

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**KİTOSAN İLE BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN
SERAPIAS VOMERACEA'NİN *IN VITRO* FİZYOLOJİSİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

ARDA ACEMİ

KOCAELİ 2018

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

KİTOSAN İLE BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN
***SERAPIAS VOMERACEA*'NİN *IN VITRO* FİZYOLOJİSİ**
ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ARDA ACEMİ

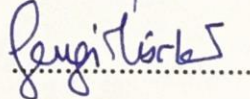
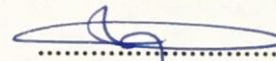
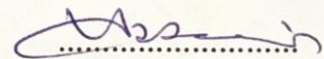
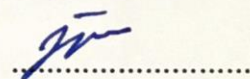
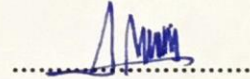
Prof. Dr. Fazıl ÖZEN
Danışman, Kocaeli Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ
Jüri Üyesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE
Jüri Üyesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Doç. Dr. Özlem AKSOY
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Sevgi TÜRKER KAYA
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniversitesi



Tezin Savunulduğu Tarih: 21.06.2018

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tezde model organizma olarak ele alınmış olan *Serapias vomeracea* üzerinde kitosan biyopolimerinin doğal bir bitki büyüme artırıcısı olarak orkidelerde sebep olabileceği fizyolojik değişikliklerin yaygın olarak kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin etkileri ile kıyaslanarak ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bitki yetiştiriciliğinde giderek artan kimyasal madde kullanımına alternatif, çevre dostu ve güvenilir bitki büyüme artırıcılarına olan ihtiyaç ileriki zamanlarda kitosan ve benzer biyopolimerlerin önemini ortaya çıkaracaktır.

Yükseköğrenimim boyunca bana sonsuz bir çalışma alanı özgürlüğü tanıyan danışmanım Prof. Dr. Fazıl Özen'e, ilk laboratuvar deneyimimi kendisinin desteğiyle kazandığım Prof. Dr. İbrahim Özkoç'a, kendisinden kısa zamanda çok fazla bilgi edindiğim Dr. Öğr. Üyesi Sevgi Türker-Kaya'ya, bu tezde kullandığım kromatografik tekniklerin tamamını kendisinden öğrendiğim merhum Doç. Dr. Nour Eddine El Gueddari'ye, tez izleme ve tez savunmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Yasemin Özden Kömpe ve Doç. Dr. Özlem Aksoy'a, akademik hayatımda bana katkı sağlayan diğer tüm hocalarıma, desteklerinden dolayı aileme, yol arkadaşım Ruhiye Kıran'a, yolculuklarda büyüdüğüm şehirlerarası yollara ve geleceğe dair hala kurmakta olduğum tüm hayallere içtenlikle teşekkür ederim.

Haziran - 2018

Arda ACEMİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	5
1.1. Tezde Kullanılan Bitki Materyali.....	5
1.1.1. Ochidaceae familyası üyelerinin genel özellikleri.....	5
1.1.2. <i>Serapias vomeracea</i> 'nin biyolojik özellikleri.....	6
1.1.3. <i>Serapias vomeracea</i> 'nin ekonomik değeri	8
1.2. Bitki Doku Kültürü Bilimi	9
1.2.1. Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD).....	9
1.2.2. Diğer besiyeri katkı maddeleri	15
1.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	18
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
2.1. Bitki Materyali	22
2.1.1. Tohum canlılığının belirlenmesi.....	22
2.2. Besiyerlerinin Hazırlanması	23
2.3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	25
2.4. Diğer Besiyeri Katkı Maddelerinin Hazırlanması	25
2.5. Kitosan Oligomerleri ve Polimerinin Karakterizasyonu	26
2.6. Doku Kültürü Denemeleri	27
2.6.1. Tohumların yüzeysel sterilizasyonu	27
2.6.2. Özgün yüzeysel sterilizasyon protokolünün geliştirilmesi.....	28
2.6.3. Tohumların besiyerlerine ekimi.....	29
2.6.4. Tohumların sayımı ve değerlendirme.....	30
2.6.5. Protokormların besiyerine aktarılması.....	32
2.6.6. Büyüme parametrelerinin değerlendirilmesi	32
2.6.7. Kültür şartları.....	33
2.7. FTIR Spektroskopisi Çalışmaları	33
2.7.1. FTIR için doku örneklerinin hazırlanması	33
2.7.2. FTIR spektrumlarının eldesi.....	33
2.7.3. FTIR spektrumlarının analizi.....	34

2.7.4. Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA).....	34
2.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz	35
3. BULGULAR.....	36
3.1. Tohum Canlılığının Belirlenmesine Ait Bulgular	36
3.2. Kitosanların Karakterizasyonuna Ait Bulgular	36
3.3. Yüzeysel Sterilizasyon Denemelerine Ait Bulgular.....	38
3.4. Faz 1 Besiyerlerinde Çimlendirme Denemelerine Ait Bulgular	38
3.4.1. Katı besiyerlerine ait bulgular	38
3.4.2. Sıvı besiyerlerine ait bulgular.....	41
3.5. Faz 2 Besiyerlerinde Çimlendirme Denemelerine Ait Bulgular	43
3.5.1. Muz homojenatı denemelerine ait bulgular	43
3.5.2. Sükroz denemelerine ait bulgular	44
3.5.3. Hindistan cevizi suyu denemelerine ait bulgular.....	45
3.5.4. Aktif kömür denemelerine ait bulgular	46
3.5.5. Sükroz yerine muz homojenatı kullanımına ait bulgular	47
3.5.6. Sükroz yerine hindistan cevizi suyu kullanımına ait bulgular.....	48
3.5.7. 6-benzilaminopürin denemelerine ait bulgular.....	49
3.5.8. Kinetin denemelerine ait bulgular	51
3.5.9. İndol-3-asetik asit denemelerine ait bulgular	53
3.5.10. İndol-3-bütirik asit denemelerine ait bulgular	55
3.5.11. Jasmonik asit denemelerine ait bulgular.....	57
3.5.12. Oligomerik kitosan denemelerine ait bulgular	59
3.5.13. Polimerik kitosan denemelerine ait bulgular	61
3.6. Faz 2 Besiyerlerinde Protokorm Oluşumlarına Ait Bulgular	65
3.7. Bitki Büyüme Verilerine Ait Bulgular	68
3.7.1. Kontrol besiyerine ait bulgular	68
3.7.2. Muz homojenatı denemelerine ait bulgular	68
3.7.3. Hindistan cevizi suyu denemelerine ait bulgular.....	70
3.7.4. 6-benzilaminopürin denemelerine ait bulgular.....	71
3.7.5. Kinetin denemelerine ait bulgular	74
3.7.6. İndol-3-asetik asit denemelerine ait bulgular	76
3.7.7. İndol-3-bütirik asit denemelerine ait bulgular.....	78
3.7.8. Jasmonik asit denemelerine ait bulgular.....	80
3.7.9. Oligomerik kitosan denemelerine ait bulgular	82
3.7.10. Polimerik kitosan denemelerine ait bulgular	84
3.7.11. Bitki büyüme verilerinin toplu karşılaştırması	86
3.8. FTIR Verilerine Ait Bulgular	92
3.8.1. Yaprak spektrumlarına ait bulgular	94
3.8.2. Kök spektrumlarına ait bulgular.....	108
3.9. Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA) Verilerine Ait Bulgular	115
4. TARTIŞMA	120
4.1. Doku Kültürü Çalışmaları	120
4.1.1. Yüzeysel sterilizasyon	120
4.1.2. Tohum canlılığı	121
4.1.3. Besiyerinin fiziksel durumu.....	122
4.1.4. Besiyerlerinin çimlendirme başarısı	123
4.1.5. Besiyerine muz homojenatı ilavesi.....	124
4.1.6. Besiyerindeki sükroz seviyesi	124

4.1.7. Besiyerine hindistan cevizi suyu ilavesi	125
4.1.8. Besiyerine aktif kömür ilavesi	126
4.1.9. Besiyerine sitokin ilavesi	127
4.1.10. Besiyerine oksin ilavesi	128
4.1.11. Besiyerine jasmonik asit ilavesi	129
4.1.12. Besiyerine kitosan ilavesi	130
4.2. FTIR Çalışmaları	133
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	142
KAYNAKLAR	143
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER	155
ÖZGEÇMİŞ	159



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>Serapias vomeracea</i> 'nin doğadaki görünümü	6
Şekil 1.2.	<i>Serapias spp.</i> 'de çiçeğin genel görünümü ve kısımları	7
Şekil 1.3.	<i>Serapias vomeracea</i> 'nin Türkiye'deki yayılış haritası.	7
Şekil 1.4.	6-benzilaminopürinin kimyasal yapısı	10
Şekil 1.5.	Kinetinin kimyasal yapısı	11
Şekil 1.6.	İndol-3-asetik asitin kimyasal yapısı	12
Şekil 1.7.	İndol-3-bütirik asitin kimyasal yapısı	12
Şekil 1.8.	Jasmonik asitin kimyasal yapısı	13
Şekil 1.9.	Kitosanın kimyasal yapısı	14
Şekil 1.10.	Farklı bölgeler arasındaki sınırları gösteren elektromanyetik spektrum.....	18
Şekil 1.11.	Moleküllerde görülen titreşimsel hareketler	20
Şekil 2.1.	<i>Serapias vomeracea</i> tohumlarının mikroskop görüntüleri	22
Şekil 2.2.	Tetrazolyum canlılık testi sırasında gerçekleşen reaksiyon.....	23
Şekil 2.3.	Tohumların yüzeysel sterilizasyon basamakları için akış şeması.....	29
Şekil 3.1.	TTC testi sonunda boyanan canlı embriyolar	36
Şekil 3.2.	HP-SEC-RID-MALLS kromatogramında denemelerde kullanılan oligomerik ve polimerik kitosan fraksiyonlarının görünümü	37
Şekil 3.3.	MALDI-TOF-MS kromatogramında gözlenen bazı oligomerler	37
Şekil 3.4.	Katı ve sıvı besiyerlerinden alınan çimlenme verilerinin karşılaştırılması	43
Şekil 3.5.	Farklı besiyerlerinden alınan tohum çimlenme oranı verilerinin karşılaştırılması.....	64
Şekil 3.6.	Farklı besiyerlerinden alınan protokorm oluşum oranı verilerinin karşılaştırılması.....	67
Şekil 3.7.	Kontrol besiyerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> bitkisinin görüntüsü	68
Şekil 3.8.	Muz homojenatı katkılı besiyerlerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin görüntüsü.....	69
Şekil 3.9.	Hindistan cevizi suyu katkılı besiyerlerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin görüntüsü	70
Şekil 3.10.	6-benzilaminopürin katkılı besiyerlerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin görüntüsü.....	71
Şekil 3.11.	Kinetin katkılı besiyerlerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin görüntüsü	74
Şekil 3.12.	İndol-3-asetik asit katkılı besiyerlerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin görüntüsü.....	76
Şekil 3.13.	İndol-3-bütirik asit katkılı besiyerlerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin görüntüsü.....	78
Şekil 3.14.	Jasmonik asit katkılı besiyerlerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin görüntüsü.....	80
Şekil 3.15.	Kitosan oligomerleri katkılı besiyerlerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin görüntüsü	82

Şekil 3.16. Kitosan polimeri katkılı besiyerlerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin görüntüsü.....	84
Şekil 3.17. Farklı besiyerlerinden alınan sürgün uzunluğu verilerinin karşılaştırılması	87
Şekil 3.18. Farklı besiyerlerinden alınan kök uzunluğu verilerinin karşılaştırılması	88
Şekil 3.19. Farklı besiyerlerinden alınan kök sayısı verilerinin karşılaştırılması.....	89
Şekil 3.20. Farklı besiyerlerinden alınan yumru çapı verilerinin karşılaştırılması.....	90
Şekil 3.21. Farklı besiyerlerinden alınan yumru sayısı verilerinin karşılaştırılması.....	91
Şekil 3.22. PG-4 besiyerinde büyütülen <i>S. vomeracea</i> 'de yaprak dokusuna ait ikincil türev FTIR spektrumu	93
Şekil 3.23. Farklı besiyerlerinde yetiştirilmiş <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin yaprak dokularına ait ikincil türev FTIR spektrumları (2961-2818 cm ⁻¹ frekans aralığında)	95
Şekil 3.24. Farklı besiyerlerinde yetiştirilmiş <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin yaprak dokularına ait ikincil türev FTIR spektrumları (1806-1682 cm ⁻¹ frekans aralığında)	97
Şekil 3.25. Farklı besiyerlerinde yetiştirilmiş <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin yaprak dokularına ait ikincil türev FTIR spektrumları (1691-1623 cm ⁻¹ frekans aralığında)	99
Şekil 3.26. Farklı besiyerlerinde yetiştirilmiş <i>S. vomeracea</i> bitkilerinin yaprak dokularına ait ikincil türev FTIR spektrumları (1583-1442 cm ⁻¹ frekans aralığında)	101
Şekil 3.27. BAN besiyeri grubunun 1716-1460 cm ⁻¹ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.....	115
Şekil 3.28. COW besiyeri grubunun 1716-1460 cm ⁻¹ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.....	116
Şekil 3.29. BAP besiyeri grubunun 1716-1460 cm ⁻¹ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.....	116
Şekil 3.30. KIN besiyeri grubunun 1716-1460 cm ⁻¹ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.....	116
Şekil 3.31. IAA besiyeri grubunun 1716-1460 cm ⁻¹ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.....	117
Şekil 3.32. IBA besiyeri grubunun 1716-1460 cm ⁻¹ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.....	117
Şekil 3.33. JAS besiyeri grubunun 1716-1460 cm ⁻¹ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.....	117
Şekil 3.34. CHI besiyeri gruplarının 1716-1460 cm ⁻¹ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.....	118
Şekil 3.35. Tüm besiyeri gruplarının 1716-1460 cm ⁻¹ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi.....	119

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. KN, VW, MS ve LN besiyerlerinin içerikleri.....	24
Tablo 2.2. Tohum çimlendirmesinde birinci fazda kullanılan bazal besiyerleri	30
Tablo 2.3. Tohum çimlenme safhaları	30
Tablo 2.4. Tohum çimlendirmesinde ikinci fazda kullanılan besiyerleri.....	31
Tablo 2.5. Bitki büyümesinde kullanılan besiyerleri	32
Tablo 3.1. dH ₂ O inkübasyonunun tohum canlılık testi sonuçlarına etkisi.....	36
Tablo 3.2. Çeşitli yüzeysel sterilizasyon uygulamalarının başarı dereceleri	38
Tablo 3.3. Farklı katı besiyerlerinin <i>Serapias vomeracea</i> tohumlarının çimlenmesine olan etkileri.....	40
Tablo 3.4. Farklı sıvı besiyerlerinin <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	42
Tablo 3.5. Farklı muz homojenatı miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri	44
Tablo 3.6. Farklı sükroz miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	45
Tablo 3.7. Farklı hindistan cevizi suyu miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	46
Tablo 3.8. Farklı aktif kömür miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri	47
Tablo 3.9. Sükroz yerine muz homojenatı kullanımının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	48
Tablo 3.10. Sükroz yerine hindistan cevizi suyu kullanımının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	49
Tablo 3.11. Farklı 6-benzilaminopürin miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	50
Tablo 3.12. Farklı kinetin miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	52
Tablo 3.13. Farklı indol-3-asetik asit miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	54
Tablo 3.14. Farklı indol-3-bütirik asit miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	56
Tablo 3.15. Farklı jasmonik asit miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri	58
Tablo 3.16. Farklı oligomerik kitosan (1 kDa) miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	60
Tablo 3.17. Farklı polimerik kitosan (10 kDa) miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	62
Tablo 3.18. Farklı polimerik kitosan (100 kDa) miktarlarının <i>S. vomeracea</i> tohumlarının <i>in vitro</i> çimlenmesine olan etkileri.....	63
Tablo 3.19. Muz homojenatının <i>S. vomeracea</i> 'de bitki büyümesi üzerine etkileri	70

Tablo 3.20. Hindistan cevizi suyunun <i>S. vomeracea</i> 'de bitki büyümesi üzerine etkileri	71
Tablo 3.21. 6-benzilaminopürinin <i>S. vomeracea</i> 'de bitki büyümesi üzerine etkileri	73
Tablo 3.22. Kinetinin <i>S. vomeracea</i> 'de bitki büyümesi üzerine etkileri.....	75
Tablo 3.23. İndol-3-asetik asitin <i>S. vomeracea</i> 'de bitki büyümesi üzerine etkileri	77
Tablo 3.24. İndol-3-bütirik asitin <i>S. vomeracea</i> 'de bitki büyümesi üzerine etkileri	79
Tablo 3.25. Jasmonik asitin <i>S. vomeracea</i> 'de bitki büyümesi üzerine etkileri.....	81
Tablo 3.26. Oligomerik kitosanın <i>S. vomeracea</i> 'de bitki büyümesi üzerine etkileri	83
Tablo 3.27. Polimerik kitosanın <i>S. vomeracea</i> 'de bitki büyümesi üzerine etkileri	85
Tablo 3.28. <i>S. vomeracea</i> 'nin yaprak dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslar üzerine besiyerlerinin etkileri.....	104
Tablo 3.29. <i>S. vomeracea</i> 'nin yaprak dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslara ait absorbanlar üzerine besiyerlerinin etkileri.....	106
Tablo 3.30. <i>S. vomeracea</i> 'nin kök dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslar üzerine besiyerlerinin etkileri	111
Tablo 3.31. <i>S. vomeracea</i> 'nin yaprak dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslara ait absorbanlar üzerine besiyerlerinin etkileri.....	113
Tablo 4.1. Spektrumların analizinde odaklanılan bantlar ve temsil ettikleri moleküler gruplar.....	135

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μg	:	Mikrogram
μl	:	Mikrolitre
μm	:	Mikrometre
μM	:	Mikromolar
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
l	:	Litre
cm	:	Santimetre
g	:	Gram
$^{\circ}\text{C}$:	Santigrat derece
γ	:	Gama
β	:	Beta
m	:	Kütle, (g)
v	:	Hacim, (ml)
dk	:	Dakika
psi	:	Pound/inç kare
\approx	:	Yaklaşık

