlerine göre istatistiksel anlamda bir fark göstermemiştir.



Şekil 4.5 Sürgün eksplantlarının uzaması

Bu çalışmada değerlendirilen son sitokinin grubu büyüme düzenleyicisi 2-İP'nin diğer gruplara göre daha düşük oranda sürgün uzamasına yol açtığı bulunmuştur. Burada sürgün boyu uzama değerleri 36,96 ila 39,40 mm. arasında değişmektedir. Bu değerler çalışılan tüm büyüme düzenleyicileri arasında en düşük verimleri temsil etmiştir. 2-İP ile sürgün uzaması arasında herhangi bir pozitif ilişki görülmemiştir.

Tablo 4.3. Bitki büyüme düzenleyicilerinin Phalaenopsis sürgün ucu eksplantlarında sürgün ve kök oluşumu üzerine etkileri

BBD	Derişim (ppm)	SV (%) ¹	UM (mm) ¹	KU (mm) ²	KS ³	YS ⁴
TDZ	0,1	54c	52,50±4,60b	12,28±1,10a	3,8a	4,8b
	0,5	47d	62,40±3,70a	12,95±0,90a	3,1b	5,7a,b
	1,0	41d	50,00±3,60b	12,75±0,80a	3,0b	5,2b
AHS	50,0	58c	44,60±2,68c	12,86±0,80a	3,7a	4,2c
	100,0	64b	49,50±3,60b,c	13,65±0,70a	3,3b	3,9c
	200,0	70a,b	53,55±3,00b	12,29±0,40a	3,2b	4,0c
KİN	1,0	72a,b	50,83± 3,40b	10,05±0, 9a,b	3,5a,b	6,6a
	5,0	77a	52,24± 3,0b	11,55±0,90a	3,5a,b	6,8a
	10,0	69a,b	42,31± 2,80c	10,20±0,7a,b	3,0b	6,6a
6-BA	1,0	78a	46,60±2,75b,c	12,63±0,80a	3,0b	5,9a,b
	5,0	80a	49,15±2,80b,c	13,41±0,95a	2,8b,c	6,8a
	10,0	72a,b	46,74±2,50b,c	13,86±0,90a	2,7b,c	6,0a
2-İp	5,0	68a,b	39,40±3,40c	9,56±0,70b	3,2 b,c	4,2c
	10,0	74a,b	36,96±3,10c	9,95±0,50b	3,7a	4,3c
	20,0	70a,b	38,00±2,80c	10,83±0,60a,b	2,8c	4,0c
Kontrol		45d	19,80±1,72d	8,31±0,5c	2,0d	2,7d

¹ SV: Sürgün verme yüzdesi

² UM: Uzama miktarı. 4 aylık fidelere ait son boyları ile başlangıç boyları arasındaki farkları alındı ve bu farkların ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 10'ar örnekten ölçüm alındı.

³ KU: Kök uzunluğu. 4 aylık fidelere ait köklerden en uzun boya sahip olanların ortalamaları alınarak kök uzunlukları ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

⁴ KS: Kök sayısı. 4 aylık fidelere ait kök sayılarının ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı.

⁵ YS: Yaprak sayısı. 4 aylık fidelere ait yaprak sayılarının ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 25'er örnekten ölçüm alındı.

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

Kök uzaması bakımından tüm sitokininler ve derişimleri kontrole göre olumlu etki göstermiştir. Ancak bu büyüme düzenleyicilerinin kendi aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Oluşan kök sayısı bakımından denenen tüm sitokininler ve derişimlerinin kontrol grubuna göre olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. Burada artan 2-İp hariç artan derişimlerin kök oluşma sayısını azalttığını istatistiksel analizler de göstermiştir. Son olarak yaprak sayısı ortalamasına bakıldığında tüm denemeler arasında belirgin farklılıklar görülmüştür. Özellikle kinetinin denenen tüm derişimleri

ortalama 6,6-6,8 adet yaprak oluşumu sağlamıştır. Yine 6-BA'nın denenen tüm derişimleri ile TDZ'nin 0,5 ppm derişimi de yaprak oluşumuna olumlu katkı sağlamıştır. Burada genel anlamda 2-İp'nin yaprak oluşumuna diğer bitki büyüme düzenleyicilerine göre daha sınırlı katkı sağladığı, istatistik analiz sonuçları da göstermiştir. Yukarıda tabloda verilen tüm veriler için yaklaşık 100 eksplanttan elde edilen sonuçlar verilmiştir. Ortalamadan negatif veya pozitif ayrışan veriler değerlendirme dışı bırakılmıştır.