Kısaltmalar

2,4-D	:	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
ACH	:	Aktif Kömür
ASK	:	1-Aminosiklopropan-1-Karboksilik Asit
BAP	:	6-Benzilaminopürin
BAN	:	Muz Homojenatı
BBA	:	Bitki Büyüme Artırıcı
BBD	:	Bitki Büyüme Düzenleyici
CHI	:	Kitosan
COW	:	Hindistan Cevizi Suyu
DTGS	:	Döteryumlanmış Triglisin Sülfat
FTIR	:	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
IAA	:	İndol-3-asetik Asit
IBA	:	İndol-3-bütirik Asit
JAS	:	Jasmonik Asit
KIN	:	Kinetin
ME-JA	:	Metil Jasmonat
SUC	:	Sükroz
UV	:	Ultraviyole

KİTOSAN İLE BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN *SERAPIAS VOMERACEA*'NİN *IN VITRO* FİZYOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışma kısmi *N*-asetile oligomerik ve polimerik kitosanlar ile yaygın kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinin *Serapias vomeracea*'de sebep oldukları *in vitro* fizyolojik değişimleri açığa çıkarmak için yürütüldü. *S. vomeracea* tohumlarının çimlenmesinde en yüksek başarı % 77,31 oranla % 0,25 aktif kömür katkılı Knudson C besiyerinden sağlandı. Bitki büyümesinde tüm parametreler göz önüne alındığında ideal gelişimi sağlayan uygulamalar aynı besiyerinde %3 muz homojenatı (BAN) ve çeşitli konsantrasyonlarda kitosan uygulamaları (CHI) oldu. BAN, hindistan cevizi suyu (COW) ve jasmonik asit (JAS) uygulamaları *S. vomeracea*'nin yaprak ve köklerdeki hücrelerin zar yapılarının daha düzenli hale gelmesini sağlarken, 6-benzilaminopürin (BAP) ve indol-3-asetik asit (IAA) uygulamaları hücre duvarındaki lignin moleküllerinin esterleşme derecelerini artırdı. Polimerik kitosan (CHI-10) uygulamaları yaprak dokularında protein ve pektin miktarını artırırken, BAN uygulaması ise bunların yanı sıra yaprak dokularındaki ligninleşmeyi de uyardı. *S. vomeracea*'nin kök dokularında JAS ve CHI uygulamaları protein, su bağlı pektin ve ligninler, hidrosinamik asit ve alkaloid miktarlarında artmaya neden oldu. Düşük konsantrasyonda CHI-10 ve JAS uygulamaları ile yüksek konsantrasyondaki oligomerik kitosan (CHI-1) uygulamasının köklerde ksiloglukan, ramnogalakturonan ve β -galaktan miktarını artırdığı bulundu. Glukomannan içeriği açısından ise en olumlu etki indol-3-bütirik asit (IBA), CHI-1 ve IAA uygulamalarından sağladı. Bu çalışmayla birlikte iyi karakterize edilmiş kitosanın orkide yetiştiriciliğinde sentetik bitki büyüme düzenleyicilerine karşı çevre dostu, biyobozunur ve güvenilir bir alternatif olduğu ortaya konmuş oldu. Ayrıca FTIR spektroskopisinin sunduğu avantajların bitki doku kültürü uygulamalarına entegre edilmesiyle bitkide gerçekleşen fizyolojik değişimlerin molekül düzeyinde aydınlatılmasına olanak sağlandı.

Anahtar Kelimeler: Bitki Büyüme Düzenleyicileri, FTIR Spektroskopisi, Kitosan, Biyopolimer, *Serapias vomeracea*.

COMPARISON OF THE EFFECTS OF CHITOSAN AND SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON *IN VITRO* PHYSIOLOGY OF *SERAPIAS VOMERACEA*

ABSTRACT

This study was carried out to elucidate the *in vitro* physiological changes caused by the partially *N*-acetylated oligomeric and polymeric chitosans and the common plant growth regulators in *Serapias vomeracea*. The highest success in the germination of *S. vomeracea* seeds (77.31 %) was obtained from Knudson C medium supplemented with 0.25 % activated charcoal. Considering all the parameters in plant growth, the applications that provided the ideal development were found to be 3 % banana homogenate (BAN) and chitosan (CHI) in various concentrations, in the same medium. In the leaves and roots of *S. vomeracea*, BAN, coconut water (COW) and jasmonic acid (JAS) applications made the membrane structures of cells more stable. The application of 6-benzylaminopurine (BAP) and indole-3-acetic acid (IAA) increased the degree of esterification of lignin molecules in the cell wall while BAN and polymeric chitosan (CHI-10) applications increased the amount of protein and pectin in leaf tissues. Also, BAN application stimulated lignification in leaf tissues. JAS and CHI applications increased the amount of protein, water-associated pectin and lignins, hydrocinnamic acid, and alkaloids in the root tissues of *S. vomeracea*. Furthermore, application of high concentration of oligomeric chitosan (CHI-1) and low concentration of CHI-10 and JAS increased xyloglucan, rhamnogalacturonan and β -galactan contents in roots. In terms of glucomannan content, the most favorable effect was obtained from indol-3-butyric acid (IBA), CHI-1 and IAA applications. With this study, it was revealed that well-characterized chitosan is an eco-friendly, biodegradable and reliable alternative to synthetic plant growth regulators in orchid cultivation. Furthermore, by integrating the advantages of FTIR spectroscopy into plant tissue culture applications, it was possible to illuminate the physiological changes in the plant at molecular level.

Keywords: Plant Growth Regulators, FTIR Spectroscopy, Chitosan, Biopolymer, *Serapias vomeracea*.

GİRİŞ

Orchidaceae (Orkidegiller, Salepgiller) familyası içerisinde sınıflandırılan orkideler, sıra dışı görünümdeki çiçeklerinin çekiciliği, uzun raf ömürleri ve ekonomik değerleri nedeniyle süs bitkileri arasında ayrı bir yere sahip olarak değerlendirilmektedirler. Diğer otsu bitkilerden kimi zaman diğer canlıların görünüşlerini andıran çok farklı morfolojik yapıdaki dikkat çekici çiçekleri ile ayrılırlar. On yedinci yüzyılda yaşamış olan Alman botanikçi Jakol Breyne “Eğer tabiat neşesini çiçekler yoluyla göstermiş olsaydı bu durum en çarpıcı şekilde orkideler arasında görülürdü” demiştir (Davis ve diğ., 1983). Çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olan orkideler öncelikli olarak süs bitkisi olarak kültüre alınmalarına rağmen, kimileri bitkisel ilaç veya gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. (Arditti, 1992). *Dendrobium*, *Paphiopedilum*, *Phalaenopsis* ve *Vanda* gibi cinslerin türleri gösterişli çiçekleri nedeniyle süs bitkisi olarak kültüre alınırken, *Vanilla* türleri ise baharat olarak kullanılan orkidelere dair nadir örneklerdendir. Çeşitli amaçlarla kültüre alınan bu orkidelerden farklı olarak, tabiatta bulunan yabani orkideler gıda ve kozmetik sanayindeki değerleri nedeniyle ilgi görmektedirler. Türkiye’de doğal yayılış gösteren *Anacamptis*, *Himantoglossum*, *Ophrys*, *Orchis* ve *Serapias* gibi cinslerin türleri ise yumrularının ekonomik değerleri nedeniyle doğadan toplanılmaktadır. Bu ekonomik değer, yumrularında türden türe değişiklik gösteren oranlarda bulunan glukomannan isimli karbonhidrat polimerinden kaynaklanmaktadır. Bu polimer, gıda sanayinde salep yapımında ve bazı gıdalarda kıvam artırıcı ve aroma verici olarak, kozmetik sanayinde bazı sabunlarda ve kremlerde katılaştırıcı olarak, tıpta ise zayıflamaya yardımcı kapsül gıda takviyelerinde ve çeşitli kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. İleriki bölümlerde detaylı olarak açıklanacak olan fakat burada kısaca değinilen bu ekonomik değerleri nedeniyle ülkemizde pek çok orkide türü gelişigüzel toplanılmaları ve habitatlarının tahrip olması nedeniyle tükenme tehlikesi tehdidi altındadır. Dünyada ve ülkemizde doğal orkideleri ve yayılış gösterdiği habitatlar

için koruma tedbirleri alınmakta ve bu bitkilerin ticaretini sınırlayıcı önlemler hayata geçirilmektedir. Alınan bu önlemlere rağmen mevcut riskin ve tahribatın önüne geçildiği söylenememektedir. Orkidelerin içinde bulunduğu bu durum nedeniyle, bitkiler âleminin bu güzel varlıklarını sadece kurtarmak için değil, aynı zamanda bilimsel ve akılcı bir yöntem ile ekonomik potansiyellerinden yararlanmak için de etkin bir stratejinin tasarlanması gerekir. Geliştirilecek bu stratejinin yolu; ticari ölçekte ve yüksek verimde egzotik hibrit orkideler de dahil olmak üzere nadir, nesli tükenen ve tehlike altındaki orkidelerin üretiminin yapılabileceği bir *in vitro* çoğaltım tekniğinin ve protokolünün standardizasyonundan geçmektedir (Chugh ve diğ., 2009). Bu nedenle farklı türlerdeki orkidelerin *in vitro* çoğaltımında verimli, kolay, maliyeti düşük ve etkili protokollerin geliştirilmesine dair çalışmalar önem taşımaktadır.

Bitki doku kültürü tekniği, çoğaltımı yapılmak istenilen bir bitkinin, hücreleri farklılaşma özelliğini kaybetmemiş herhangi bir dokusunun veya organının kontrollü çevre şartları altında, uygun bitki büyüme düzenleyicileri ve/veya bitki büyüme artırıcılarının da katkılarıyla, özel besiyerleri kullanılarak *in vitro* geliştirilmesine, çoğaltılmasına ve bu yolla tüm bitkinin elde edilmesine dayanmaktadır. Bitki doku kültürlerinde üzerinde çalışılacak bitkinin fizyolojik ve anatomik özelliklerine göre yaprak, sürgün, meristemler, kök, anter veya tohumlar başlangıç eksplantı olarak kullanılabilirler. Orkideler kullanılarak yapılan doku kültürü çalışmalarında ise başlangıç eksplantı olarak çoğunlukla tohumlar tercih edilmektedirler. Bunun nedeni orkidelerin ovaryumlarında sayılamayacak kadar fazla sayıda tohum üretebilmeleridir. Orkideler; yavaş gelişmeleri, tohumlarının doğal habitatlarındaki mikorizal mantarlarla simbiyotik ilişki gerektirmesi ve tohumlarının doğada düşük çimlenme oranları nedeniyle *in situ* koruması oldukça zor olan bitkilerdir (Godo ve diğ., 2010). Buna karşın *in vitro* kültürler doğada tohumları çimlenme ve gelişme güçlüğü gösteren orkide ve benzeri bitkilerin daha hızlı ve verimli üretimi için bir alternatif sunabilirler. Bitki doku kültürlerinde başlangıç materyalinin hücrelerinin bölünüp farklılaşmasında, yeni doku ve organ haline dönüşmesinde ve hedeflenen ürünün ortaya çıkmasında birçok faktör rol oynamaktadır. Bu faktörlerden ikisi, kültüre alınan dokunun farklılaşmasına yön verilmesine olanak sağlayan bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) ve bitki büyüme artırıcıları (BBA) veya

tetikleyicileridir. BBD'ler, yüksek bitkilerde gelişim ve bazı metabolik olaylara katkı veren organik kimyasal bileşiklerdir. Klasik olarak, oksinler, sitokininler, absisik asit, etilen ve giberellinler olmak üzere beş ana grupta toplanırlar. Bunlara ek olarak, brassinosteroidler, salisilik asit, jasmonatlar ve poliaminler de son dönemlerdeki bilimsel çalışmalarla birlikte BBD listesine dâhil edilmişlerdir (Rademacher, 2015). Hem doğal oluşan hem de sentetik olan BBD türevleri çok düşük konsantrasyonlarda dahi kullanıldıklarında etkili olabilirlerken, diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) gibi sentetik olanları belirli bir seviyede kullanımla birlikte kültürlerde zehirli etkilere sebep olabilirler (Peterson ve diğ., 2016). Bilim dünyasının, üretimin boyutunu artırmak için BBD'lere alternatif olabilecek maddeleri araştırmaya yoğunlaşmasıyla birlikte süs, bahçe ve zirai bitki endüstrilerinde BBA'lar olarak bilinen, doğal, biyobozunur, etkin ve düşük maliyetli alternatif kimyasallar popüler hale gelmiştir. Günümüzde BBD'lere alternatif olarak deneysel ölçekte kullanılmaya başlanan BBA'lardan biri olan kitosan, kitin biyopolimerinin deasetilasyonu ile elde edilen lineer bir aminopolisakkarittir. Kitosanın bitki büyümesine yaptığı etkilerin fizyolojik olarak hangi BBD ile benzer olduğunun anlaşılması, bu BBA'nın hangi grup BBD'ye alternatif olarak kullanılacağına açıklanmasında rol oynayacaktır. Bitkilerin *in vitro* gelişimleri sırasında BBD'lere ve BBA'lara verdikleri moleküler düzeydeki tepkilerin anlaşılması her iki kimyasal grubunun izlediği etki mekanizmaları için bir karşılaştırma imkânı sunacaktır. Kitosanın bitki gelişimi üzerindeki etkileri, bu aminopolisakkaritin polimerizasyon derecesine ve buna bağlı değişen moleküler ağırlığına bağlı olarak farklılaşmaktadır. Bu etkilerin türevlenmesinde diğer bir etken de kitosanın asetilasyon derecesidir (Luan ve diğ., 2005). Bu nedenle sanayinin ve tarımsal üretimin ihtiyaçları doğrultusunda ilgili bitkilerin üretim veriminin artırılması için kullanılacak olan bir biyopolimerin kimyasal özelliklerinin mutlaka net olarak tanımlanması gerekmektedir.

Türkiye'de doğal yayılış gösteren birçok orkide türünün içerisinde *Serapias vomeracea* (Burm.) Briq. hem doğadaki birey bolluğu hem de yayılış alanının genişliği açısından diğer birçok orkide türünden daha avantajlı konumdadır. Diğer orkide türlerine kıyasla gösterişsiz olan çiçekleri doğada dikkat çekme potansiyellerini sınırlamaktadır. Buna rağmen orkide tüccarları tarafından doğadan bilinçsizde sökülümekte ve diğer orkide türlerinde de olduğu gibi doğal habitatları

çeşitli nedenlerle tahribata uğramaktadır. Buna karşın *S. vomeracea*'nin diğer orkide türlerine kıyasla geniş bir yayılış alanında bulunması onun ekolojik toleransının da görece geniş olduğunun bir göstergesidir. Bu nedenle *S. vomeracea*'nin kültüre alınması durumunda ülkemizin çeşitli bölgelerinde sanayi ihtiyaçları için tarımsal üretiminin yapılabileceği anlaşılmaktadır. Bu türün kültüre alınmak suretiyle maruz kaldığı tehditlere karşı koruyucu bir önlem alınması ve hızlı bir üretim protokolü tanımlanarak yukarıda anılan ekonomik nedenlerden dolayı ticari potansiyelinin artırılması hem ülkemizin doğal zenginliğini korumak hem de ülkemiz ekonomisine katkı sağlamak için gereklidir.

Bitki doku kültürlerinde BBD ve BBA olarak kullanılan sentetik ve doğal kimyasalların bitkiler üzerindeki etkileri, hücresel düzeydeki moleküler değişimlerden ziyade çok büyük oranda morfometrik parametre temelli olarak kıyaslanmakta ve açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu etkilerin bitkide morfolojik değişimlerin yanı sıra, hücresel düzeyde neden ve nasıl karşılık bulduklarının aydınlatılması, özellikle orkideler için bu bilgi eksikliğinin giderilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, ülkemizde bulunan diğer doğal orkide türlerine kıyasla ulaşılması kolay türlerden biri olan *S. vomeracea*'nin *in vitro* gelişiminde kullanılan BBD'lerin ve karakterize edilmiş *N*-asetile kitosan oligomer ve polimerlerinin fizyolojik etkilerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FTIR) aracılığıyla molekül düzeyinde karşılaştırılması ve bitkideki etki mekanizmalarının aydınlatılması amaçlandı. Bu tez çalışmasının hedefi, *N*-asetile kitosan oligomer ve polimerlerinin gıda, tıp ve kozmetik sanayisinde kullanılacak potansiyeli ve değeri yüksek bir model bitki olarak belirlenen *S. vomeracea* üzerinde yapı-fonksiyon ilişkisinin yaygın olarak kullanılan BBD'ler ile karşılaştırılmalı olarak *in vitro* düzeyde gösterilmesidir. Bu tez çalışmasının sonucunda elde edilen bilgiler, orkide kültürlerinin kurulmasında ve sürdürülmesinde kullanılacak doğal ve sentetik kimyasal maddelerin orkideler üzerindeki moleküler etki mekanizmaları hakkında öncü olacak bilgi kazanımını sağlamaktadır.

1. GENEL BİLGİLER

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının arka planının kapsamlı olarak ortaya konması için teze konu olan *Serapias vomeracea* orkidesinin biyolojik özelliklerinin, kitosan aminopolisakkaritinin, yaygın olarak kullanılan BBD'lerin, bitki doku kültürü ve FTIR uygulamalarının özelliklerinin, kullanıldıkları çalışmaların ve bunların sonuçlarının irdelenmesi gerekmektedir.

1.1. Tezde Kullanılan Bitki Materyali

1.1.1. Ochidaceae familyası üyelerinin genel özellikleri

Orchidaceae familyası Türkçe olarak Orkidegiller veya Salepgiller olarak isimlendirilmektedir. Ülkemizde bu familyanın üyeleri çok yıllık, ototrofik veya bazen heterotrofik olabilen otlardır. Rizomları, ipliksi kökleri veya yumru kökleri bulunmaktadır. Bu yapılara nüfuz eden endofitik mikorizalar ile simbiyotik yaşarlar. Yapraklar çoğu zaman bazal veya bazen gövde üzerindedir. Gövdeleri çoğu zaman üzerinde veya ucunda bir veya daha fazla çiçek durumu taşıyan dik uzanımlı bir yapıdadır. Çiçekleri zigomorf olup genellikle gevşek veya sık başak durumunda bulunurlar. Çiçekler genellikle baş aşağı dururlar (resupinat) ve çok çeşitli göz alıcı renklerde ve şekillerde bulunabilirler. Çiçek halkası iki bölümden oluşmaktadır. Dıştaki halkada birbirine benzer 3 sepal, içteki halkada ise birbirine iki petal ve bunlardan çok farklı şekillerde bulunabilen bir labellum bulunur. Labellum göze çarpan çok çeşitli boyutta ve renklerde olup genellikle mahmuzludur. Bazen tozlaşmaya yardımcı olmak amacıyla çeşitli böceklere benzer şekilde bir hal almıştır. Kolon, stigma ve stamenlerin birleşiminden oluşur. Anter lokulusları konnektif isimli bir yapı ile birleşir. Polen kitleleri (pollinia) 2 veya 4 tanedir. Mumlu veya tozlu granüloz olabilir. Çoğunlukla serbest veya bir kese içinde olabilen 1 veya 2 yapışkan guddeye bağlıdır. Ovaryum kıvrılmış veya düz olup üst durumludur. Küçük bir sapı olabilir veya sapsızdır. Plasentalanma çepere bağlıdır (pariyetal). Olgun meyveler kapsüldür. Çok sayıda tohum içerir ve endospermeleri yoktur (Davis, 1983).

1.1.2. *Serapias vomeracea*'nin biyolojik özellikleri

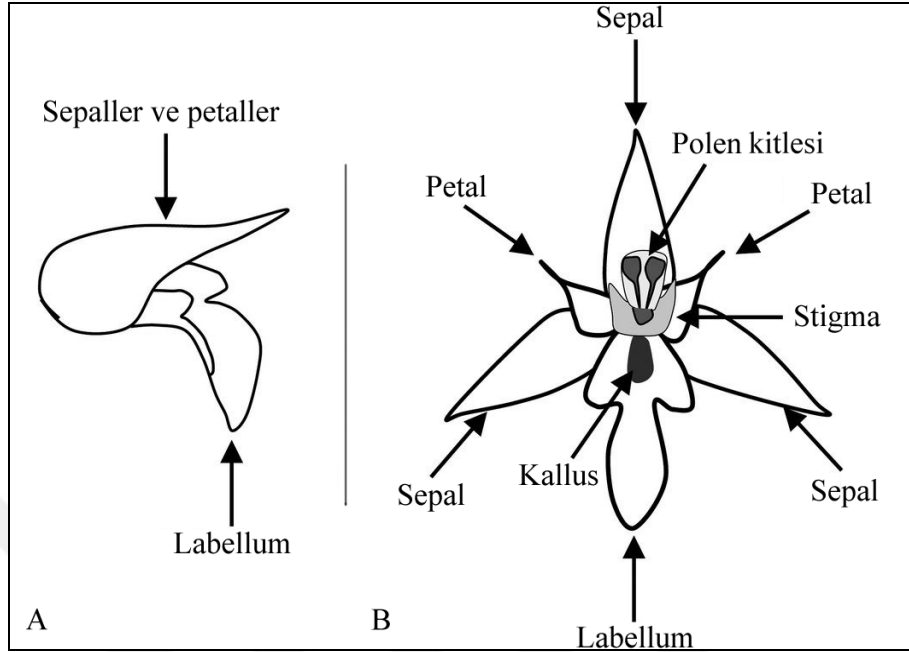
Serapias vomeracea (Burm.) Briq. (Orchidaceae) türünün isimlendirilmesinde WCSP (World Checklist of Selected Plant Families, Kew Royal Botanic Gardens) verileri dikkate alınmıştır. *S. vomeracea* kurak çayırlıklarda, terk edilmiş tarım arazilerinde, fundalıklarda ve çalılık alanların olduğu habitatlarda 1000 m yüksekliğe kadar bulunabilen, geniş yayılışlı ve çok yıllık bir orkide türüdür (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. *Serapias vomeracea*'nin doğadaki görünümü

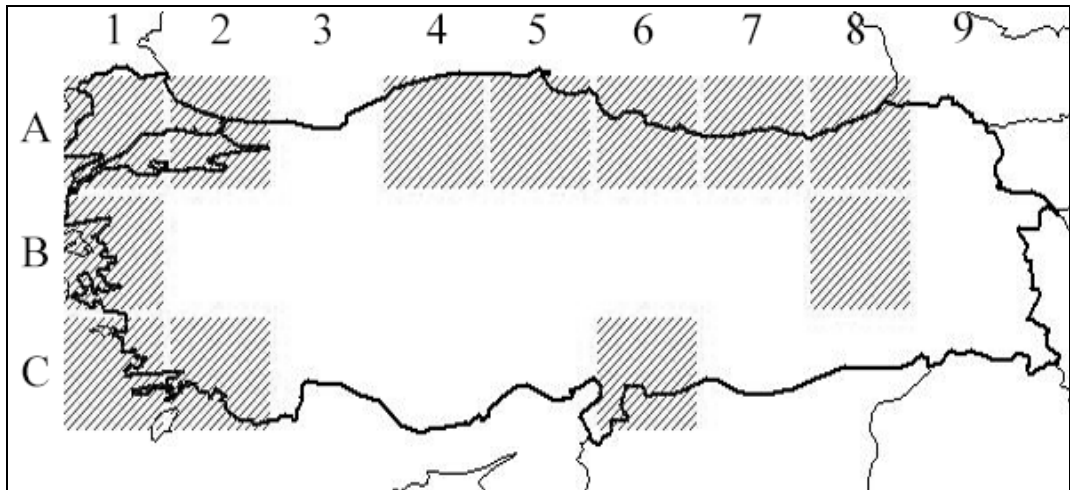
Doğu Akdeniz elementidir. Yayılış alanı, Türkiye dışında Akdeniz-Atlantik ülkelerini (Portekiz, İspanya, Fransa, İtalya, Balkanlar ve Yunanistan) kapsamaktadır. Bununla birlikte Kuzey Afrika'da da (Fas ve Tunus) bulunmakta olup yüksek seviyede kendileşme baskısı altındadır (Bellusci ve diğ, 2009). Yumru kökü bulunur. Mahmuzu olmayan 3 loblu bir labelluma sahiptir. Epiçil (ön dudak) 13 mm'den uzun ve düz renkli olup, labellumun bazal kısmında ona eşlik eden 2 adet şişkinlik vardır (Şekil 1.2.). Sepal ve petallerin oluşturduğu derin başlık böcekler için

iyi bir barınma ortamı sağlar. Kromozom sayısı $2n = 36$ 'dır (Pellegrino ve diğ., 2017).



Şekil 1.2. *Serapias* spp.'de çiçeğin genel görünümü ve kısımları (Pellegrino ve diğ., 2017). A: Petal, sepal ve hipoçilin (arka dudak) birlikte oluşturdukları başlık (yandan), B: Çiçekteki organların ayrıştırılmış gösterimi (karşıdan)

Türkiye'de geniş yayılış gösteren *S. vomeracea* türü, Diyarbakır, Giresun, Hatay, İstanbul, İzmir, Kırklareli, Kocaeli, Muğla, Ordu, Rize, Sakarya, Sinop, Tekirdağ, Yalova ve Zonguldak illerini de kapsamakta olan A1, A2, A4, A5, A6, A7, A8, B1, B8, C1, C2 ve C6 karelerinde (Şekil 1.3.) bulunmaktadır (URL-1).



Şekil 1.3. *Serapias vomeracea*'nin Türkiye'deki yayılış haritası (URL-1)

1.1.3. *Serapias vomeracea*'nin ekonomik değeri

Günümüzde orkidelerin Tayland, Avustralya, Singapur, Malezya ve diğer birçok ülkede milyon dolarlık bir endüstrisi vardır. Bazı orkideler öncelikli olarak süs bitkisi olarak yetiştirilmelerine rağmen, kimileri ilaç ve kozmetik ürünü olarak veya birçok farklı kültür ve cinsleri salep, dondurma ve sporcu besinlerinin yapımında (*Cynorchis*, *Eulophia*, *Orchis*, *Serapias* ve diğer yumrulu orkideler) kullanılmaktadırlar (Arditti, 1992). *Serapias vomeracea* yumrularının ekonomik değeri yüzünden toplanan orkide türlerinden biridir. Bu orkidelerin yumrularını bu denli değerli kılan faktör ise yumrularının içerdikleri glukomannan isimli bir polisakkarittir. Glukomannan biyomolekülünü detaylı olarak tanımlamak gerekirse, bir hammadde olarak değerlendirilen glukomannan, orkidelerin ve konyak bitkisinin (*Amorphophallus konjac*) yumrularından elde edilen bir polisakkarittir. Glukomannanın kimyasal yapısı β ,1-4 glikozidik bağlarla birbirine bağlı, konyak bitkisinde 1,6:1, orkidelerde ise 3,6:1 oranında mannoz ve glukozdan oluşmaktadır. Fakat bu oranlar ölçümün yöntemine göre farklılık gösterebilir (An ve diğ., 2010). Glukomannan günümüzde geleneksel içeceğimiz salebin hammaddesi olmasının ötesinde hidrofilik özelliğinden dolayı gıda takviyelerinde, özellikle zayıflamaya yardımcı kapsüllerin ve diğer besin takviyelerinin yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca aynı özelliği bu polisakkaritin gıda sanayinde kıvam artırıcı olarak kullanılmasını sağladığı bilinmektedir. Glukomannanın yüksek kolesterol tedavisinde de kullanılabileceği ayrıca bildirilmiştir (Arvill ve Bodin, 1995; Sood ve diğ., 2008). Oldukça geniş kullanım alanına sahip glukomannan, konyak bitkisinin yanı sıra yumrulu yabancı orkidelerden de elde edilmektedir. Ülkemizde her yıl ortalama 80 milyon orkide bitkisi salep hammaddesi ve/veya glukomannan elde etmek amacıyla sökülmemektedir. Toplanıp kurutulan ve toz haline getirilen yumrular salep tozu ismiyle anılmaktadırlar. Bir kilogram salep tozu için yaklaşık 1000 orkide yumrusuna ihtiyaç duyulmaktadır (Sezik, 1984). Salep tozunun piyasa değeri 200 TL·kg⁻¹'den başlamaktadır. Bu yüzden orkideler henüz tükenmemiş olsalar da gün geçtikçe artan talep doğrultusunda doğadan toplanmaları artmaktadır. Bununla birlikte, familyanın tüm üyeleri "Nesli Tehlikede Olan Yabancı Fauna ve Flora Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme" (CITES)'ye dâhildir ve uluslararası ticareti sıkı şekilde kontrol altında tutulup izlenmektedir (URL-2).

1.2. Bitki Doku Kültürü Bilimi

Bitki doku kültürü, anaç bitkiden izole edilen bitki hücrelerini, dokularını veya organlarını yapay besiyerleri üzerinde büyütme bilimidir. Botanikteki birçok disiplinde araştırmalarda kullanılan teknikleri ve metotları içermektedir ve pratikte çeşitli amaçlarla kullanılır. Kültürlerde hücrelerin veya dokuların çeşitli amaçlarla farklılaşmasını yönlendirmek için bitki büyüme düzenleyicileri veya bazı doğal besiyeri katkıları kullanılmaktadır. Bitki doku kültürünün genel kullanım amaçları; haploit bitki üretimi, germplazm muhafazası, yeni bitki varyetelerinin üretilmesi, nadir ve tükenmekte olan bitkilerin korunması, doğal üretimi güç olan bitkilerin çoğaltılması, sekonder metabolitlerin üretilmesi ve transgenik bitki eldesidir (George ve diğ., 2008). Bu tez çalışması için gerekli olan miktarda bitki materyali bitki doku kültürü yoluyla üretilmiştir. Bu üretimin genel olarak 5 temel aşaması vardır. Bunlar; 1. Hazırlık (Anaç bitki seçimi ve yüzeysel sterilizasyon), 2. Kültürün başlatılması, 3. Sürgün çoğaltımı aşaması, 4. Sürgün gelişimi ve köklendirme aşaması, 5. Dış ortama alıştırma aşaması. Orkidelerin *in vitro* sürgün gelişimi stratejisi diğer birçok bitkiden farklı olduğu için 3. aşama orkidelerde farklıdır. Bu aşama orkidelerde sürgün çoğaltımı yerine protokorm veya protokorm benzeri yapıların oluşumu ismini alır (Chugh ve diğ., 2009). Bitkilerin *in vitro* gelişimlerini ve fizyolojilerini etkileyen başlıca unsurlar, besiyerinde kullanılan BBD'ler ve diğer besiyeri katkı maddeleridir. Bu bileşenlerden bir veya birkaçının uygun konsantrasyon ve kombinasyonlarda kullanılmasıyla verimli ve güvenilir *in vitro* çoğaltım protokolleri oluşturulmaktadır.

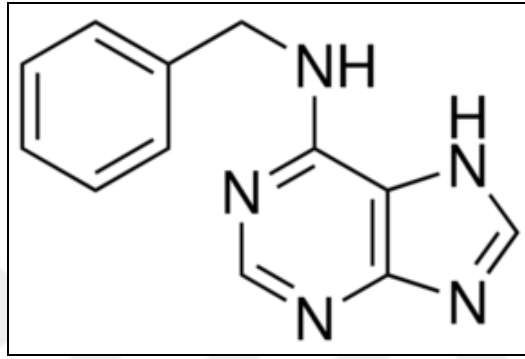
1.2.1. Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD)

Genel olarak bitki doku kültürlerinde kullanılan BBD'ler yukarıda bahsedilen temel gruplar içerisinde incelenmektedirler. Absisik asit, etilen ve salisilik asit dışında birden fazla kimyasal bileşik içeren büyüme düzenleyici gruplarının içerdikleri bu bileşiklere örnek olarak şunlar verilebilir; kinetin, 6-benzilaminopürin ve zeatin (sitokininler), indol-3-asetik asit, indol-3-bütirik asit ve 2,4-diklorofenoksiasetik asit (oksinler), giberellik asitler (giberellinler), metil jasmonat ve jasmonik asit (jasmonatlar), brassinolit, 24-epibrassinolit ve 28-homobrassinolit (brassinosteroidler), putreskin, spermidin ve spermin (poliaminler) (Rademacher,

2015). Bu tez çalışmasında kullanılan BBD'lerin kimyasal özellikleri ve bitkiler üzerindeki etkileri aşağıda açıklanmıştır.

1.2.1.1. 6-benzilaminopürin (BAP)

Sitokinin grubu büyüme düzenleyicilerden biri olan 6-benzilaminopürin (BAP) adenin (aminopürin) türevi bir kimyasaldır (Şekil 1.4.). Doku kültürü çalışmalarında ve tarımda sürgün gelişimini teşvik etmesi nedeniyle kullanılır.

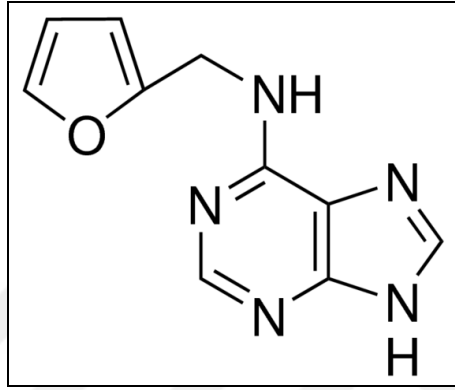


Şekil 1.4. 6-benzilaminopürinin kimyasal yapısı

Bitki dokularında kolay metabolize edilmesi ve zeatin gibi diğer doğal sitokininlerin sentezini uyarması nedeniyle diğer sentetik sitokininlere kıyasla daha avantajlıdır (Sharma ve diğ., 2017). BAP aynı zamanda hücre zarlarının geçirgenliğini ve akışkanlığını artırdığı için hücrelere daha kolay nüfuz edebilir ve etkisini gösterebilir. Bu nedenle çoğu bitkinin *in vitro* kültürlerinde diğer sitokininlere oranla lateral sürgün gelişimi ve sürgün çoğaltımı üzerine etkisi daha baskın olarak görülmektedir (Acemi ve diğ., 2016). Önceki çalışmalarda BAP'ın sürgün çoğaltımı üzerine olan konsantrasyona bağımlı etkisi mavi yıldız bitkisi (*Amsonia orientalis*) üzerinde gösterilmiştir (Acemi ve diğ., 2013). Bunun yanı sıra, BAP uygulamasının brokolide (*Brassica oleracea*) klorofil bozunumunu azalttığı (Costa ve diğ., 2005) ve elmada (*Malus domestica*) çiçeklenme oranını ve sürgün gelişimini artırdığı rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2015). *Serapias vomeracea*'de ise 2,0 mg·l⁻¹ BAP uygulamasının tohumların çimlenme oranını artırdığı gösterilmiştir (Bektaş ve Sökmen, 2016).

1.2.1.2. Kinetin (KIN)

Adenin türevi bir diğer sitokin olan kinetin (KIN) BAP ile birlikte en geniş kullanım alanına sahip büyüme düzenleyicilerinden biridir (Şekil 1.5.). Apikal dominansın aşılmasını sağladığı için BAP gibi sürgün çoğaltımında kullanılır. Stomaların açılma oranını artırarak transpirasyonu artırır (Assmann ve Armstrong, 1999).

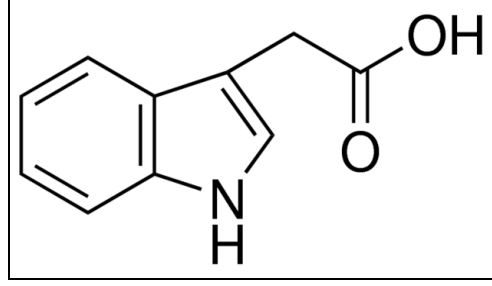


Şekil 1.5. Kinetinin kimyasal yapısı

Hong ve diğ. (2008) *Paphiopedilum* “cv. Alma Gavaert” orkidesinin sürgün çoğaltımında en uygun büyüme düzenleyicisinin 4,65 μM kinetin olduğunu bulmuşlardır. Yüksek konsantrasyonda kinetin uygulamasının *Knautia sarajevensis*’de apikal dominansın aşılması ve sekonder metabolit birikimi üzerine olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (Karalija ve diğ., 2017).

1.2.1.3. İndol-3-asetik Asit (IAA)

Doğal oluşan ve yaygın olarak kullanılan oksin grubu büyüme düzenleyicilerden biri olan indol-3-asetik asit (IAA) ağırlıklı olarak bitkilerin tepe tomurcuklarında ve genç yaprakların uç kısımlarında üretilmektedir (Şekil 1.6.).