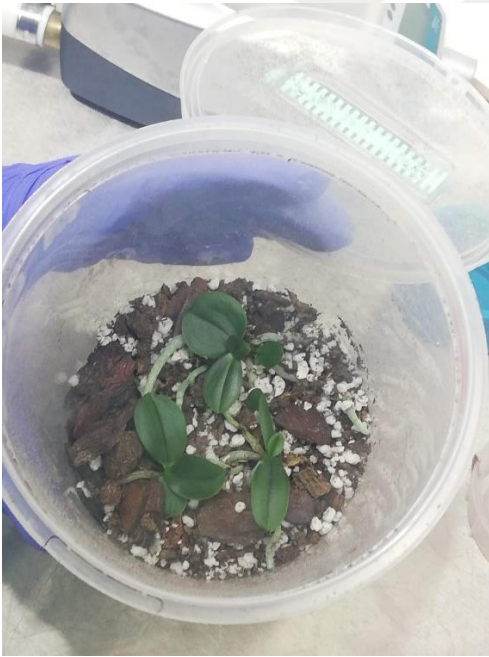
Şekil 4.6. Doku kültürü ortamında yetiştirilen ve dış ortama aktarılmaya hazır fideler



Şekil 4.7. Kültür ortamında gelişimi tamamlayan fide



Şekil 4.8. Mikroçoğaltım ile gelişen ve dış ortama aktarılabacak fideler



Şekil 4.9. Dış ortama aktarılan fideler



Şekil 4.10 Dış ortamda büyüyen orkideler

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

İnsan toplumları en başından beri besin, barınak ve ilaç kaynağı olarak bitkilerle yakın bir bağ kurma ihtiyacı hissetmişlerdir. Nüfus artış hızı ve hasta sayısına paralel olarak ilaç ve aromatik bitkilere olan talep artmış ve son yıllarda parfümeri ve kozmetikte de kullanılmaya başlanmıştır. Bu nedenle, hızlı üretime olanak sağlayan mikroçoğaltma yöntemleri, bu bitkilerin geleneksel in vivo çoğaltımına geçerli bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, tıbbi ve ekonomik önemi olan nadir, nesli tükenmekte olan ve değerli bitkilerin korunmasında bu yöntemlerin rolü çok önemlidir. Mikroçoğaltma, bitkilerin belirli kısımlarından yeni bitkiler elde etmek için in vitro yetiştirme tekniklerinden oluşur; tamamen aseptik koşullar altında kök, gövde anteri, sürgün, polen, tohumlar, organlar, embriyo, diğer bitki parçaları (eksplantlar), nasır, tek hücreli veya protoplastlar (Andrade, et al. 1999). Ekonomik olarak yüksek değere sahip bitkilerin veya bu bitkilere ait ürünlerin temininde doğrudan bitkiyi kullanmak ekolojik yıkıma sebep olabilmektedir. Bu nedenle bitki biyoteknolojisi kullanılarak bunun önüne geçilebilir. Bitki doku kültürü ile bitki ve bu bitkilerin doğal metabolitlerinin üretmek mümkündür (Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Bitki büyüme düzenleyicileri, çimlenme, gövde uzaması, yaprak büyümesi ve gelişmesi, çiçeklenme, meyve tutumu ve büyümesi ve olgunlaşma gibi bitki büyümesi ve gelişmesinde çeşitli önemli işlevler oynarlar (Gaba, 2005). Bu tez çalışmasında, bir orkide türü olan *Phanaelopsis* sp. bitkisi tohumlarının in vitro çimlenmesi üzerine temel besi ortamları ve giberellik asit ile sitokinler grubunda yer alan bazı büyüme düzenleyicilerinin etkisi araştırılmış, sonrasında in vitroda oluşturulan fidelerden farklı eksplantlardan doğrudan organogenez ile bu bitkilerin in vitro çoğaltımı hedeflenmiştir.

Sert bit tohum kabuğuyla çevrili olan orkide tohumlarının çimlenebilmesi için bu yapının zayıflatılması önemlidir. Yüzey sterilizasyonunda kullanılan kimyasallar ve bunların derişimleri ile muamele süreleri hem sterilizasyon hem de tohum kabuğunun zayıflatılması için büyük önem arz etmektedir. Bu tez çalışması için yaklaşık altı aylık sürecin sonunda renk değişimi ile takip edilen kapsüller anaç bitkiden alınarak önce çeşme suyunda bir dakika yıkandı. Ardından %70'lik etil alkole daldırılarak kapsüller 1 dakika bekletildi. Sonrasında steril bistüri ile boylamasına açılan kapsüllerde bulunan tohumlar olabildiğince seyreltik olarak önceden hazırlanan besiyerlerine yerleştirildi.

Endospermli olmayan orkide tohumları doğal ortamlarında çimlenebilmek adına mikorizal funguslarla simbiyotik ilişki içinde bulunurlar. Bu funguslar tohum içindeki embriyonun çimlenebilmesi için enerji sağlamaktadır. Tohumların çimlenebilmesi için gereken besinler *in vitro* koşullarda ortama eklenerek mikorizal funguslara olan zorunluluk kaldırılmış olur. Çalışmamızda, *Phalaenopsis sp.* olgun tohumları farklı içeriklere sahip besi ortamlarında (Bölüm 3, Tablo 2) çimlendirilmiş ve OM+ ortamında daha yüksek seviyede (%57,90) çimlendikleri görülmüştür. Çalışmada denenen diğer besi ortamlarında aktif kömürsüz Orchimax (%49,90) çimlenme yüzdesi ile ikinci sıradadır. MS besi ortamı ise denenen tüm ortamlara göre orta derecede çimlenme yüzdesine sahip olduğu gözlenmiştir. Buna karşın, en düşük çimlenme yüzdesi Lindemann besi ortamında (%22,40) belirlenmiştir. Knudson C besi ortamının da düşük çimlenme oranına sahip olduğu bulunmuştur (%29,40). En yüksek çimlenme değerinin canlılık yüzdesi ile orantılanması sonucu büyüme düzenleyicisi içermeyen OM+ besi ortamında çimlenme oranı (%80,04) olarak hesaplanmıştır. Orkide tohumlarının yalnızca %5'ten daha az bir kısmı doğal ortamlarında çimlenebilmektedirler ve bunun olabilmesi adına en uygun iklim şartlarının oluşmasını beklemektedirler. Bu bilgiler doğrultusunda OM+ besi ortamının hem çimlenme süresi bakımından hem de çimlenme oranı bakımından değerleri oldukça yüksektir.