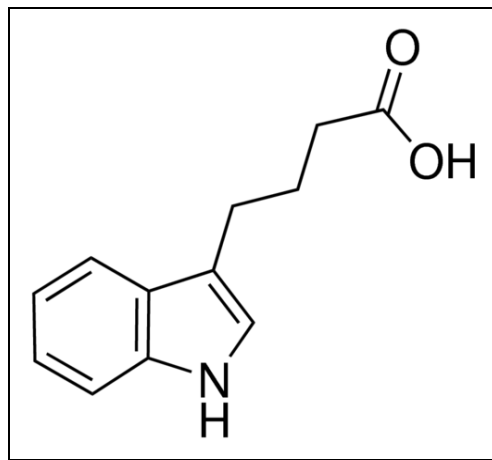


Şekil 1.6. İndol-3-asetik asitin kimyasal yapısı

Bitkilerde hücre bölünmesi ve uzamasını teşvik eder. Dokulardaki oksin konsantrasyonları birbirinden farklıdır ve bitki tarafından sıkı kontrol altındadır. IAA çoğunlukla bitki doku kültüründe ve bahçe bitkileri yetiştiriciliğinde adventif kök oluşumunu teşvik etmek üzere kullanılır. Ayrıca ticari olarak da satılan IAA çeliklerin köklendirilmesinde de kullanılmaktadır (Müller ve Sheen, 2008). Düşük konsantrasyonlarda *in vitro* IAA uygulamasının *Calanthe tricarinata*'da tohumların çimlenme oranını artırdığı (Godo ve diğ., 2010), yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında ise *Orchis purpurella* tohumlarının çimlenme oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Hadley ve Harvais, 1968).

1.2.1.4. İndol-3-bütirik Asit (IBA)

Birçok bitkinin yapısında doğal olarak bulunduğu bilinen indol-3-bütirik asit (IBA) köklenmede rol oynayan başlıca oksin grubu büyüme düzenleyicilerinden biridir (Şekil 1.7.).

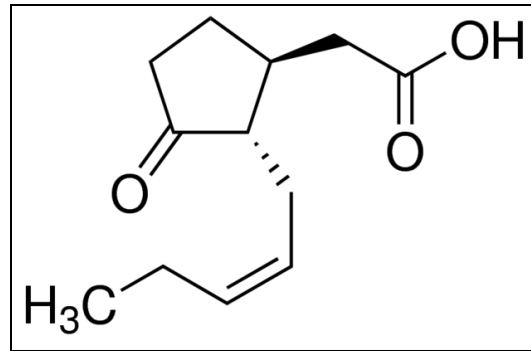


Şekil 1.7. İndol-3-bütirik asitin kimyasal yapısı

Bitki dokularında IAA'dan küttelece daha az miktarda bulunduğu bildirilmiştir. IBA bitki gelişimi sırasında IAA'ya çevrilmekte olup bu durum onun bitki gelişimi açısından oksinin depo formu olduğuna işaret etmektedir (Korasick ve diğ., 2013). Genel olarak, IBA'nın IAA'ya oranla bitkileri köklendirmedeki yüksek başarısının nedeni kararlılığına bağlıdır. Ayrıca yapılan çalışmalar IBA iletiminin IAA'dan daha yavaş olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum moleküler ağırlıklarının farklılığından kaynaklanmaktadır (MA_{IBA} 203,24; MA_{IAA} 175,18). Bununla birlikte çevre şartlarına bağlı bozunuma karşı IAA'ya oranla daha dirençlidir. Işık altında IAA % 97, IBA ise % 60'a kadar bozunum gösterebilir (Epstein ve Ludwig-Müller, 1993). Bir *Catleya* hibridinde (Blc. Cherry Comton × Mem. Robert straight) en iyi köklenmenin $2,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IBA varlığında bulunduğu bildirilmiştir (Dewir ve diğ., 2015). Ayrıca IBA ile KIN'in birlikte uygulanmasının *Dendrobium chrysotoxum* tohumlarının çimlenmesi üzerine sinerjistik bir etkisinin olduğu bulunmuştur (Nongdam ve Tikendra, 2014).

1.2.1.5. Jasmonik Asit (JAS)

Oksilipinler sınıfından olan jasmonik asit (JAS) *Jasminum* türlerinde doğal olarak sentezlenen öncülü linoleik asit olan ve genellikle yaralanma sonucunda ortaya çıkan, strese bağımlı bir büyüme düzenleyicisidir (Şekil 1.8.).



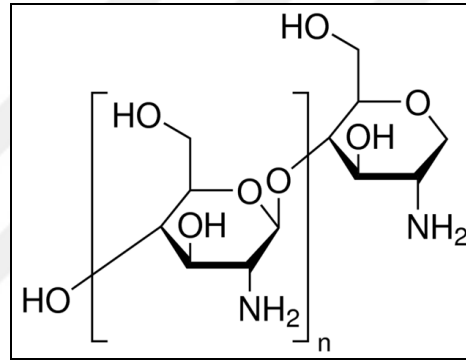
Şekil 1.8. Jasmonik asitin kimyasal yapısı

Senesens ve büyümenin yavaşlamasında görev aldığı düşünülmüş olsa da jasmonik asit meristem oluşumunu tetikleyebilir. Ayrıca özellikle patates bitkilerinde *in vitro* mikro yumru oluşumunda kullanılmaktadır (Pruski ve diğ., 2003). Debeljak ve diğ. (2002) $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ JAS ve $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ sükrozün birlikte kullanıldıklarında *Pterostylis sanguinea*'da yumru oluşumunun tetiklendiğini bulmuşlardır. JAS'ın metil esterinin (Me-JA) *Dendrobium* orkidelerinde etilen üretimini ve 1-aminosiklopropan-1-

karboksilik asit (ASK) içeriğini artırdığı gösterilmiştir. Bu durumun *Dendrobium* orkidelerinde tozlaşma esnasında yaşanan olayların bir benzeri olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla Me-JA uygulaması *Dendrobium* orkidelerinde tozlaşmada görülen fizyolojik değişimlerin aynılarını tetiklemektedir (Porat ve diğ., 1995).

1.2.1.6. Kitosan Aminopolisakkariti (CHI)

Kitosan (CHI), Crustaceae üyelerinin ve böceklerin kabuklarında, mantarların hücre duvarlarında ve bazı alglerde bulunan kitin biyopolimerinin deasetile halidir (Nge ve diğ., 2006). β (1 \rightarrow 4) bağlı 2-asetamido-2-deoksi- β -D-glukoz (*N*-asetilglukozamin)'dan meydana gelir (Şekil 1.9.).



Şekil 1.9. Kitosanın kimyasal yapısı

Çeşitli çalışmalarda kitosanın orkidelerde tohumların çimlenme oranını artırdığı (Nge ve diğ., 2006), bamyada bitki gelişimi ve mahsul verimi üzerine olumlu etkileri olduğu (Mondal ve diğ., 2012), kesme çiçekçilikte çiçeklerin vazo ömrünü (Bañuelos-Hernández ve diğ., 2017) ve çiçeklerin kalitesini (Ohta ve diğ., 1999) artırdığı ayrıca birçok bitkide abiyotik stres direncinin ve mikrobiyal etkileşimlere karşı cevabın oluşmasında etkili olduğu (Das ve diğ., 2015) bildirilmiştir. Kitosan bir stres faktörü gibi bitkinin savunma mekanizmasını tetikler ve bir sinyal molekülü olan H₂O₂'nin üretimini artırır (Pichyangkura ve Chadchawan, 2015). Bu artış bitki dokularındaki doğal sitokinlerin seviyelerinde geçici bir artışa sebep olur (Ha ve diğ., 2012). Bitkilerin verdiği bu cevap zayıf bir stres faktörüne verdikleri cevapla aynıdır. Bununla birlikte Vasconsuelo ve diğ. (2004) kitosan uygulamalarının lignin biyosentezini ve hücre duvarlarının lignifikasyonunu artırdığı ve bu sayede bitkilerde sürgün oluşumunu tetiklediğini göstermişlerdir. Bu sebeple kitosan biyopolimeri sadece bitkilerde savunma sistemini tetikleyen bir etken değil doğal bir bitki büyüme

artırıcı (BBA) olarak da kabul edilmektedir. Buna rağmen günümüze kadar bu biyopolimer *in vitro* çoğaltım çalışmalarında yaygın olarak kullanılmamıştır. Yakın zamandaki çalışmalar çoğunlukla ticari süs orkidelerinin (Nge ve diğ., 2006, Kananont ve diğ., 2010, Pornpienpakdee ve diğ., 2010) ve patates bitkisinin (Kowalski ve diğ., 2006, Asghari-Zakaria ve diğ., 2009) çoğaltımı üzerinedir. *In vitro* çoğaltım çalışmalarında kullanılan kitosanlara bitkilerin verdiği tepkiler kitosanların polimerizasyon dereceleri, başka bir deyişle moleküler ağırlıkları ve/veya asetilasyon derecelerine bağlıdır (Luan ve diğ., 2005). Örneğin; *Dendrobium* orkidelerinde yapılan bir çalışmada sadece % 70 ve % 80 asetilasyon derecesine sahip kitosanların protokorm benzeri yapıların (PBY) oluşumunu teşvik ettikleri gösterilmiştir (Pornpeanpakdee ve diğ. 2006). Diğer bir araştırmada ise *Dendrobium phalaenopsis* PBY'lerinin *in vitro* büyütülmesi üzerine farklı moleküler büyüklüklerdeki kitosan uygulamalarının etkilerini deneyen Nge ve diğ. (2006) 1 kDa büyüklüğündeki karides kökenli kitosanın 10 ve 100 kDa moleküler büyüklükteki kitosanolardan daha çok büyümeyi teşvik ettiğini ve meristematik dokulardan PBY oluşumunu tetiklediğini göstermişlerdir. Dolayısıyla kitosanolardaki bu yapı-fonksiyon ilişkilerinin ve sonuçlarının açığa çıkarılması için iyi karakterize edilmiş, kısmi *N*-asetile kitosan oligomer ve polimerlerinin bitkilerdeki fizyolojik etkilerinin aydınlatılması gerekmektedir.

1.2.2. Diğer besiyeri katkı maddeleri

Bitki doku kültüründe kullanılan, bitki gelişimine veya kültürdeki olumsuz etkilerin yatıştırılmasına olumlu katkıda bulunan fakat herhangi bir kimyasal sınıfı içerisinde kategorize edilmeyen kültür bileşenlerini tanımlamaktadır. En bilinen ve sıklıkla kullanılanları; karbon kaynağı olarak sükroz ve fenolik madde absorbandı olarak aktif kömürdür. Bunun yanında, çoğunlukla orkide kültürlerinde kullanılan muz homojenatı ve hindistan cevizi sütü de henüz tamamen aydınlatılmamış bitki besleyici özelliklerinden dolayı tercih edilmektedirler.

1.2.2.1. Muz Homojenatı (BAN)

Orkide kültürlerinde homojenize edilmiş muz meyvelerinin besiyerine eklendiğinde bitki büyümesini artırdıkları sıklıkla rapor edilmiştir. Parthibhan ve diğ. (2015) *Dendrobium aqueum* kültüründe besiyerine kullanılan 3 g·l⁻¹ muz pulpunun

orkidenin sürgün sayısı ve uzunluğunu artırdığını bulmuşlardır. Muz homojenatı (BAN) uygulamasının *Dendrobium lituiflorum* tohumlarında ise çimlenmeyi artırdığı ve köklenmeyi erkene aldığı rapor edilmiştir (Vyas ve diğ., 2009). Bitki gelişimi için sağladıkları bu olumlu etkilerin nedenleri henüz tam anlamıyla açığa kavuşturulamamıştır. Bununla birlikte besiyerinde pH düzeyini stabilize ettiği düşünülmektedir. Bu etkinin muz meyvelerinin K, Mg, Cu, Mn, vitamin C veya vitamin A bakımından (Wall, 2006) ya da doğal sitokinlerce zengin olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (van Staden ve Stewart, 1975).

1.2.2.2. Hindistan Cevizi Suyu (COW)

Hindistan cevizi suyu (COW), *Cocos nucifera* meyvelerinin endosperm sıvısına verilen isimdir. Genel olarak kültürlerde hem morfogenez hem de kallus oluşumunu uyardığı için kullanılmaktadır. Orkide kültürlerinde mutasyona sebep olmadan kullanılabilirdiği ve sitokin benzeri kimyasallar ve heksitol içerdiğinden dolayı büyümeyi artırabildiği için kullanılmaktadır. Otoklavlanabilmekte ve buzdolabında uzun süreler saklanabilmektedir. Genellikle yeşil, olgunlaşmamış meyvelerden alınması tercih edilir. Fakat olgun meyvelerden kullanımı da mümkündür. Tropik bir meyve olduğu için maliyeti bazı ülkelerde fazla olabilmektedir. Bu durum da hindistan cevizi suyunun yaygın kullanımını kısıtlamaktadır. Hindistan cevizi suyunun besiyerinde % 15 (v:v) oranında kullanımının *Phalaenopsis* hibritlerinde tohumların çimlenmesini artırdığı ve sonrasında ise PBY oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir (Shekarriz ve diğ., 2014). Buna karşın yine aynı orkide cinsine ait "Pink" hibritinde hindistan cevizi suyunun ölçülen hiçbir parametre üzerine olumlu etki yapmadığı gösterilmiştir (Zahara ve diğ., 2017). Düzenli olmayan bu etkilerin nedeni bu endosperm sıvısının içerdiği doğal sitokin, aminoasit, protein vs. gibi maddelerin seviyelerinin meyveden meyveye değişmesi olabilir.

1.2.2.3. Sükroz (SUC)

Bitki doku kültürlerinde karbon kaynakları bitkilerin gelişimi ve morfogenez için gereklidir. Bu gereklilik kısmen besleyici özelliklerinden dolayı kısmen hücre bölünmesini ve morfogenezini etkileyen çeşitli osmotik potansiyelleri nedeniyle (Sotiropoulos ve diğ., 2006). Şekerler birçok bitki geninin ifadesini ve bunların metabolik ve gelişimsel olaylarla olan bağlantısını kontrol ederler (Koch, 1996). Bu

nedenle karbonhidratlar yüksek enerji gerektiren bir süreç olan *in vitro* morfogenezde birincil derecede önemlidirler (Calamar ve De Clerk, 2002). Karbonhidrat gereksinimleri kültüre alınan bitkinin türüne ve gelişimsel basamağına göre değişmektedir. Birçok bitkinin floem sıvısındaki en yaygın karbonhidrat olduğu ve uygun maliyetinden dolayı sükroz (SUC) bitki doku kültürlerinde en yaygın olarak kullanılan karbon kaynağıdır. Bununla birlikte bitkilerde başka karbon kaynaklarının da oluşundan dolayı sükroz kültürler için her zaman en uygun karbon kaynağı olmayabilir. Bitkilerin kullanabildikleri diğer karbon kaynağı şekerler, monosakkarit heksozlar (glukoz, fruktoz, galaktoz ve mannoz), pentozlar (arabinoz, riboz, ksiloz), disakkaritler (maltoz, laktoz, sellobiyoz, trehaloz) ve rafinoz trisakkaritidir. Bunların yanında birçok durumda sorbitol, gliserol ve mannitol gibi şeker alkolleride alternatif karbon kaynakları olarak kullanılmaktadırlar (Yaseen ve diğ., 2013). Huh ve diğ. (2016) *Cypripedium macranthos* üzerine yaptıkları bir çalışmada $10-40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ konsantrasyonlarda kullandıkları sükrozun etkilerini değerlendirmiş ve $\frac{1}{4}$ MS besiyerindeki (Murashige ve Skoog, 1962) $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ sükrozun tomurcuk oluşumunu, kök sayısı ve uzunluğunu artırdığı rapor etmişlerdir. MS besiyerinin standart formülasyonunda tavsiye edilen sükroz değeri $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ iken $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ sükroz daha iyi sonuçlar vermiştir. Dolayısıyla besiyerlerinde kullanılan sükroz gibi bileşenlerin kullanım miktarlarının optimizasyonu olumlu sonuçlar doğurabilmektedir.

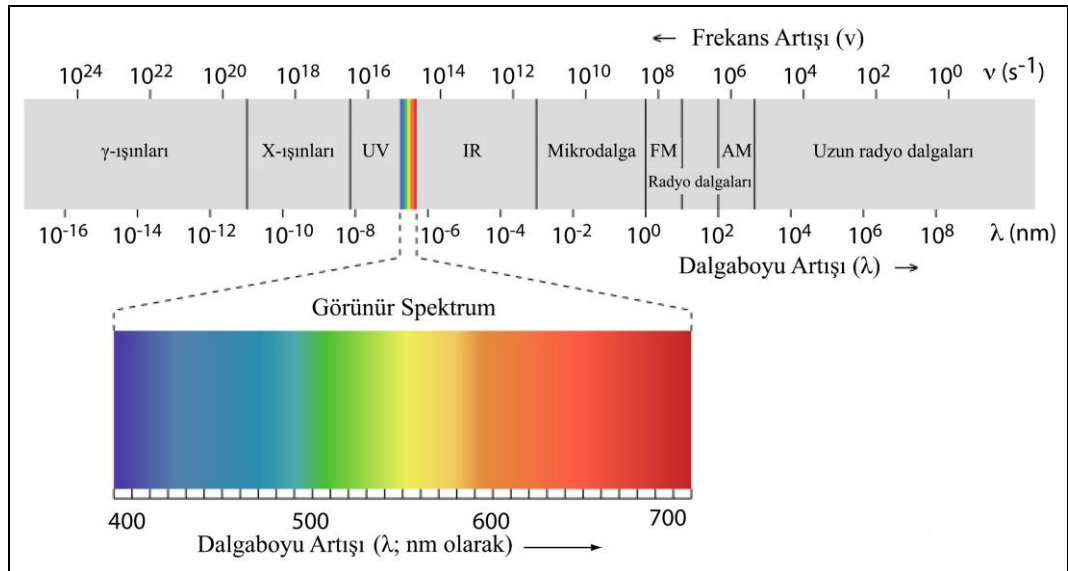
1.2.2.4. Aktif kömür (ACH)

Aktif kömür (ACH), kasigrafitik (quasigraphite; karbon mikrotübüllerinin bitişerek düzlemsel olarak dizildiği yapı) olarak dizilmiş küçük karbon partiküllerinden oluşur. Karbon elementinden karbon yüzeyin oksidasyonu ve tüm nanokarbonlardan arındırılmış olması ile ayrılan gözenekli ve tatsız bir maddedir (Thomas, 2008). Çok ince gözeneklerden oluşan ağsı yapısı bu maddeye çok geniş bir yüzey ve hacim kazandırdığı için aktif kömür yüksek absorpsiyon kapasitesine sahiptir (Çeçen, 2014). Aktif kömür bitki doku kültüründe hücre büyüme ve gelişimini artırmak için kullanılır. Bitki gelişimine bu olumlu etkiyi ortamdaki zararlı bileşikler bünyesinde tutarak, fenolik oksidasyonunu ve birikimini azaltarak, morfogenez için besiyeri pH'ını optimum seviyede tutarak ve bitkiler için toprak benzeri karanlık bir yapı sağlayarak yapar. Besiyerinde oluşabilecek zararlı bileşiklere örnek, sükrozun

otoklavlanması sonucunda dehidrasyonu ile oluşan 5-hidroksimetil-furfural'dır (Pan ve van Staden, 1998). Yüksek absorpsiyon kabiliyetinden dolayı sadece besiyerindeki zararlı bileşikler değil aynı zamanda kültürdeki BBD'leri de tuttuğu bilinmektedir. Polar ve aromatik bileşiklere karşı absorpsiyon ilgisi daha fazladır. Yapılan bir çalışmada besiyerine eklenen BAP'ın 3 günlük kültürün sonunda yaklaşık % 98'inin aktif kömür tarafından emildiği gösterilmiştir (Ebert ve diğ., 1993). Buna rağmen glukoz, mannitol, sorbitol ve inositol gibi polar ve suda çözülebilen şekerleri besiyerinden almaz (Yam ve diğ., 1990). Aktif kömürün besiyerinde $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ konsantrasyonda kullanımının çeşitli *Ophrys* türlerinde tohumların *in vitro* çimlenme oranını ve bitkiciklerin gelişimini artırdığı gösterilmiştir (Kitsaki ve diğ., 2004).

1.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Genel anlamıyla spektroskopi; bir maddenin atom, molekül veya iyonlarının enerji düzeyi değişimleri esnasında soğurdukları veya yaydıkları elektromanyetik ışımaların ölçülmesi ve yorumlanmasıdır (Pekin, 2013). Elektromanyetik ışımaların çeşitli türleri bulunmaktadır (Şekil 1.10.).

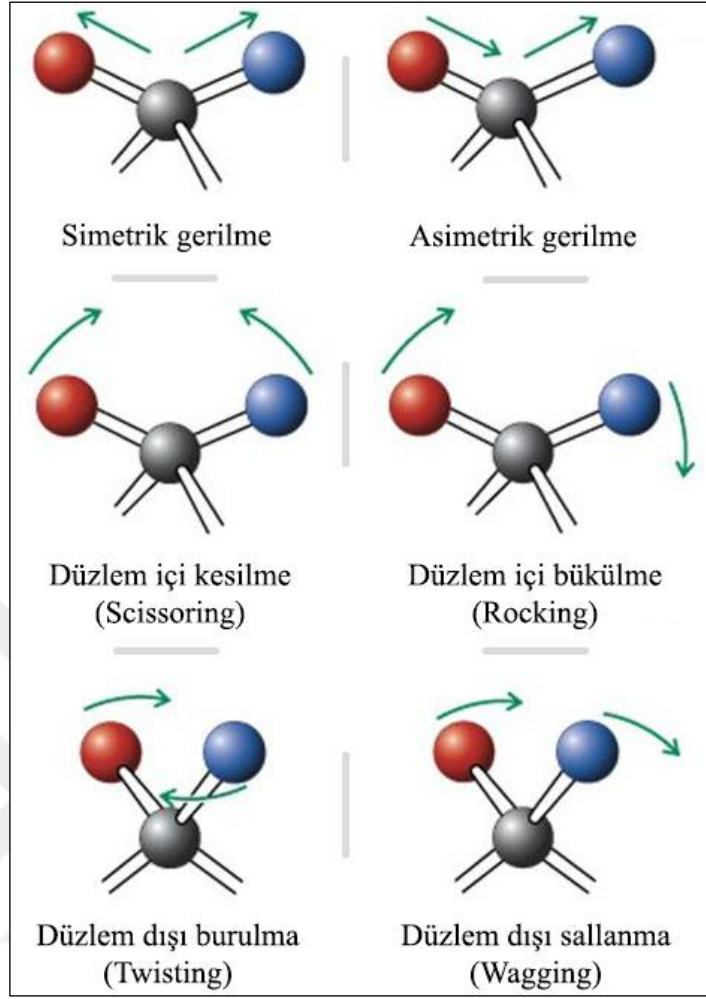


Şekil 1.10. Farklı bölgeler arasındaki sınırları gösteren elektromanyetik spektrum

Elektromanyetik dalgalar frekanslarına göre radyo dalgaları, mikrodalgalar, kızılötesi (IR), görünür ışık, ultraviyole (UV), X ışınları ve gama (γ) ışınları olarak sınıflandırılırlar. Bir enerji türü olan elektromanyetik ışımaya büyük bir hızla uzayda

hareket eder. Bu enerji ve etki ettiği madde arasındaki etkileşimden dolayı maddedeki elektronların veya atomların enerji düzeyleri (bir moleküldeki elektronlar ile çekirdek veya atomlar arasındaki mesafe) değişebilir (Freifelder, 1982). Elektromanyetik enerjiyi oluşturan ışınlar foton ismi verilen ve ışığın şiddetini belirtmekte kullanılan parçacıklardan oluşmaktadırlar. Her molekül kendisine çarpan ışığı farklı seviyelerde soğurabilir (absorbsiyon) ve bunu gerçekleştirirken değişen miktarlarda enerji alıp verebilir. Moleküllerin ışık enerjisini soğurmadaki bu farklılıklarından dolayı spektrumdaki absorpsiyon çizgileri görülür. Böylelikle belli bir elektronik seviyedeki her molekül sahip olduğu titreşim ve dönme enerji seviyesinden dolayı spektrumda bir absorpsiyon bandı ve spektrum piki ile temsil edilir (Pekin, 2013).

Bir molekülde bulunan atomlar çok sayıda ve değişik tipteki titreşimler nedeniyle sürekli bir dalgalanma halindedir. Bu dalgalanma hareketlerinin oluşturduğu titreşimler temel olarak iki sınıfta incelenir. Bunlar gerilme ve eğilme titreşimleridir (Skoog ve diğ., 2014). İki atom arasındaki uzaklığın bu atomların bağ eksenine boyunca sürekli olarak değişmesiyle tanımlanan gerilme titreşimleri simetrik ve asimetrik olmak üzere iki tiptir. İki bağ arasındaki açının değişmesi ile tanımlanan eğilme titreşimlerinin ise kesilme, bükülme, sallanma ve burulma olarak dört tipi bulunmaktadır (Şekil 1.11.).



Şekil 1.11. Moleküllerde görülen titreşimsel hareketler

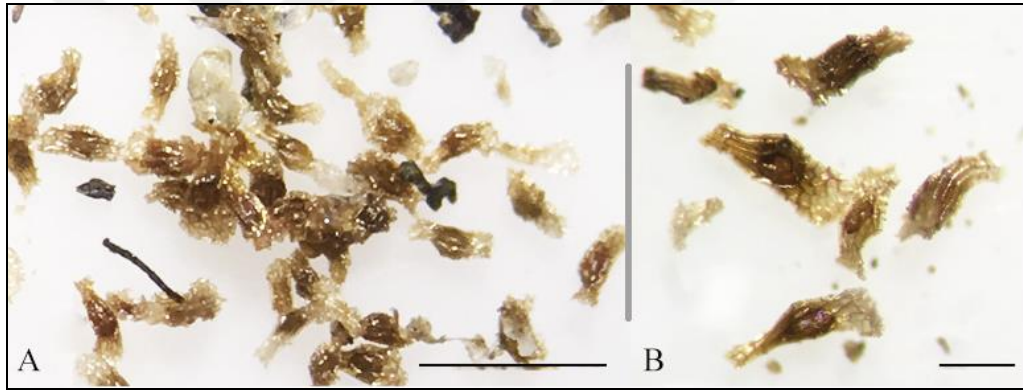
Vibrasyonel (titreşimsel) spektroskopisi, iki analitik teknik olan kızılötesi (infrared) ve Raman spektroskopisini tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir. Bu teknikler, numunedeki kimyasal bağlarla ilişkili titreşimsel enerji seviyelerini ölçer. Bu tekniklerden elde edilen spektrum her örnek için parmak izi gibi benzersizdir. Fourier Dönüştürülmü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi, dokularla ilişkili moleküler değişiklikleri optik olarak araştırmak için kullanılabilen titreşimsel bir spektroskopik tekniktir. Titreşimsel spektrumda bulunan spektral bantlar moleküle özgüdür ve dokunun biyokimyasal kompozisyonu hakkında doğrudan bilgi sağlar. FTIR pikleri nispeten dar ve özgündür ve birçok durumda molekül içindeki belirli bir kimyasal bağın (veya tek bir fonksiyonel grubun) titreşimi ile ilişkilidir (Ellis ve Goodacre, 2006). Bu titreşimsel spektroskopik teknik nispeten basit, tekrarlanabilir ve dokuya karşı zararsızdır. Ayrıca bu gibi spektroskopik ölçümler için numuneler kolay hazırlandığı gibi sadece çok küçük miktarlarda materyale (nanogram - miligram)

ihtiyaç duyulmaktadır (Movasaghi ve diğ., 2008). FTIR spektroskopisinin tıptan bitki fizyolojisine kadar çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır. Bir *in vitro* çalışmada FTIR spektroskopisi, bir süs bitkisi olan *Amsonia orientalis*'de BAP'ın neden olduğu fizyolojik değişimlerin incelenmesinde kullanılmış ve bu BBD'nin bitkinin primer metabolitlerine yaptığı etkiler ortaya konmuştur (Acemi ve diğ., 2016). Gıda piyasasında satılan soya, buğday, mısır protein izolatları ve konyak glukomannanında (KGM) bulunan fonksiyonel bileşikleri incelemek amacıyla yapılan bir çalışma yine FTIR spektroskopisi kullanılmıştır (Widjanarko ve diğ., 2011). Türker ve diğ. (2007) yaptıkları bir çalışmada ise yüksek bitkilerin karakterizasyonunda FTIR spektroskopisinden yararlanmış ve bu tekniğin bitkilerin spektral parmak izlerine göre birbirlerinden güvenilir bir şekilde ayırt edilebileceklerini göstermişlerdir. Bunların yanında FTIR spektroskopisi tıp literatüründe ağırlıklı olarak kanser, diyabet, Alzheimer, Parkinson ve epilepsi gibi sinirsel hastalıkların tedavisinde ve antidepresan olarak kullanılan ilaçların model organizmalarda neden oldukları moleküler değişimleri incelenmesinde kullanılmaktadır (Severcan ve diğ. 2010; Ozek ve diğ. 2010; Türker-Kaya ve diğ., 2016).

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

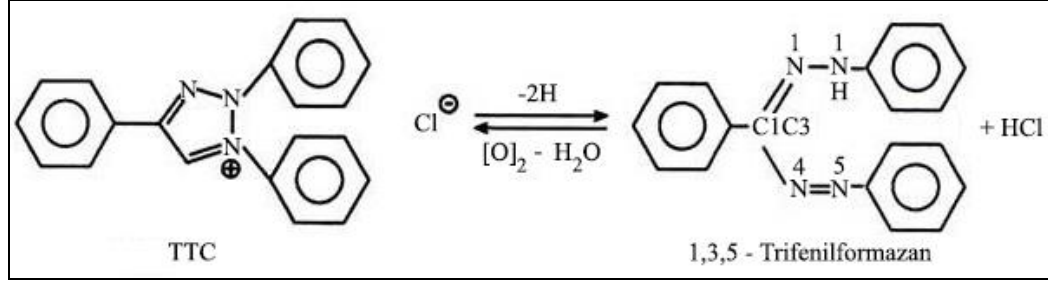
Bu tez çalışmasında kurulan *in vitro* kültürlerde başlangıç materyali olarak *Serapias vomeracea* orkidesinin tohumları kullanıldı (Şekil 2.1.). Bu tohumlar, 2013 yılında Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden (Menemen/İzmir) temin edildi. Orkide tohumları kullanılacakları zamana kadar nem ve güneş ışığı almayacak şekilde 4 °C'de tutuldu. Tohumların besiyerlerine ekilmeden önce yüzdesel olarak ne kadarının canlı olduğu belirlendi.



Şekil 2.1. *Serapias vomeracea* tohumlarının mikroskop görüntüleri. A: 16^x yakınlaştırma, ölçek: 0,5 mm, B: 80^x yakınlaştırma, ölçek: 0,1 mm

2.1.1. Tohum canlılığının belirlenmesi

Tohum canlılığının belirlenmesi için güvenilir ve çeşitli bitki tohumlarına göre uyarlanmış bir metot olan tetrazolyum testi kullanıldı. Yaşayan, solunum yapan ve renksiz bir indirgen kimyasal olan 2,3,5 - Trifeniltetrazolyum klorit (TTC) veya bromiti (TTB) dehidrogenaz enzimlerinin katalizlediği hidrojen aktarma reaksiyonları ile kırmızı bir bileşik olan 1,3,5 - Trifenilformazan'a çevirebilen tüm hücrelere bu test uygulanabilmektedir (Vujanovic ve diğ., 2000). Test sırasında işleyen reaksiyon mekanizması Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Tetrazolyum canlılık testi sırasında gerçekleşen reaksiyon

Testin yapılması için önce % 1 (m:v) TTC çözeltisi hazırlandı. Bunun için 0,2 g TTC 20 ml distile su içerisinde çözdürüldü ardından çözelti şırınga filtresinden geçirilerek steril edildi ve kullanılacağı zamana kadar 4 C’de amber şişede saklandı. TTC kimi zaman tohum kabuğundan içeri geçemediği için hücreler boyanmamakta ve yanlış sonuçlar elde edilmektedir. Bu nedenle test edilecek olan tohumların önce dezenfekte edilmesi, bu sayede kabuklarındaki pektin ve süberin benzeri hidrofobik yapıların kısmen temizlenerek yüzeyinin hidrofilik hale getirilmesi hedeflendi. Bu amaçla 2 dk. EtOH muamelesini takiben 10 dk % 1 (m:v) NaOCl ile tohumlar muamele edildi. TTC testinden önce suyun tohumların kabuklarını daha geçirgen hale getirip getirmediğini araştırmak için tohumlar iki gruba ayrıldı. Birinci grup 1 gün distile su içinde karanlıkta 30 °C’de bırakıldı ve ardından TTC testi uygulandı. Diğer grup ise direkt olarak yukarıda belirtilen dezenfeksiyon işlemlerine tabi tutulup TTC testi uygulandı. Tohumlar TTC testini takiben mikroskop altında incelendi, boyananlar sayıldı ve fotoğrafları çekildi.

2.2. Besiyelerinin Hazırlanması

Denemelerde Knudson C (KN; Knudson, 1946), Vacin ve Went (VW; Vacin ve Went, 1949), Murashige ve Skoog (MS; Murashige ve Skoog, 1962) ve Lindemann (LN; Lindemann ve diğ., 1970) besiyeleri sıvı ve katı olarak her iki fazda tam ve yarım güçlü konsantrasyonda kullanıldı. Besiyeri içerikleri Tablo 2.1.’de verilmiştir. KN, VW ve LN besiyeleri orkide tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi ve kültürleri için araştırmacılar tarafından geliştirilmiş olup MS besiyeri ise sadece orkideler için değil diğer tüm bitkilerin kültürlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tablo 2.1. KN, VW, MS ve LN besiyerlerinin içerikleri

İçerik	Besiyerleri (mg·l ⁻¹)			
	KN	VW	MS	LN
Makroelementler				
KNO ₃		525,000	1900,000	
NH ₄ NO ₃	500,000		1650,000	
NH ₄ H ₂ PO ₄	500,000			
(NH ₄) ₂ SO ₄		500,000		1000,000
Ca ₃ (PO ₄) ₂		200,000		
Ca(NO ₃) ₂	347,200			347,200
MgSO ₄	122,125	122,100	180,700	58,620
CaCl ₂			332,200	
KH ₂ PO ₄	250,000	250,000	170,000	135,000
KCl	250,000			1050,000
Mikroelementler				
AlCl ₃ ·6H ₂ O				0,056
NiCl ₂ ·6H ₂ O				0,031
MnSO ₄ ·H ₂ O	5,682	5,600	16,900	0,052
KI			0,830	0,099
H ₃ BO ₃			6,200	1,014
ZnSO ₄ ·7H ₂ O			8,600	0,565
CuSO ₄ ·5H ₂ O			0,025	0,019
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O			0,250	
CoCl ₂ ·6H ₂ O			0,025	
Demir kaynağı				
C ₆ H ₅ FeO ₇				4,400
FeSO ₄ ·7H ₂ O	25,000	27,800	27,800	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		37,260	37,260	
Vitaminler				
Nikotinic asit			0,500	1,000
Piridoksin-HCl			0,500	1,000
Tiamin-HCl		0,400	0,100	10,000
myo-İnositol			100,000	100,000
Aminoasitler				
Glisin			2,000	2,000
Karbon Kaynağı				
Sükroz	20000,000	20000,000	30000,000	20000,000

Denenmesi planlanan besiyerlerinin orijinal formülasyonlarındaki konsantrasyonlar kullanıldı. Bunlar, KN besiyeri için $2,16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, VW için $1,67 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, MS besiyeri için $4,43 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ve LN için $2,71 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ olarak belirlendi. Yarım güçlü besiyerlerini hazırlamak için bu miktarların yarısı kullanıldı. Besiyerlerini hazırlamak için 500 ml hacimli şişeler içerisine 200 ml dH_2O ilave edildi ve yukarıda yazılı olan miktarlarda besi yerleri ayrı ayrı eklendi. Bu işlemler manyetik karıştırıcı üzerinde ortamlar karıştırılırken yapıldı ve hemen ardından sükroz eklendi. Sükroz çözüldükten sonra pH 5,6 olarak ayarlandı ve katı besiyerleri için katılaştırıcı ajan olarak $3,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ phytigel çözeltilere eklendi. Çözeltiler $1,05 \text{ kPa}$ basınçta $121 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 20 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Şişeler elle tutulabilecek sıcaklığa ulaşınca tohum çimlendirme denemelerinde kullanılmak üzere her bir petri kabına 20 ml olacak şekilde dağıtıldı. Bitki büyütme denemeleri ise Magenta GA-7 kaplarında her bir kaba 40 ml besiyeri aktarıldıktan sonra gerçekleştirildi.