Orchis sancta l. ve *serapias vomeracea* orkide türlerinde yapılan çalışmada bulunan sonuçlarda bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir ve Orchimax aktif kömürlü besi ortamından en yüksek çimlenme oranı tespit edilmiştir (Bektaş, 2014).

Bunlara ek olarak yapılan çalışmalarda inorganik azot kaynağıyla beraber organik azot kaynağı içeren besi ortamlarının orkide tohumlarında daha yüksek oranda çimlenme olduğu bildirilmiştir (Stewart ve Kane, 2006). Çalışma kapsamında kullanılan OM+ ve OM- besi ortamlarında inorganik azotun yanı sıra organik azot kaynağı olan tripton bulunmaktadır. Bu nedenle bu iki ortamdaki çimlenmenin diğer ortamlardan yüksek olmasının nedeninin buldukları organik azot kaynağından kaynaklanabileceği gösterilebilir. Raghavan ve Torrey, 1964; Van Waes ve Debergh, 1986 Malmgren, (1992), orkide tohumlarının çimlenmesinde inorganik azot kaynağının bulunmasının çimlenmeyi inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Literatürde bulunan bu rapor yaptığımız çalışma ile örtüşmektedir.

OM+ ve OM- ortamları arasındaki çimlenme oranının farklılığı OM+ ortamda ekstra olarak kullanılan %1 oranındaki aktif kömürün besi yerinde bulunan tohumlara karanlık bir ortam sağladığı ve böylece çimlenmeyi artırdığı düşünülmektedir. Besi ortamına gelen ışığı engellediği için aktif karbonun köklendirmeyi de artırdığı bildirilmiştir (Paek ve Murthy, 1977). Bununla birlikte aktif karbonun pH seviyesini yükselttiği ve böylece azot alımının teşvik edildiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla büyümenin arttığı sonucuna ulaşılmıştır (Eymar vd, 200). Literatürde bulunan bu sonuçların aksine ortamda bulunan aktif karbonun çimlenmeyi azalttığı sonucu da bildirilmiştir (Waes, 1987).

Çalışmamızda kullandığımız tüm besi ortamlarının pH seviyeleri 5.7-5,8 değer aralıklarına ayarlanmıştır. Ayrıca kültürlenmiş örnekler 23 ± 2 °C sıcaklıkta ve 16/8 saat fotoperiyotta inkübe edilmiştir. Bu pH ve inkübasyon sıcaklıkları daha önce yapılan çalışmalarla da benzerlik göstermektedir. Van Waes ve Deberg (1986) yaptıkları çalışmada ılıman kuşak orkidelerin çimlenmesinde en uygun pH'ın 5,8 olduğunu bildirilmiştir. Orkide tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişiminde sıcaklığın etkisi adına yapılan çalışmada en uygun aralığın 20 – 25 °C olduğu bildirilmiştir (Arditti, 1967a, 1979). Çalışmamızın aksine, Mead ve Bulard (1975), orkide çimlenmesinde karanlık ortamın en ideal koşul olduğunu bildirmişlerdir. *Orchis mascula* tohumlarının çimlenmesinde 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyodunun en optimum süreç olduğu ve sürekli karanlık ortamda inkübe edilen tohumlar da çimlenme görülmediği bildirilmiştir (Valletta ve ark., 2008). Çalışmamızda da denenen 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyot çimlenmede oldukça etkili olmuştur. Karanlık ortamda çimlendirilme denenmemiştir.

Bizim çalışmamızda, tohumlara uygulanan canlılık testleri *Phalaenopsis sp.* tohumlarının tamamının canlı olmadığını göstermiştir. Doğrudan kapsülün açılmasıyla elde edilen tohumların canlılık yüzdeleri ve kontaminasyon oranı sırasıyla 72 ± 4.0 ve 6 ± 0.4 olarak saptandı. Elde edilen canlılık yüzdeleri göz önünde bulundurularak tohumların çimlenme oranları daha sonra hesaplanmıştır.

Literatürde orkide tohumlarının çimlenebilmesi için mikorizal funguslarla simbiyotik bir ilişkilerinin olduğu bilinmektedir. Fungusların bu simbiyotik ilişkide sitokinler ürettikleri ve böylece tohumların çimlendiği belirtilmiştir (Crafts ve Miller, 1974).

Bu tez çalışmasında *Phalaenopsis sp.* tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesinde kültür ortamlarının yanında sitokininler, sitokinin benzeri TDZ ve giberellik asit gibi farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve değişen derişimlerinin etkisi de araştırıldı. Çalışmanın bu aşamasında kontrol grubu olarak büyüme düzenleyicisi içermeyen aktif kömürlü Orchimax (OM+) kullanıldı. TDZ'nin farklı derişimlerini içeren OM+ besi ortamından elde edilen çimlenme sonuçlarına göre, artan TDZ derişimi ile çimlenme yüzdesi arasında negatif ilişki gözlenmiştir. Kinetin (KIN) tohum çimlenmesinde etkisine bakıldığında en yüksek derişimin kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda fark olmamasına karşılık pozitif bir etkisi olduğundan söz edilebilir. Diğer bir büyüme düzenleyicisi 6-BA'da da benzer durum söz konusudur. Burada da derişime bağlı pozitif bir korelasyon olmakla birlikte, TDZ hariç, diğer gruplar ve kontrole göre istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Bu çalışmada diğer büyüme düzenleyicilerine göre çok yüksek derişimleri değerlendirilen adenin hemisülfat'ın (AHS) da kontrol grubuna göre önemli etkisi olmadığı gözlenmiştir. AHS'nin artan derişimleri çimlenme üzerine olumlu etkisi gözlenmiş olsa da istatistiksel fark göstermemiştir. Giberellik asit (GA₃)'in çimlenme üzerine olumlu etkisi görülse de istatistiksel anlamda fark taşımamıştır. Yine de 5,0 ppm giberellik asit uygulamasının canlı tohum yüzdesi ile karşılaştırıldığında yaklaşık %90'a varan çimlenme oranına ulaştığı hesaplanmıştır. Sitokininlerin karasal orkide tohumların çimlenmesinde en etkili hormon olduğu belirtilmiş fakat aynı bitki hormonunun farklı orkide türlerinde değişken etki gösterebileceği ifade edilmiştir (Arditti ve Harrison, 1977). Absisik asidin inhibe edici etkisini kaldıran sitokininlerin böylece tohum çimlenmesine olumlu etki gösterdiği belirtilmiştir (Black vd., 1974).

Orkide tohumlarında çimlenme süreci, çimlenme öncesi, çimlenme, protokorm, rizoid ve sürgün aşamaları şeklinde oluştuğu bildirilmiştir. Protokormlar çimlenmeden sonra fideleri oluşturan yapılardır. Kültür ortamında çimlenen tohumların hepsi protokorma dönüşmemektedir (Yamazaki ve Miyoshi, 2006). Herhangi bir olumsuz durum olmadığı sürece oluşan tüm protokormlar yeni bir fide oluşturabilmektedir (Steaward ve Mapes, 1971). Çalışmamızda, doğrudan organogenez için eksplant kaynağı olacak fideler (bitkicikler) yetiştirmek üzere, farklı ortamlarda çimlenen sağlıklı bitkiler 5,0 ppm 6-BA VE 5,0 ppm kinetin içeren ortamlarda ayrı ayrı büyütüldü. Bu bitkiler her ay taze besi ortamlarına aktarılarak alt kültürü yapıldı.

Beşinci ayın sonunda sürgün, yaprak ve kök oluşturan genç fidelerin sürgün ucu kök ve yapraklarından yaklaşık 10 mm'lik eksplantlar alındı. Sadece sürgün uçlarından pozitif yanıt alındı. Kök ve yaprak eksplantları % 100 oranında kararmayla sonuçlanan yanıt verdi. Buna göre en verimli besi ortamının 5,0 ppm 6-BA ile desteklenmiş ortam olduğu görülmüştür. 0,1; 0,5 ve 1,0 ppm TDZ içeren ortamlardan düşük verim elde edilmiştir. Özellikle 1,0 ppm TDZ'nin kontrol grubuna göre de daha düşük verim sağladığı gözlenmiştir (%41). Eksplanttan elde edilen sürgün veriminde kinetin ve 2-IP'nin de etkili olduğu saptanmıştır. Diğer bitki büyüme düzenleyicisi AHS'nin de diğer uygulamalara göre çok etkili olmadığı görülse de kontrol grubuna göre olumlu yönde farklılık sağlamıştır. Bektaş vd. (2013), kültür ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicilerinin protokorm oluşumunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Bitki dokularının canlı ve sağlıklı olması için tasarlanan temel besi ortamları kültüre alınan eksplantların gelişimsel süreçlerini yönlendirmek üzere bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duymaktadırlar. Bitki büyüme düzenleyicileri üzerinde en çok durulan doku kültürü parametreleridir. Oksin ve sitokinler bitki dokularının organlara farklılaşmasında önemli rol oynarlar. Oksin/sitokin oranının yüksek olması kök oluşumu için, sitokin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumu için ve sitokin/oksin oranının eşit olması kallus oluşumu için kullanılmaktadır (Werbrouck ve Debergh, 1994).