2.3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Deneylerde sitokinin grubundan kinetin (KIN) ve 6-benzilaminopürin (BAP), oksin grubundan indol-3-asetik asit (IAA) ve indol-3-bütirik asit (IBA), oksilipinlerden ise (\pm)-jasmonik asit (JAS) kullanıldı. Stok çözeltileri hazırlamak için 20 mg tartılan KIN ve BAP 2 ml 1 N NaOH içerisinde, IAA ise 2 ml saf EtOH içerisinde çözdürüldü ve çözelti hacimleri dH_2O ile 20 ml'ye tamamlandı. Yine aynı miktarda IBA doğrudan 20 ml dH_2O içerisinde çözdürülerek kullanıldı. Orijinal ambalajında 100 mg olarak yapışkan jel yapıda bulunan JAS ise 5 ml saf EtOH içerisinde çözdürüldükten sonra bu konsantre ($20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) stok çözeltiden 1 ml alınıp toplam hacim dH_2O ile 20 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tüm stok çözeltilerin son konsantrasyonları $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ olacak şekilde ayarlandı. Tüm stok çözeltiler ışık ve hava almayacak şekilde $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de amber şişelerde saklandı. Tüm BBD'ler besiyerinde ayrı ayrı $0,25$, $0,5$, 1 ve $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ konsantrasyonlarda kullanıldı.

2.4. Diğer Besiyeri Katkı Maddelerinin Hazırlanması

Muz homojenatı (BAN) üretmek için satın alınan muz meyveleri kabuklarından ayrıldıktan sonra küçük parçalara bölünerek liyofilizatörde kurutuldu. Bu sayede kurutma esnasında sıcaklık uygulanmadığı için muzların kararmaları önlendi. Tamamen kuruyan muz parçaları havanda toz haline gelinceye kadar ezildi ve muz

homojenatı elde edildi. Neme bağılı topraklanmayı engellemek için homojenatın tutulduğu kap içerisine küçük paketlerde silika jel koyuldu. Elde edilen homojenat % 1, 3 ve 5 (m:v) oranlarında besiyerine eklendi.

Hindistan cevizi suyu (COW) satın alınan meyvelerin içerisinden doğrudan falkon tüplerine aktarıldı. Kullanılan COW 0,22 μm por genişliğindeki şınga filtrelerinden geçirilerek önceden steril edildi ve sterilizasyondan sonra besiyerinde % 2,5, 5 ve 10 (v:v) oranlarında kullanıldı.

Sükroz (SUC) % 1, 3 ve 5 oranlarında, aktif kömür ise % 0,25, 0,5 ve 1 (m:v) oranlarında olmak üzere besiyeri hazırlanırken zeltiye doğrudan eklendi. Bu bölümde bahsedilen uygulamalar tohumların imlendirilmesi aşamasında denendi fakat sadece bitkinin fizyolojisinde değişime sebep olabilecek özellikte olanları bitki büyütme aşamasında kullanıldı.

2.5. Kitosan Oligomerleri ve Polimerinin Karakterizasyonu

Deneylerde toplam 3 tip kitosan (CHI) oligomeri ve polimeri kullanıldı. *Serapias vomeracea* tohumlarının imlendirilmesi aşamasında moleküler ağırlıkları 1, 10 ve 100 kDa olan oligomer karışımı ve polimerler, bitki büyüme aşamasında ise sadece 1 ve 10 kDa moleküler ağırlıklarındaki oligomer karışımı ve polimer kullanıldı. Kullanılan 1 kDa moleküler ağırlıktaki kitosan bir oligomer karışımı olup bu karışımı oluşturan oligomerlerin polimerizasyon derecesi (DP) 2-15 arasındadır. Moleküler ağırlıkları 10 ve 100 kDa olan kitosanlar ise polimer olup sırasıyla DP 70 ve ≈ 220 'dir. Kullanılan tüm kitosan örneklerinin asetilasyon dereceleri (DA) % 10'dur.

Başlangıç materyali olarak kullanılan karakterize edilmemiş kitosan Mahtani Chitosan PVT. LTD. (Veraval, Hindistan) firmasından hazır olarak temin edildi. Kitosan rneklerinin karakterizasyonu Vestfalya Wilhelms Üniversitesi, Bitki Biyolojisi ve Biyoteknolojisi Enstitüsü'nde (Münster, Almanya) gerçekleştirildi. Tezde kullanılması planlanan farklı DP'lere sahip oligomerlerin üretilmesi amacıyla 500 mg polimerik kitosan 30 ml $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ (amonyum asetat) içerisinde 12 μl kitosanz (EC 3.2.1.132) ve 5 μl % 37 (v:v) HCl eklendi ve 2 gün 37 $^\circ\text{C}$ 'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Elde edilen zelti 0,45 μm por genişliğindeki şınga filtresinde geçirilerek szld. zeltinin son konsantrasyonunu 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

ayarlamak için üzerine 30 ml distile su ilave edildi ve önceden 30 dk -96 °C'de dondurulduktan sonra 1 gün boyunca liyofilizatörde kurutuldu. Elde edilen beyaz ipliksi kitosan örneğinden 45 mg alınıp 4 ml C₂H₇NO₂ içerisinde çözdürüldü ve pH'sı 4,5 olarak ayarlandı. Oluşan oligomer ve polimerlerin moleküler ağırlık dağılımları çok açılı lazer ışın saçılımı (multi angle laser light scattering; MALLS) ve diferansiyel kırılma indisi dedektörüne (differential refractive index; DRI) sahip boyut eleme kromatografisi - yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (high pressure - size exclusion chromatography; HP-SEC) vasıtasıyla belirlendi (Schatz ve diğ., 2003). Fraksiyon toplayıcısının debisi 0,6 ml·dk⁻¹ olarak ayarlandı ve oluşan fraksiyonlar 600. dakikadan itibaren 24 saat boyunca toplandı. Her bir fraksiyon 4 ml oligomer/polimer ve tampon içermektedir. Fraksiyonlar toplandıktan sonra aynı oligomer/polimer piklerine ait olan tüpler birleştirildi ve liyofilizatörde 2 gün boyunca kurutuldu. Kurutulan örnekler 1,8 ml dH₂O içerisinde çözdürülüp santrifüj tüplerine aktarıldı. Ardından bu tüplerdeki numuneler tekrar liyofilizatörde 2 gün boyunca kurutuldu. Elde edilen oligomer/polimer örneklerinin saflıkları matris aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (matrix assisted laser desorption ionization - time of flight - mass spectrometry; MALDI-TOF-MS) ile belirlendi (Haebel ve diğ., 2007). Bu işlem için 100 µg örnek alındı ve 10 µl C₂H₇NO₂ içerisinde çözdürülerek MALDI-TOF-MS yürütüldü. Elde edilen oligomer ve polimerlerin DA'ları ¹H NMR (nükleer manyetik rezonans) spektrometresiyle belirlendi (Vårum ve diğ., 1991).

2.6. Doku Kültürü Denemeleri

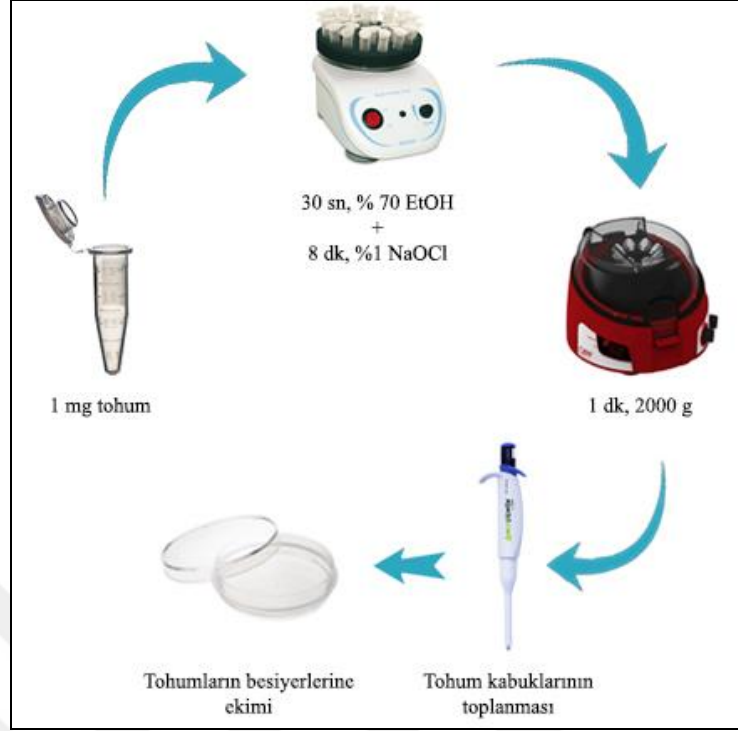
2.6.1. Tohumların yüzeysel sterilizasyonu

Tohumların yüzeysel sterilizasyonu için bir ön işlemin gerekli olup olmadığını anlamak ve daha etkin bir dezenfeksiyon protokolü geliştirmek açısından 1 mg olarak tartılıp santrifüj tüplerinin içine alınan tohumlar 4 gruba ayrıldı. Birinci grup; 30 sn % 70 (v:v) EtOH uygulamasının ardından 8 dk % 0,5 (v:v) NaOCl ile, ikinci grup; 30 sn % 70 (v:v) uygulamasının ardından 8 dk % 1 (v:v) NaOCl ile, üçüncü grup; doğrudan 8 dk % 0,5 (v:v) NaOCl ile, dördüncü grup ise doğrudan 8 dk % 1 (v:v) NaOCl ile dezenfekte edilip steril dH₂O ile durulandıktan sonra doğrudan MS besiyerine ekildi. Yüzeysel sterilizasyon uygulamaları sırasında santrifüj tüpleri

vorteks çalkalayıcı üzerinde tutuldu. Yüzey gerilimini azaltmak amacıyla, kullanılan stok sterilant çözeltilerinin içerisine 0,5 ml Tween-20 eklendi. On beş günlük inkübasyonun sonucunda kontaminasyon dereceleri gözlemlendi ve en uygun yüzeysel sterilizasyon protokolü deneylerde kullanıldı.

2.6.2. Özgün yüzeysel sterilizasyon protokolünün geliştirilmesi

Orkide tohumlarının hassas fiziksel yapısından dolayı çoğu zaman embriyoları toplanma veya yüzeysel sterilizasyon işlemleri esnasında tohum kabuğundan dışarı çıkarak canlılığını yitirmektedir. Bu yüzden mikroskop altında tohumlar incelendiğinde embriyosu bulunmayan tohum kabukları veya döllenmemiş tohumlar da görülmektedir. Bu durumu ortadan kaldırmak ve sadece embriyoya sahip tohumları besiyerine ekebilmek için yüzeysel sterilizasyon aşamasında embriyoya sahip tohumlar ile sadece kabukların birbirinden ayrılması gerekmektedir. Bunu sağlamak için özgün bir sterilizasyon protokolünün tasarlanması gerekli görüldü. Bu amaçla tohumların kütle farkından yararlanarak düşük g kuvveti uygulaması ile birbirlerinden ayrılacakları düşünüldü. Bunun için *Serapias vomeracea* tohumlarının yüzeysel sterilizasyon protokolüne son bir basamak olarak 1 dk boyunca 2000 g'de santrifüj işlemi eklenerek embriyosu kaybolmamış tohumların sıkışmadan dibe çökmesi, sadece tohum kabuklarının ise tüpün üstünde toplanması sağlandı. Daha sonra bu kabuklar mikropipet yardımıyla tüpten uzaklaştırıldı ve durulama suyu tamamen boşaltıldı. Geliştirilen özgün protokolün akış şeması Şekil 2.3.'de verilmiştir.



Şekil 2.3. Tohumların yüzeysel sterilizasyon basamakları için akış şeması

2.6.3. Tohumların besiyerlerine ekimi

Durulama işlemi sonunda santrifüj tüplerinin tabanında kalan tohumların üzerine hangi besiyerine ekim yapılacaksa o besiyerinin steril edilmiş sıvı hali 250 µl olacak şekilde eklendi ve sıvı içerisinde dağılan tohumlar mikropipet yardımıyla çekilerek petri kaplarındaki besiyerlerine aktarıldı. Bu aşama 2 faza ayrılmaktadır. Birinci fazda denemelerde hangi besiyerinin hangi fiziksel halde kullanılmasının uygun olacağını karar vermek için bazal tam ve yarım güçlü besiyerlerinin hem katı hem de sıvı hallerine ekimler yapıldı. İkinci fazda ise birinci fazdaki denemelerden elde edilen sonuçlara göre en iyi çimlenme oranını veren besiyerinde sonraki denemeler devam ettirildi. Söz konusu denemelerde kitosan, BBD'ler veya diğer besiyeri katkı maddelerinin tohum çimlenmesi üzerindeki etkileri incelendi. Bu denemelerde kullanılan besiyerleri ve içeriklerinin daha kolay takibi açısından isimleri, fiziksel halleri ve içerikleri kodlarla kısaltıldı. Birinci fazda kullanılan besiyerleri, konsantrasyonları ve fiziksel halleri Tablo 2.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Tohum çimlendirmesinde birinci fazda kullanılan bazal besiyerleri

Besiyeri içeriği	Konsantrasyonu	Fiziksel hali
KN	1	Katı
KN	½	Katı
KN	1	Sıvı
KN	½	Sıvı
VW	1	Katı
VW	½	Katı
VW	1	Sıvı
VW	½	Sıvı
MS	1	Katı
MS	½	Katı
MS	1	Sıvı
MS	½	Sıvı
LN	1	Katı
LN	½	Katı
LN	1	Sıvı
LN	½	Sıvı

2.6.4. Tohumların sayımı ve değerlendirme

Tohumlar 45 günlük inkübasyon süresinin sonunda diseksiyon mikroskobunda 20 kat büyütme altında gözlemlendi ve sayıldı. Tohumlar sayılırken çimlenme durumlarına göre safhalara ayrıldı ve bu şekilde daha detaylı bir inceleme ve büyüme analizi gerçekleştirildi. Kapağında buğu oluşan sıvı kültürlerde sayımı kolaylaştırmak amacıyla bu kaplar oda sıcaklığında buğu ortamdan kalkana kadar bekletildi. Petri kaplarının altı 2 × 2 cm boyutunda karelere ayrılarak sayım kolaylaştırıldı. Tohumların hangi çimlenme safhasında oldukları Yamazaki ve Miyoshi (2006)'ye göre değerlendirildi (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. Tohum çimlenme safhaları (Yamazaki ve Miyoshi, 2006)

Çimlenme safhası	Belirteçler
Safha 0	Çimlenme yok. Embriyo büyümesi gözlemlenmez.
Safha 1	Ön-çimlenme safhası. Embriyo tohum kabuğunu enine doldurur.
Safha 2	Çimlenme safhası. Embriyo tohum kabuğundan çıkıntı yapar.
Safha 3	Protokorm safhası. Embriyo tohum kabuğundan kurtulur.
Safha 4	Rizoit safhası. Protokorm yüzeyinde rizoitler görülür.
Safha 5	Sürgün safhası. Protokormdan sürgün farklılaşır.

Tohum çimlenme yüzdelerinin hesaplanmasında Formül (2.1);

$$\text{Çimlenme yüzdesi (\%)} = \frac{\Sigma \text{Tohum sayısı (Safha 2 - 5)} \times 100}{\Sigma \text{Tohum sayısı (Safha 0 - 5)}} \quad (2.1)$$

kullanıldı.

Tohum çimlendirmesinde etkileri denenen besiyerlerinden en etkili olanı belirlenip sonraki denemelere o besiyerinde devam edildi. Bu aşamada kullanılan besiyerleri Tablo 2.4.'de gösterilmektedir. Kültür periyodu sonunda başlık 2.6.4.'deki işlemler tekrar edilerek tohum çimlenme yüzdeleri hesaplandı.

Tablo 2.4. Tohum çimlendirmesinde ikinci fazda kullanılan besiyerleri

Besiyeri kodu	Besiyeri içeriği	Besiyeri kodu	Besiyeri içeriği
SG-1	KN + % 1 BAN	SG-26	KN + 2 mg·l ⁻¹ KIN
SG-2	KN + % 3 BAN	SG-27	KN + 0,25 mg·l ⁻¹ IAA
SG-3	KN + % 5 BAN	SG-28	KN + 0,5 mg·l ⁻¹ IAA
SG-4	KN + % 1 SUC	SG-29	KN + 1 mg·l ⁻¹ IAA
SG-5	KN + % 3 SUC	SG-30	KN + 2 mg·l ⁻¹ IAA
SG-6	KN + % 5 SUC	SG-31	KN + 0,25 mg·l ⁻¹ IBA
SG-7	KN + % 2,5 COW	SG-32	KN + 0,5 mg·l ⁻¹ IBA
SG-8	KN + % 5 COW	SG-33	KN + 1 mg·l ⁻¹ IBA
SG-9	KN + % 10 COW	SG-34	KN + 2 mg·l ⁻¹ IBA
SG-10	KN + % 0,25 ACH	SG-35	KN + 0,25 mg·l ⁻¹ JAS
SG-11	KN + % 0,5 ACH	SG-36	KN + 0,5 mg·l ⁻¹ JAS
SG-12	KN + % 1 ACH	SG-37	KN + 1 mg·l ⁻¹ JAS
SG-13	KN + % 1 BAN - SUC	SG-38	KN + 2 mg·l ⁻¹ JAS
SG-14	KN + % 3 BAN - SUC	SG-39	KN + 5 mg·l ⁻¹ CHI 1 kDa
SG-15	KN + % 5 BAN - SUC	SG-40	KN + 10 mg·l ⁻¹ CHI 1 kDa
SG-16	KN + % 2,5 COW - SUC	SG-41	KN + 15 mg·l ⁻¹ CHI 1 kDa
SG-17	KN + % 5 COW - SUC	SG-42	KN + 20 mg·l ⁻¹ CHI 1 kDa
SG-18	KN + % 10 COW - SUC	SG-43	KN + 5 mg·l ⁻¹ CHI 10 kDa
SG-19	KN + 0,25 mg·l ⁻¹ BAP	SG-44	KN + 10 mg·l ⁻¹ CHI 10 kDa
SG-20	KN + 0,5 mg·l ⁻¹ BAP	SG-45	KN + 15 mg·l ⁻¹ CHI 10 kDa
SG-21	KN + 1 mg·l ⁻¹ BAP	SG-46	KN + 20 mg·l ⁻¹ CHI 10 kDa
SG-22	KN + 2 mg·l ⁻¹ BAP	SG-47	KN + 5 mg·l ⁻¹ CHI 100 kDa
SG-23	KN + 0,25 mg·l ⁻¹ KIN	SG-48	KN + 10 mg·l ⁻¹ CHI 100 kDa
SG-24	KN + 0,5 mg·l ⁻¹ KIN	SG-49	KN + 15 mg·l ⁻¹ CHI 100 kDa
SG-25	KN + 1 mg·l ⁻¹ KIN	SG-50	KN + 20 mg·l ⁻¹ CHI 100 kDa

2.6.5. Protokormların besiyerine aktarılması

Tohumların çimlenmesi sonucu oluşan protokormlardan sadece safha 4 ve 5 derecesinde gelişmiş olanlar besiyerlerinden alınarak kitosan, BBD'ler veya diğer besiyeri katkı maddeleri ilave edildi ve önceki denemelerde en yüksek çimlenme oranının bulunduğu besiyerine aktarıldı. Bu besiyerinde protokormlar 6 ay boyunca kültüre alındı. Besiyerinde kararmalar gözlemlenmesi durumunda besiyerleri yenilendi. Bu aşamada kullanılan besiyerleri Tablo 2.5.'de gösterilmektedir. Çimlenen tohumların protokorma dönüşüm oranları Formül (2.2)'ye göre;

$$\text{Protokorma dönüşüm oranı (\%)} = \frac{\Sigma \text{ Tohum sayısı (Safha 3 - 5)} \times 100}{\Sigma \text{ Tohum sayısı (Safha 2 - 5)}} \quad (2.2)$$

hesaplandı.

Tablo 2.5. Bitki büyümesinde kullanılan besiyerleri

Besiyeri kodu	Besiyeri içeriği	Besiyeri kodu	Besiyeri içeriği
<i>PG-1</i>	KN + % 1 BAN - SUC	<i>PG-18</i>	KN + 2 mg·l ⁻¹ IAA
<i>PG-2</i>	KN + % 3 BAN - SUC	<i>PG-19</i>	KN + 0,25 mg·l ⁻¹ IBA
<i>PG-3</i>	KN + % 5 BAN - SUC	<i>PG-20</i>	KN + 0,5 mg·l ⁻¹ IBA
<i>PG-4</i>	KN + % 2,5 COW - SUC	<i>PG-21</i>	KN + 1 mg·l ⁻¹ IBA
<i>PG-5</i>	KN + % 5 COW - SUC	<i>PG-22</i>	KN + 2 mg·l ⁻¹ IBA
<i>PG-6</i>	KN + % 10 COW - SUC	<i>PG-23</i>	KN + 0,25 mg·l ⁻¹ JAS
<i>PG-7</i>	KN + 0,25 mg·l ⁻¹ BAP	<i>PG-24</i>	KN + 0,5 mg·l ⁻¹ JAS
<i>PG-8</i>	KN + 0,5 mg·l ⁻¹ BAP	<i>PG-25</i>	KN + 1 mg·l ⁻¹ JAS
<i>PG-9</i>	KN + 1 mg·l ⁻¹ BAP	<i>PG-26</i>	KN + 2 mg·l ⁻¹ JAS
<i>PG-10</i>	KN + 2 mg·l ⁻¹ BAP	<i>PG-27</i>	KN + 5 mg·l ⁻¹ CHI 1 kDa
<i>PG-11</i>	KN + 0,25 mg·l ⁻¹ KIN	<i>PG-28</i>	KN + 10 mg·l ⁻¹ CHI 1 kDa
<i>PG-12</i>	KN + 0,5 mg·l ⁻¹ KIN	<i>PG-29</i>	KN + 15 mg·l ⁻¹ CHI 1 kDa
<i>PG-13</i>	KN + 1 mg·l ⁻¹ KIN	<i>PG-30</i>	KN + 20 mg·l ⁻¹ CHI 1 kDa
<i>PG-14</i>	KN + 2 mg·l ⁻¹ KIN	<i>PG-31</i>	KN + 5 mg·l ⁻¹ CHI 10 kDa
<i>PG-15</i>	KN + 0,25 mg·l ⁻¹ IAA	<i>PG-32</i>	KN + 10 mg·l ⁻¹ CHI 10 kDa
<i>PG-16</i>	KN + 0,5 mg·l ⁻¹ IAA	<i>PG-33</i>	KN + 15 mg·l ⁻¹ CHI 10 kDa
<i>PG-17</i>	KN + 1 mg·l ⁻¹ IAA	<i>PG-34</i>	KN + 20 mg·l ⁻¹ CHI 10 kDa

2.6.6. Büyüme parametrelerinin değerlendirilmesi

Kültür periyodu sonunda protokormlardan gelişen bitkilerin boyları, yaprak sayıları, kök boyları, kök sayıları ve varsa yumru sayıları ve çapları hesaplandı. Bu

parametrelere ait veriler alındıktan sonra bitkilerin yaprak ve kök/yumrularından doku örnekleri alındı ve denenen kitosan, BBD'ler veya diğer besiyeri katkı maddelerinin fizyolojik etkileri FTIR spektroskopisiyle belirlenmek üzere çeşitli işlemlere tabi tutuldu.

2.6.7. Kültür şartları

Kültürler bitki büyütme kabiniinde $23 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta, ortalama $60 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ dinamik fotosentetik foton akı yoğunluğundaki ışık altında, 16/8 saat aydınlık/karanlık ışıklandırma periyodunda inkübe edildi. Kültürlerden buharlaşmayı azaltmak için, sıvı kültürlerin de kullanıldığı tohumların çimlendirme denemelerinde büyütme kabiniinin nispi nemi % 50'ye ayarlandı.

2.7. FTIR Spektroskopisi Çalışmaları

2.7.1. FTIR için doku örneklerinin hazırlanması

Bitkilerden alınan doku örnekleri küçük parçalara ayrılarak 1 gün boyunca liyofilizatörde kurutuldu. Bu aşamada protein ve lipit yapılarının bozulmaması için sıcaklık uygulaması yoluyla kurutma tercih edilmedi. Ağat havanda kuru örnekler toz haline getirildikten sonra her bir örnekten 1 mg alındı ve santrifüj tüpleri içerisinde 100 mg KBr (potasyum bromür) ile karıştırıldı. Ardından örnekler 1 gün boyunca tekrar liyofilizatörde kurutuldu ve bu karışım hidrolik pelet presi kullanılarak $\approx 100 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ (1300 psi) basınçta sıkıştırılarak ince bir KBr diski (pelet) elde edildi.

2.7.2. FTIR spektrumlarının eldesi

Peletlerin infrared (IR) spektrumları DTGS (döteryumlanmış triglisin sülfat) dedektörlü FTIR spektrometresi (Perkin-Elmer Spectrum One) kullanılarak elde edildi. Havadaki karbondioksit ve su molekülleri IR spektrumunu etkilediği için önceden havanın spektrumu alınıp, Spectrum One yazılımı ile otomatik olarak örnek spektrumlarından çıkarıldı. Örneklerin spektrumları $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında ve her bir inferogram 100 tarama ile 4 cm^{-1} çözünürlükte kaydedildi (Acemi ve diğ., 2016).

2.7.3. FTIR spektrumlarının analizi

Elde edilen spektrumlar Savitsky-Golay filtresi ile arka plan gürültüsünden arındırıldı. Frekanslar ve bant alanları ikincil türevi alınmış spektrumlardan Spectrum One yazılımı kullanılarak tespit edildi (Türker ve diğ., 2007). Bant pozisyonları piklerin oluşturduğu alanların ağırlık merkezlerine (sinyal yüksekliği \times 0,8) karşılık gelen frekanslar kullanarak ölçüldü. Spektral bantların sinyal şiddetleri ve/veya alan değerlerindeki değişimler bu bantların ifade ettikleri molekül gruplarının konsantrasyonlarındaki değişimleri yansıtmaktadır (Türker ve diğ., 2007). Bu nedenle bitkiye uygulanan kitosan, BBD'ler veya diğer besiyeri katkı maddelere bağlı olarak bitki yapısında moleküllerin konsantrasyonlarında meydana gelen değişimleri açığa çıkarmak için her bir moleküle özgü spektral bantların alanları hesaplandı. Spektrumların analizinden önce bitkideki fizyolojik değişimleri yansıtan molekül gruplarının neden oldukları spektral değişimlerin net olarak gösterilmesi amacıyla spektrumlar baseline düzeltilmesi yapıp normalize edildi.

2.7.4. Hiyerarşik kümeleme analizi (HCA)

Hiyerarşik kümeleme analizi (Hierarchical Cluster Analysis; HCA) bir tür çok değişkenli teknikler grubu olup, temel amacı birimleri sahip oldukları karakteristik özellikleri baz alarak gruplamaktır (Türker ve diğ., 2007). Bu teknik, örnekler arasındaki benzerliklerin gösterilmesi ve yorumlanmasına yönelik sıkça kullanılan kemometrik yöntemlerden birisidir. Bundan dolayı FTIR spektroskopisinden elde edilmiş örnek spektrumlarını benzerlik ve farklılıklarına göre sınıflandırabilmektedir. Bu çalışmada, fazla sayıda besiyerinin etkilerine odaklanıldığından bu grupların arasındaki spektral farklılıklar ya da benzerliklere göre sınıflandırma ihtiyacı doğmuştur. Bu sınıflandırmanın yapılabilmesi için en uygun frekans aralıklarında baz alınarak verilere HCA tekniği uygulandı.

HCA literatürdeki benzer çalışmalar baz alınarak yapıldı (Türker ve diğ., 2007; 2016). Analiz OPUS 5.5 (OPUS, Bruker Optics) programı ile gerçekleştirildi. Kümeleme analizi için kullanılan ikincil türevi alınmış ve 13 değerlikli düzleştirme (smoothing point) faktörlü örnek spektrumlarına ilk olarak vektör normalizasyonu uygulandı. Daha sonra Ward algoritmasına bağlı kalarak spektrumlar 4000-400 cm^{-1} aralığında farklı frekanslarda en uygun ayrımı bulmak üzere test edildi. Uygulamada

4000-400 cm^{-1} frekans aralığında en uygun ayırım 1716-1460 cm^{-1} bölgesinde tespit edildi ve buna bağlı olarak dendogramlar çizildi. Dendogramların oluşturulmasında spektral mesafe çiftleri program tarafından hesaplandı.

2.8. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Tohum çimlendirme, bitki büyütme ve FTIR spektroskopisi çalışmalarının tamamı 3 tekrarlı olarak yapıldı. Tohum çimlendirme aşamasında her bir besiyeri ve denenen uygulama için 1'er mg tohum kullanılarak her bir tekrarda 3 petri kabına ekim yapıldı. Bu aşamada kültür periyodu 45 gün olarak uygulandı ve bu dönem sonunda tohumların çimlenme safhaları ve genel çimlenme oranları yüzdesel olarak hesaplandı. Bitki büyütme çalışmalarında etkileri denenen her bir uygulama için ise Magenta GA-7 kültür kaplarında 5'er protokorm kültüre alındı ve her tekrarda 3 kültür kabı kullanıldı. Bu aşamada ise kültür periyodu 6 ay olarak uygulandı ve bu dönem sonunda ölçülen tüm parametrelere ait değerler ortalama olarak verildi. FTIR çalışmaları için ise toz haline getirilen yaprak ve kök/yumru örneklerinin her birinden 3'er adet pelet hazırlandı. Spektral analizlerde odaklanılan bantların frekansları ve alan ortalamaları hesaplandı. Tüm çalışmalarda verilen sonuç değerleri "ortalama \pm standart sapma" şeklinde verildi. İstatistiki değerlendirmelerde ise kontrol grubuna oranla uygulamadan kaynaklanan büyüme parametreleri arasında bir farkın olup olmadığı varyans analizi (ANOVA) kullanılarak, şayet istatistiki fark var ise bu farklılığın hangi uygulama veya uygulamalardan kaynaklandığını bulmak için $p < 0,05$ önem derecesi dikkate alınmak suretiyle Duncan testi uygulanarak belirlendi. FTIR sonuçlarının istatistiki analizinde ise ANOVA uygulaması ardından $p < 0,05$ ve $p < 0,001$ önem dereceleri dikkate alınarak Tukey HSD testi uygulandı ve kontrole kıyasla istatistiki olarak farklı olan sonuçlar gösterildi. İstatistiki testler IBM SPSS Statistics 22 programı kullanılarak gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

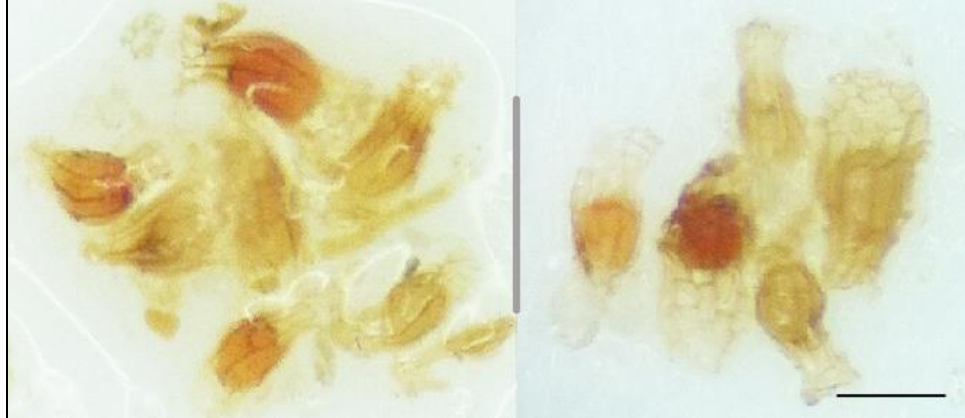
3.1. Tohum Canlılığının Belirlenmesine Ait Bulgular

TTC çözeltisi hazırlandığında pH derecesi ölçüldü ve 6,4 olarak bulundu. pH derecesi daha sonra 0,5 M NaOH kullanılarak 6,95'e ayarlandı. Bir gün süreyle distile su içerisinde bekletilen tohumlar sterilizasyondan sonra bekletilmeyenlere göre TTC testine daha yüksek oranda cevap verdi (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. dH₂O inkübasyonunun tohum canlılık testi sonuçlarına etkisi

Uygulama	Ortalama canlılık (%)
24 saat dH ₂ O + Yüzeysel sterilizasyon	54,67 ± 4,16
Yüzeysel sterilizasyon	43,67 ± 3,06

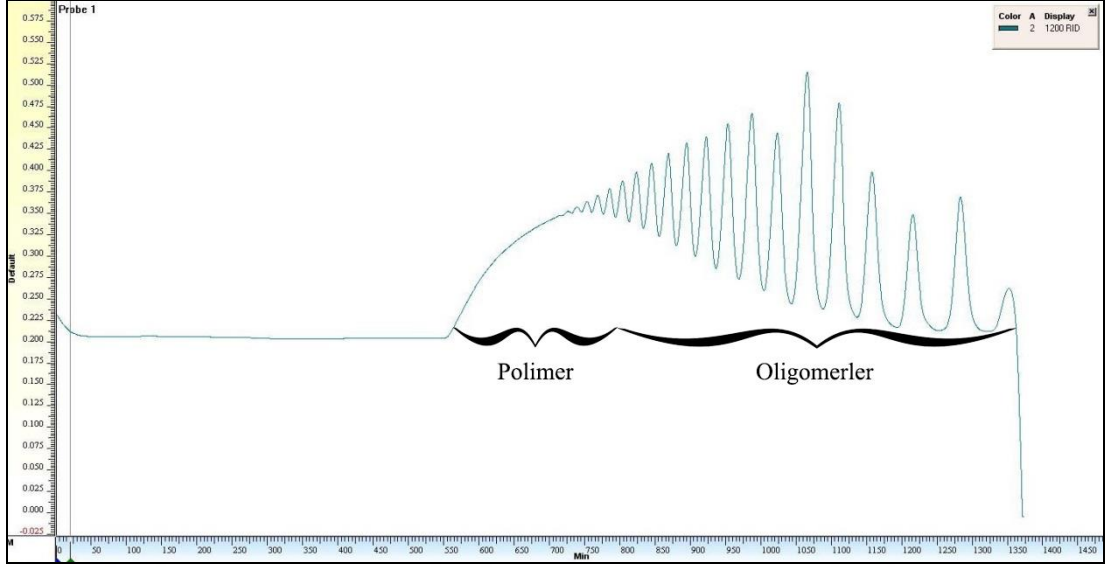
TTC testinden elde edilen fotoğraflarda ise tohumların canlılığı embriyoların kırmızıya boyanmasından anlaşılmaktadır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. TTC testi sonunda boyanan canlı embriyolar (ölçek: 0,1 mm)

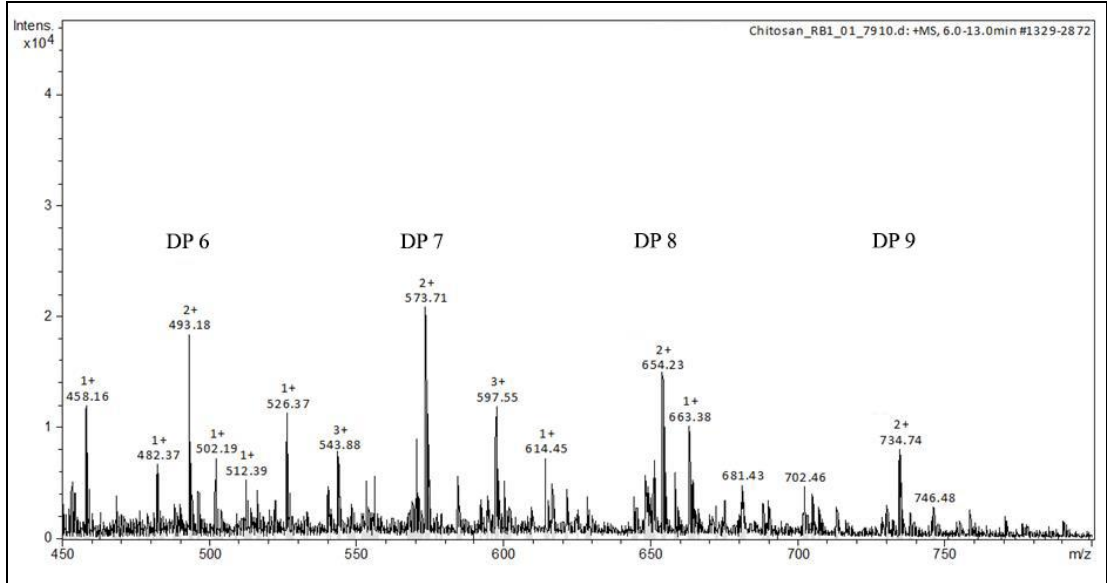
3.2. Kitosanların Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Başlangıç materyali olarak kullanılan polimerik kitosanın kitosanaz ile inkübasyonu ve HP-SEC-RID-MALLS çalışması sonucunda elde edilen çeşitli polimerizasyon derecelerine sahip oligomerler Şekil 3.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. HP-SEC-RID-MALLS kromatogramında denemelerde kullanılan oligomerik ve polimerik kitosan fraksiyonlarının görünümü