Dört aylık fidelerde uzama miktarına bakıldığında eksplant veriminin aksine TDZ'nin yüksek oranda sürgün uzamasına yol açtığı görülmüştür. Özellikle 0,5 ppm TDZ diğer gruplara göre daha yüksek verim sağlamıştır. Ancak daha yüksek TDZ (1,0 ppm) sürgün boyu uzamasının olumsuz etkilendiği gözlenmişti. Sürgün uzamasında denenen diğer grup AHS de kontrole göre sürgün uzaması sağlamıştır. Burada derişim ile sürgün uzaması arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Burada 200 ppm AHS'nin kayda değer bir sürgün uzaması sağladığı görülmüştür. Kinetin' in sürgün uzamasına etkisinde düşük derişimlerin olumlu etki gösterdiği, yüksek derişimin ise negatif etkide bulunduğu görülmüştür. Sürgün uzaması bakımından en verimli kinetin derişiminin 5.0 ppm olduğu bulunmuştur. 6-BA'nın tüm derişimleri de kontrol grubuna göre daha etkili sonuçlar vermiştir. Derişimler arasında en yüksek verim 5,0 ppm olsa da diğer 6-BA derişimlerine göre istatistiksel anlamda bir fark göstermemiştir. Bu çalışmada değerlendirilen son sitokin grubu büyüme düzenleyicisi 2-IP'nin diğer gruplara göre daha düşük oranda sürgün uzamasına yol açtığı bulunmuştur.

Burada sürgün boyu uzama değerleri 36,96 ila 39,40 mm. arasında değişmektedir. Bu değerler çalışılan tüm büyüme düzenleyicileri arasında en düşük verimleri temsil etmiştir. 2-İP ile sürgün uzaması arasında herhangi bir pozitif ilişki görülmemiştir. Chang ve Chang (2000), yaptıkları çalışmada düşük derişimlerdeki TDZ'nin sürgün oluşumunda olumlu etkileri olduğunu fakat yüksek derişimlerinin kallus ve adventif sürgün oluşumuna etki ettiğinin rapor etmişlerdir. Sadece TDZ'nin kullanılması 6-BA'ya oranlar daha etkili olduğu bildirilmiştir (Ernst, 1994; Chang ve Chang, 1998). Orkidelerde sürgün oluşturma ve çoğaltımı için TDZ'nin olumlu etkisinin olduğu daha önce de literatürde bildirilmiştir (Chen ve Piluek 1995; Nayak vd. 1997; Chen vd. 2004; De Melo Ferreira vd. 2006).

Kök uzaması bakımından tüm sitokinler ve derişimleri kontrole göre olumlu etki göstermiştir. Ancak bu büyüme düzenleyicilerinin kendi aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Oluşan kök sayısı bakımından denenen tüm sitokinler ve derişimlerinin kontrol grubuna göre olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. Burada artan 2-İp hariç artan derişimlerin kök oluşma sayısını azalttığını istatistiksel analizler de göstermiştir. Literatürde, kök oluşumunda oksinlerin ortamda bulunması gerektiği böylece kök oluşumunun teşvik edildiği rapor edilmiştir (Bhojwani ve Razdan, 1983; Preece ve Sutter, 1991; Mansuroğlu ve Gürel, 2001; Aktar vd., 2007; Diaz ve Álvarez, 2009). Bizim çalışmamızda, köklendirme için oksinler kullanılmamıştır. Daha sonra yapılacak çalışmalar için köklendirme de oksin kullanılmasının olumlu etki vereceği düşünülmektedir.

Son olarak yaprak sayısı ortalamasına bakıldığında tüm denemeler arasında belirgin farklılıklar görülmüştür. Özellikle kinetin denenen tüm derişimleri ortalama 6,6-6,8 adet yaprak oluşumu sağlamıştır. Yine 6-BA'nın denenen tüm derişimleri ile TDZ'nin 0,5 ppm derişimi de yaprak oluşumuna olumlu katkı sağlamıştır. Burada genel anlamda 2-İp'nin yaprak oluşumuna diğer bitki büyüme düzenleyicilerine göre daha sınırlı katkı sağladığı, istatistik analiz sonuçları da göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda sitokin grubu büyüme düzenleyicilerinin fizyolojik etkileri arasında sürgün oluşumu üzerine olumlu etki gösterirken yaprak oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Gaspar vd., 1996; Haberer ve Kieber, 2002). Cüce vd. (2013), yaptıkları çalışmada 2,0 mg/L ZEA ile 0,5 mg/L IBA'nın birlikte kullanılmasının yaprak oluşumunu daha çok teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Bizim yaptığımız bu çalışmamızda yalnızca sitokininler ve farklı derişimleri denenmiştir. Daha sonra yapılacak çalışmalar için oksin ve sitokininlerin beraber kullanılmasının yaprak oluşumu üzerinde daha olumlu etki edeceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışması ile bir orkide türü olan *Phanaelopsis sp.* bitkisi tohumlarının in vitro çimlenmesi üzerine temel besi ortamları ve gibereellik asit ile sitokininler grubunda yer alan bazı büyüme düzenleyicilerinin etkisi araştırılmış, sonrasında in vitroda oluşturulan fidelerden farklı eksplantlar alınarak doğrudan organogenez ile bu bitkilerin in vitro çoğaltımı gerçekleştirilmiştir.

İlerleyen aşamalarda çalışmanın devamı niteliğinde;

- Bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerini belirlemede yaprak ve kök oluşumu üzerine sitokininlerle beraber oksinlerinde denenmesi,
- Dolaylı organogenez için sitokininler ile oksinlerin eşit oranda kullanıldığı ve kallus oluşumunun incelenmesi,
- Protokorm benzeri yapılar sürgün ve kök oluşturma yeteneğine sahip çok sayıda meristematik hücre merkezinin birleşiminden oluşan yapılardır (Da Silva vd., 2000). *Phanaelopsis sp.* sentetik tohumları protokorm benzeri yapıların (PBY) alginat ile kaplanarak oluşturulması,
- Oluşturulan sentetik tohumların kültür ortamında ve toprak koşullarındaki çimlenebilme kabiliyetlerinin araştırılması,
- Kültür ortamında yetiştirilen fidelerin dış ortama adaptasyonu çalışmaları gibi yeni araştırma başlıkları altında sunulabilir.

KAYNAKLAR

- Aka-Kacar, Y., Yılmaz, N., 2001. Yalcın-Mendi, Y., Kuden, A. ve Cetiner, S., *In vitro* Besi Ortamında Kullanılan Değişik Katılaştırıcı Maddelerinin ve Farklı pH Duzeylerinin Bazı Kiraz (*Prunus avium* L.) Anaçlarının Çoğaltılması Üzerine Etkileri. I. Sert Cekirdekli Meyveler Sempozyumu, Yalova, Bildiriler Kitabı 161- 166.
- Akça, Ş. B. (2021). İç mekân Süs Bitkileri Tüketici Tercihlerinin Belirlenmesi; Zonguldak Kenti Örneği. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 427-435.
- Andersen, T. F., & Rasmussen, H. N. (1996). The mycorrhizal species of Rhizoctonia. In *Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control* (pp. 379-390): Springer.
- Andrade, L. B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G. F., & Rota, L. (1999). The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant cell, tissue and organ culture*, 56(2), 79-83.
- Arditti, J., 1967. Factors affecting of orchid seeds, *Botanical Review*, 33, 1-97.
- Arditti, J., 1979. Aspects of the physiology of orchids. In: Woolhouse H. W. (eds.), *Advances in Botanical Research*. 7, Academic Pres, New York, 422-697.
- Arditti, J. (1984). An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 89(4), 359-381.
- Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. In *The New Phytologist* (pp. 367-421). Cambridge: Cambridge University Press.
- Arditti, J. ve Harrison, C. R., 1977. Vitamin requirements and metabolism in orchids. In: Arditti, J. (eds.), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. Cornell Univ. Press, New York, 157-175.
- Aytar, E., & Kömpe, Y. (2021). Orkidelerin Geleneksel Kullanımları, Fitokimyasal İçerikleri ve Biyolojik Aktiviteleri. *Black Sea Journal of Engineering and Science*. doi:10.34248/bsengineering.909879
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., & Akbudak, M. A. (2001). Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri. *Editörler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan*, *Bitki Biyoteknolojisi*, 1, 1-35.
- Bektaş, E. (2014). *Orchis sancta* l. Ve *Serapias vomeracea* (burm. F.) Briq. *Karadeniz teknik üniversitesi*, 1.
- Bektaş, E., Cüce, M. ve Sökmen, A., 2013. *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey, *Turkish Journal of Botany*, 37, 336-342.
- Bektaş, E. (2014). *Orchis sancta* l. ve *Serapias vomeracea* (BURM. F.) briq. türlerinin bitki doku kültürü yöntemiyle üretimi.
- Black, M., Bewley, J. D. ve Fountain, D., 1974. Lettuce seed germination and cytokinins: their entry and formation, *Planta*, 117, 2, 145-152.
- Bournman, C. H., 1994. Micropropagation and Somatic embriyogenesis. In: Hayward, M.D., Bosemark, N.O. and Romgaso, I. (eds.), *Plant Breeding; Principles and Prospects*. Chapman and Hall, London, 246-260.
- Chang, C. ve Chang, W.C., 1998. Plant regeneration from callus culture of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors*, *Plant Cell Reports*, 17, 251-255.

- Chen, J. T ve Chang, W. C., 2000. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Oncidium* (Orchidaceae), *Plant Science*, 160, 2160, 87-93.
- Crafts, C. B. ve Miller, C. O., 1974. Detection and identification of cytokinins produced by mycorrhizal fungi, *Plant Physiology*, 54, 586-588.
- Da Silva, A. L. S., Moraes-Fernandes, M. I. ve Ferreira, A. G., 2000. Ontogenetic events in androgenesis of Brazilian barley genotypes, *Revista Brasileira de Biologia*, 60, 315- 319.
- De, L. C., Barman, D., Medhi, R. P., Chhetri, G., & Pokhrel, H. (2013). Production technology of Phalaenopsis. *Technical Bulletin*, (15), 26.
- De Melo Ferreira, W., Barbante Kerbauy, G. ve Pimentel Costa, A. P., 2006. Micropropagation and genetic stability of *Dendrobium* hybrid (Orchidaceae), *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 42, 568-571.
- Díaz, M. S. S. ve Álvarez, C. C., 2009. Plant regeneration through direct shoot formation from leaf cultures and from protocorm-like bodies derived from callus of *Encyclia mariae* (Orchidaceae), a threatened Mexican orchid, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45, 162-170.
- Dormont, L., Fort, T., Bessière, J.-M., Proffit, M., Hidalgo, E. G., Buatois, B., & Schatz, B. (2020). Sources of floral scent variation in the food-deceptive orchid *Orchis mascula*. *Acta Oecologica*, 107, 103600.
- Enoki, S., & Takahara, Y. (2014). Development of a Highly Efficient and Simple Micropropagation System for Phalaenopsis Using Elongated Protocorm-like Bodies Induced by Skotomorphogenesis under Dark Conditions. *Journal of The Japanese Society for Horticultural Science*, 83, 149-155.
- Ernst, R., 1994. Effect of thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 39, 273–275.
- Eymar, E., Alegre, J., Toribio, M. ve Lo' pez-Vela, D., 2000. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 63, 57-65.
- Fay, M. F. (2018). Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Botanical studies*, 59(1), 1-6.
- Gaba, V. P. (2005). Plant growth regulators in plant tissue culture and development. In *Plant development and biotechnology* (pp. 87-99). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penei, C., Greppin, H., Reid, D. M. ve Thorpe, T. A., 1996. Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture, *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 32, 272-289.
- Genç, T. M. Süs bitkisi yetiştiriciliği (propagation of ornamental plants): temel bitki çoğaltma yöntemleri (main propagation methods of plants). *Musa genç kitablığı*.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). Plant propagation by tissue culture. Volume I. The background. *Plant Propagation by Tissue Culture, 1*, 205-226.
- Guo WJ, Lee N (2006) Effect of leaf and plant age, and day/night temperature on net CO₂ uptake in *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*. *J Amer Soc Hort Sci* 131:320–326

- Gümüş, C., Sezik, E. ve Ellialtıoğlu, Ş., 2008. Batı Karadeniz Bölgesi'nde yetişen ve salep elde edilen bazı orkide (Orchidaceae sp.) türlerinin doku kültürü ile çoğaltılması üzerinde bir araştırma. III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi. Kasım, İzmir, Bildiriler Kitabı 179-187.
- Haberer, G. ve Kieber, J. J., 2002. Cytokinins: New Insights into a Classic Phytohormone. *Plant Physiology*, 128, 354-362.
- Hadley, G., Orchid Mychorriza. In: Arditti J. (eds.), *Orchid Biology, Review and Perspectives*. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY, 1982.
- Hartman, H. T. ve Kester, D. E., *Plant Propagation - Principles and Practices*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1975.
- Harvais, G. ve Hadley, G., 1967b. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures, *New Phytologist*, 66, 217-
- Hatipoğlu, R., 1995, *Biyoteknolojiye Giriş*. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Ders Kitabı No: 129, sf. 56-71.
- Hinsley, A., de Boer, H. J., Fay, M. F., Gale, S. W., Gardiner, L. M., Gunasekara, R. S., . . . Phelps, J. (2017). A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4), 435-455. doi:10.1093/botlinnean/box083
- Hinsley, A., De Boer, H. J., Fay, M. F., Gale, S. W., Gardiner, L. M., Gunasekara, R. S., .. & Phelps, J. (2018). A review of the trade in orchids and its simplifications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4), 435-455.
- Hsu, C. C., Chen, S. Y., Chiu, S. Y., Lai, C. Y., Lai, P. H., Shehzad, T., ... & Chen, H. H. (2022). High-density genetic map and genome-wide association studies of aesthetic traits in *Phalaenopsis* orchids. *Scientific reports*, 12(1), 1-15.
- Hossain, M. M. (2011). Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances an overview. *Fitoterapia*, 82(2), 102-140.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 1.
- Jersáková, J., Johnson, S. D., & Kindlmann, P. (2006). Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological reviews*, 81(2), 219-235.
- Kamemoto, H., Amore, T. D., & Kuehnle, A. R. (1999). *Breeding Dendrobium orchids in Hawaii*: University of Hawaii Press.
- Karagüzel, O., Korkut, A. B., Özkan, B., Çelikel, F. G., & Titiz, S. (2010). Süs bitkileri üretiminin bugünkü durumu, geliştirilme olanakları ve hedefleri. *Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, 11(15), 1-20.
- Ket, N. V., Hahn, E. J., Park, S. Y., Chakrabarty, D., & Paek, K. Y. (2004). Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biologia plantarum*, 48, 339-344.
- Kreutz, C. A. J., *Die Orchideen in der Türkei*, 1998.
- Krikorian A.D., Berquam D.L. (2003) *Plant Cell and Tissue Cultures: The Role of Haberlandt*. In: Laimer M., Rücker W. (eds) *Plant Tissue Culture*. Springer, Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6040-4_2
- Kuo, H. L., Chien, J. T. ve Chang, W. C., 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embriyogenesis from leaf explant of *Phalaoenopsis* Little steve, *In Vitro cellular and developmental Biology-Plant*, 41, 453-456.
- Lauzer, D. E. N. I. S., St-Arnaud, M. A. R. C., & Barabe, D. E. N. I. S. (1994). Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 9(3), 197-204
- Lee, S. Y., Nielsen, J., & Stephanopoulos, G. (2017). *Applied bioengineering: innovations and future directions* (Vol. 5). John Wiley & Sons

- Liu, Q., Wang, X.-L., Finnegan, P. M., & Gao, J.-Y. (2020). Reproductive ecology of *Paphiopedilum spicerianum*: Implications for conservation of a critically endangered orchid in China. *Global Ecology and Conservation*, 23, e01063.
- Mansuroğlu, S. ve Gürel, E., 2001. Mikroçoğaltım. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (eds.), Bitki Biyoteknolojisi I - Doku Kültürü ve Uygulamaları. 262-281, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Mead, J. W. ve Bulard, C., 1975. Effects of vitamins and nitrogen sources on asymbiotic germination and development of *Orchis laxiflora* and *Ophrys sphegodes*, *New Phytologist*, 74, 1, 33-40.
- Monier, M., 1990. Induction of embriyogenesis in callus culture. In: Pollard, J.W., Walker, J.M. (eds.), *Plant Cell and Tissue Culture*. 141-148, Humana Press, New Jersey.
- Mweetwa, A. M., Welbaum, G. E., & Tay, D. (2008). Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on in vitro germinability of *Phalaenopsis* seeds. *Scientia Horticulturae*, 117(3), 257-262.
- Özkoç, İ. ve Dalcı, M., 1991. Bazı orkide türlerine ait tohumların çimlenmesi üzerinde yüzey sterilizasyonunda kullanılan sodyumhipokloritin etkisi, *Ondokuzmayıs Üniv. Fen Dergisi*, 3, 1, 116-122.
- Paek, K. Y. ve Murthy, H. N., 1977. Temperate Oriental Cymbidium species. In: Kull, T., Arditti, J. (eds.), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. VIII. Edition, 287, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Park, S.-Y., Huh, Y.-S., & Paek, K.-Y. (2018). Common Protocols in Orchid Micropropagation. In *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols* (pp. 179). New York: Springer Protocols Handbooks.
- Schiestl, F. P. (2005). On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. *Naturwissenschaften*, 92(6), 255-264.
- Schwann Th. (1839) *Mikroskopische Untersuchung über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzten*, Berlin, 1 vol. in 80.
- Sheelavanthmath, S. S., Murthy, H. N., Hema, B. P., Hahn, E. J. ve Paek, K. Y., 2005. High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of *Aerides crispum*, *Scientia Horticulturae*, 106, 395-401.
- Simpson, M. G. (2019). *Plant systematics*: Academic press.
- Steward, F. C. ve Mapes, M. O., 1971. Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of *Asparagus*, *Botanical Gazette*, 133, 70-79.
- Stewart, L. S. ve Kane, M. E., 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 2, 147-158.
- Tokuhara, K., & Mii, M. (1993). Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports*, 13, 7-11.
- Tollsten, L., & Bergström, J. (1989). Variation and post-pollination changes in floral odours released by *Platanthera bifolia* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany*, 9(4), 359-362.
- Ural, Y. (2021). Ticari önemi yüksek bazı lavanta (*Lavandula* sp.) çeşitlerinin in vitro mikroçoğaltım özelliklerinin araştırılması (Master's thesis).
- Utami, E. S. W., & Hariyanto, S. (2019). In vitro seed germination and seedling development of a rare indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* JJ Sm. *Scientifica*, 2019.

- Valletta, A., Attorre, F., Bruno, F. ve Pasqua, G., 2008. *In vitro* asymbiotic germination of *Orchis mascula* L., Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 142, 3, 653-655.
- Van Waes, J. M. ve Debergh, P. C., 1986. *In vitro* germination of some Western European Orchids, Physiologia Plantarum, 67, 253-261.
- Waes, J. V., 1987. Effect of Activated Charcoal on *In Vitro* Propagation of Western European Orchids. Symposium on *In Vitro* Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants, Eylül, Gembloux, Belgium, ISHS Acta Horticulturae 212.
- Warren, R., 1981. Orchids from seed-Part II: Sowing the seed, The Orchid Review, 89, 149-151.
- Werbrouck, S. P. O. ve Debergh, P. C., 1994. Applied aspects of plant regeneration (micropropagation). In: Dixon, R.A and Gonzales, R.A. (eds.) Plant Cell Culture - A Pratical Approach. 127-135, Oxford University Press, New York.
- Wotavova-Novotna, K., Vejsadova, H. ve Kindlmann, P., 2007. Effects of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species, Biologia Plantarum, 51, 1, 198-200.
- Yamazaki, J. ve Miyoshi, K., 2006. *In vitro* Asymbiotic Germination of Immature Seed and Formation of Protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae), Annals of Botany, 98, 1197-1206.
- Yazgan, M. E., Korkut, A. B., Barış, E., Erkal, S., Yılmaz, R., Erken, K., ... & Özyavuz, M. (2005). Süs bitkileri üretiminde gelişmeler. Ziraat Mühendisleri Odası Teknik Kongresi, 3(7).
- Zahara, M., Datta, A., Boonkorkaew, P., & Mishra, A. (2017). The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* hybrid 'Pink'. Brazilian Archives of Biology and Technology, 60.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: E**e Ö***N
Doğum Yeri ve Tarihi: Y*****r, 1**7
E-posta: E*****7@*****m
Lisans: Necmettin Erbakan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2**5-2**9)
Yüksek Lisans: Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Anabilim Dalı (2**9-2**3)