HP-SEC-RID-MALLS kromatogramında görülen oligomerlerin (her bir pik kapladığı alana göre 1-4 mg arası oligomer içermektedir) ancak düşük miktarlarda üretimlerinin mümkün olmasından dolayı deneylerde oligomerlerin ayrı ayrı kullanılması uygun görülmedi. Bu nedenle farklı DP'lerdeki oligomerleri ayrı ayrı kullanmak yerine bunların birleştirilerek toplu bir oligomer fraksiyonunun kullanılmasına karar verildi. Üretilen oligomerlerin saflıkları MALDI-TOF-MS analizi sonucu teyit edildi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. MALDI-TOF-MS kromatogramında gözlenen bazı oligomerler

3.3. Yüzeysel Sterilizasyon Denemelerine Ait Bulgular

Tohumlara ait yüzeysel sterilizasyon protokolünün oturtulması için etil alkol (EtOH) ve NaOCl'den oluşan ve çeşitli sürelerde tohumların bu solüsyonların farklı konsantrasyonları içerisinde tutulması ile oluşturulmuş denemeler kuruldu. Denemelerden elde edilen bulgular Tablo 3.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. Çeşitli yüzeysel sterilizasyon uygulamalarının başarı dereceleri

Uygulama	Konsantrasyon (%)	Zaman (dk)	Kontaminasyon*
NaOCl	0,5	8	+++
NaOCl	1,0	8	++
EtOH + NaOCl	70 + 0,5	0,5 + 8	+
EtOH + NaOCl	70 + 1,0	0,5 + 8	-

*Her bir + işareti ekimlerde yaklaşık %20'lik bir kontaminasyonu ifade etmektedir

Yukarıdaki tablodan da görüleceği üzere *Serapias vomeracea* tohumlarının kısa sürede yüzeysel sterilizasyonları için bir ön işleme ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla kültürlerin başlatılması için tamamen dezenfekte edilmiş tohumların elde edilmesinin 30 s EtOH ve ardından 8 dk NaOCl uygulaması sonucunda mümkün olduğu belirlendi.

3.4. Faz 1 Besiyerlerinde Çimlendirme Denemelerine Ait Bulgular

3.4.1. Katı besiyerlerine ait bulgular

Kültür periyodunun sonunda yapılan hesaplamalara göre oransal olarak safha 0 tohumların en fazla görüldüğü besiyeri KN olarak bulundu. Genel bir sonuç olarak Tablo 3.3.'den görülebileceği üzere KN ve LN besiyerleri safha 0 tohumların en fazla buldukları ortamlar olarak tespit edildi. Tam ve yarı güçlü MS besiyeri ise safha 0 tohumların en az görüldüğü ortam olarak belirlendi. Bu bağlamda, tohumların *in vitro* ortamda çimlenmeye karşı en fazla tepkisiz kaldıkları besiyerleri KN ve LN olurken MS besiyeri tohumların safha 0'dan safha 1'e geçişlerini artırdı. KN ve LN besiyerleri arasında safha 0 tohum yüzdeleri açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Çimlenme öncesi tohum şişmesinin gözlemlendiği safha 1'de gözlemlenen tohumların en fazla oldukları besiyeri tam ve yarı güçlü LN olarak belirlendi. Bunu takiben yarı güçlü VW besiyeri de bu safhadaki tohumların oranına

olumlu etki yaptığı tespit edildi. Bahsedilen bu üç besiyerinden alınan sonuçlar istatistiki olarak farklı bulunmadı. Bunun yanında yarı güçlü VW ile tam güçlü VW besiyerinden kaydedilen safha 1'deki tohum oranları arasında kayda değer fark görüldü. Safha 1'deki tohumların en az görüldüğü besiyeri ise KN olarak belirlendi. Çimlenmenin görüldüğü safha 2 aşamasındaki tohumlar en fazla KN besiyerinde bulundu. Bu safhadaki tohumlar ise en az LN besiyerinden kaydedildi. Embriyonun tohum kabuğundan sıyrılarak dışarı çıktığı safha 3 aşamasındaki tohumlar için en uygun besiyeri MS olarak belirlenirken KN besiyerinde bu safhada hiç tohum gözlenmedi. Rizoitlerin oluştuğu aşama olan safha 4'deki tohumlar ise sadece VW ve yarı güçlü MS ortamlarında gözlemlenirken yaprak primordiyasının ilk belirlediği aşama olan safha 5'de hiç tohum gözlenmedi. Orkide tohumları için belirlenen çimlenme parametreleri göz önüne alındığında safha 2 ve sonraki safhalarda bulunan tüm tohumlar çimlenmiş kabul edildi. Dolayısıyla çimlenme oranının kesin olarak belirlenmesi için safha 2'deki tohum yüzdelerinin sonraki safhalardakilerle toplanması gerekli görüldü. Veriler bu şekilde irdelendiğinde denenen katı besiyerleri içinde tohum çimlenmesinin en fazla görüldüğü besiyeri KN, en az görüldüğü besiyeri ise yarı güçlü LN olarak bulundu. (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. Farklı katı besiyerlerinin *Serapias vomeracea* tohumlarının çimlenmesine olan etkileri

Besiyeri	Tohum çimlenme safhaları (%)						
	Safha 0	Safha 1	Safha 2	Safha 3	Safha 4	Safha 5	Çimlenme
KN	15,04 ± 2,68 ^a	26,19 ± 5,32 ^d	58,77 ± 5,51 ^a	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	58,77 ± 5,51 ^a
½KN	13,04 ± 2,16 ^{ab}	35,46 ± 4,40 ^c	51,51 ± 3,13 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	51,51 ± 3,13 ^{ab}
VW	9,75 ± 0,98 ^{bc}	46,00 ± 5,16 ^b	40,82 ± 1,92 ^{cd}	2,83 ± 0,30 ^b	0,79 ± 0,10 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	44,43 ± 1,76 ^b
½VW	7,45 ± 0,47 ^{cd}	58,71 ± 7,69 ^a	33,71 ± 7,11 ^{de}	0,13 ± 0,05 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	33,85 ± 7,12 ^c
MS	4,55 ± 0,55 ^d	46,34 ± 2,37 ^b	47,51 ± 1,98 ^{bc}	1,60 ± 0,06 ^{bc}	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	49,10 ± 1,98 ^b
½MS	6,26 ± 1,55 ^d	46,07 ± 4,67 ^b	38,72 ± 3,17 ^d	7,44 ± 0,67 ^a	1,52 ± 0,09 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	47,68 ± 0,82 ^b
LN	13,86 ± 3,25 ^a	57,64 ± 2,16 ^a	27,47 ± 4,28 ^{ef}	1,03 ± 0,16 ^{bc}	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	28,50 ± 4,43 ^{cd}
½LN	13,01 ± 1,59 ^{ab}	61,22 ± 4,95 ^a	23,55 ± 5,23 ^f	2,21 ± 0,30 ^{bc}	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^a	25,76 ± 4,93 ^d

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

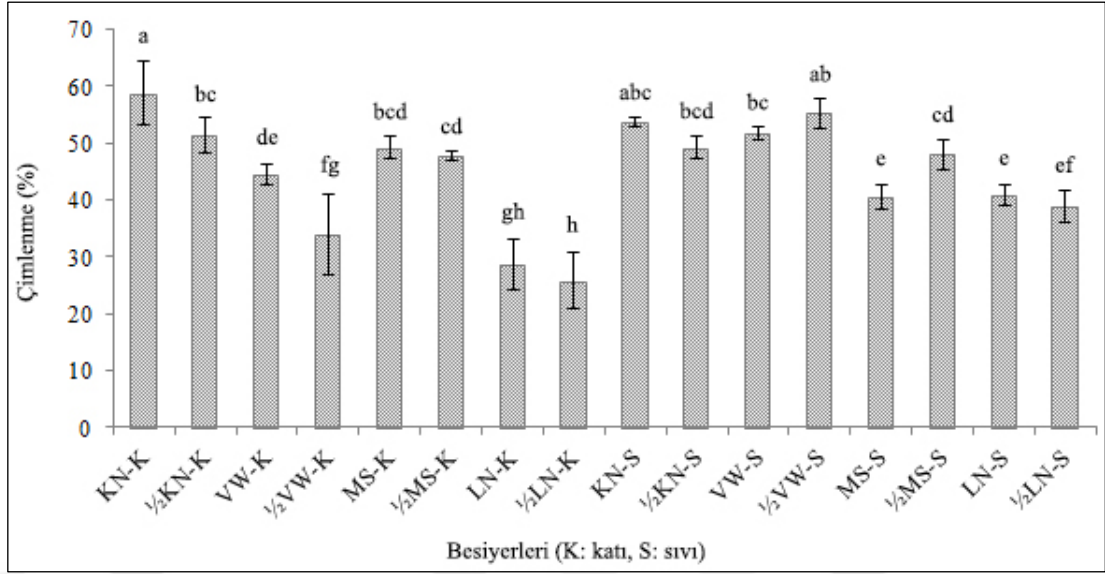
3.4.2. Sıvı besiyerlerine ait bulgular

Tohumları sıvı kültürün sonunda buldukları gelişim safhalarına göre gruplandırılarak yapılan hesaplamalara göre çimlenme belirtisinin olmadığı safha 0 aşamasındaki tohumlar en fazla katı kültürlerde olduğu gibi sıvı kültürlerde de KN besiyerinden elde edildi. Katı kültürlerde safha 0 aşamasındaki tohumların en az görüldükleri besiyeri sadece MS olarak bulunurken sıvı kültürlerde ise bu sonucu veren besiyerlerinin MS ve VW olduğu bulundu. Dolayısıyla sıvı kültür kullanılması VW besiyerinin tohumların ileriki safhalara geçişindeki etkisini artırdı. Safha 0 tohum yüzdeleri açısından bu iki besiyerinin arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmadı. En fazla safha 1'deki tohumun görüldüğü besiyerleri MS ve yarı güçlü LN, en az görüldükleri besiyeri ise yarı güçlü VW olarak bulundu. Çimlenmenin görüldüğü safha 2 aşamasındaki tohumlar en fazla tam ve yarı güçlü VW besiyerinde bulundu. Bu iki besiyerinden kaydedilen safha 2 sonuçları arasında ise istatistiki olarak fark bulunmadı. Katı besiyerindeki sonuçlara paralel olarak bu safhadaki tohumlar en az tam ve yarı güçlü LN ve MS besiyerlerinden kaydedildi. Protokorm aşaması olan safha 3'e geçen tohumların en sık kaydedildiği besiyeri KN olarak bulundu. Sıvı besiyerinin safha 3 aşaması göz önüne alındığında tohumlardan protokorm oluşumunu katı besiyerlerinden daha fazla teşvik ettiği görüldü. Katı besiyerlerindeki sonuçların aksine sıvı besiyerleri arasında rizoitlerin olduğu safha 4'deki tohumlar sadece KN besiyerinde gözlemlendi. Sıvı ve katı besiyerlerinin ortak özelliği olarak safha 5 aşamasında tohum bulunmadı. Toplam çimlenme yüzdeleri göz önüne alındığında denenen sıvı besiyerleri içinde en fazla çimlenmenin görüldüğü besiyeri yarı güçlü VW ve KN olarak belirlendi ve bu besiyerlerinin neden olduğu çimlenme verileri arasında istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmadı (Tablo 3.4.). Faz 1'de denenen besiyerlerinden alınan sonuçlar karşılaştırıldığında en yüksek çimlenme oranını veren katı KN besiyeriyle (% 58,77 ± 5,51) faz 2 denemelerine devam etmenin bu oranının daha da artırılması ve bitki büyütme denemeleri için materyal üretimi açısından avantajlı olacağı bulundu (Şekil 3.4.).

Tablo 3.4. Farklı sıvı besiyerlerinin *S. vomeracea* tohumlarının çimlenmesine olan etkileri

Besiyeri	Tohum çimlenme safhaları (%)						
	Safha 0	Safha 1	Safha 2	Safha 3	Safha 4	Safha 5	Çimlenme
KN	11,85 ± 1,36 ^a	34,35 ± 3,55 ^d	44,61 ± 1,50 ^b	8,46 ± 0,88 ^a	0,72 ± 0,14 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	53,80 ± 0,88 ^a
½KN	9,43 ± 1,80 ^{ab}	41,38 ± 3,14 ^c	46,75 ± 1,31 ^b	2,44 ± 0,92 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	49,19 ± 1,96 ^b
VW	6,29 ± 1,37 ^d	41,91 ± 0,10 ^c	51,62 ± 1,12 ^a	0,17 ± 0,03 ^d	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	51,79 ± 1,10 ^{ab}
½VW	7,94 ± 1,52 ^{bc}	36,91 ± 3,42 ^d	52,41 ± 2,34 ^a	2,74 ± 0,25 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	55,15 ± 2,57 ^a
MS	6,15 ± 0,76 ^d	53,34 ± 1,86 ^a	39,25 ± 2,14 ^c	1,26 ± 0,31 ^c	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	40,50 ± 2,28 ^c
½MS	10,38 ± 1,36 ^{ab}	41,58 ± 1,83 ^c	47,20 ± 2,70 ^b	0,84 ± 0,12 ^{cd}	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	48,05 ± 2,69 ^b
LN	10,98 ± 2,07 ^{ab}	48,19 ± 1,91 ^b	40,24 ± 1,88 ^c	0,60 ± 0,06 ^{cd}	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	40,84 ± 1,86 ^c
½LN	10,55 ± 2,26 ^{ab}	50,60 ± 2,57 ^{ab}	38,66 ± 2,77 ^c	0,19 ± 0,00 ^d	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^a	38,85 ± 2,80 ^c

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur



Şekil 3.4. Katı ve sıvı besiyerlerinden alınan çimlenme verilerinin karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

3.5. Faz 2 Besiyerlerinde Çimlendirme Denemelerine Ait Bulgular

3.5.1. Muz homojenatı denemelerine ait bulgular

Muz homojenatı (BAN) sükröz (SUC) takviyeli KC besiyeri üzerine eklendi ve kültür periyodu sonucunda tohumların çimlenme safhalarına göre yüzde olarak oransal dağılımı hesaplandı (Tablo 3.5.). BAN konsantrasyonu arttıkça çimlenme belirtisi göstermeyen safha 0 tohumlarının oranında artış gerçekleşti. Ön çimlenme safhasındaki tohum yüzdelerinin ise istatistiki olarak farklı bulunmaması BAN uygulamasının safha 1 tohumların oranı üzerine etkili olmadığını gösterdi. Çimlenmenin görüldüğü safha 2 tohumlar, artan konsantrasyondaki BAN uygulamalarından olumsuz etkilendi. Sonraki safhada gözlemlenen protokorm oluşumu ise en yüksek SG-2 besiyerinden kaydedildi. Kontrol oranla tüm BAN uygulamalarının protokorm oluşumunu çok düşük oranda dahi olsa destekledikleri bulundu. Çimlenen tohumlardan rizoitli safhadakiler ise sadece SG-1 ve SG-2 besiyerlerinde görülmekle birlikte bu safhadaki tohumların oranı oldukça düşük kaldı. Yaprak primordiyasının oluşan çimlenen herhangi bir tohum gözlenmedi. Bununla birlikte kontrole oranla BAN uygulamaları toplam çimlenme yüzdesi üzerine olumsuz etki yaptığı bulundu. Kontrol ile % 5 BAN katkılı SG-3 besiyeri arasında toplam çimlenme yüzdeleri arasında % 12 fark bulundu.

Tablo 3.5. Farklı muz homojenatı miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri			
	Kontrol	SG-1	SG-2	SG-3
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^b	17,68 ± 1,04 ^{ab}	19,47 ± 1,50 ^{ab}	22,83 ± 4,88 ^a
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^a	28,42 ± 2,29 ^a	32,60 ± 2,52 ^a	32,08 ± 4,03 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	48,91 ± 2,16 ^b	44,06 ± 2,49 ^{bc}	41,50 ± 2,40 ^c
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^d	2,82 ± 0,18 ^b	3,86 ± 0,30 ^a	2,26 ± 0,33 ^c
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^c	2,17 ± 0,14 ^a	0,00 ± 0,00 ^c	1,32 ± 0,18 ^b
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^a	53,91 ± 2,46 ^{ab}	48,41 ± 2,69 ^{bc}	46,08 ± 0,60 ^c

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiksel fark yoktur

3.5.2. Sükröz denemelerine ait bulgular

KC besiyerinin orijinal formülasyonunda bulunan % 2 sükröz (SUC) yerine % 1, 3 ve 5 SUC denenerek elde edilen çimlenme verilerine göre farklı SUC konsantrasyonları çimlenmemiş tohum oranında istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe neden oldu (Tablo 3.6.). Buna rağmen safha 0 tohumların oranı kontrole oranla azaldı. Bunun aksine safha 1 tohumların oranlarında denenen tüm besiyerlerinde kontrole oranla artış gözlemlendi. Safha 2 tohumların oranı sadece SG-5 besiyerinde kontrole yaklaşırken diğer besiyerlerinde kontrolden önemli ölçüde düşük bulundu. Kontrolde çimlenme periyodunda protokorm oluşumu görülmezken diğer besiyerlerinde % 12-15 arasında değişen oranlarda safha 3 tohumları gözlemlendi. Rizoidlere sahip olan çimlenmiş tohumlar kontrol hariç tüm besiyerlerinde çok düşük oranlarda gözlemlenirken safha 5 aşamasında herhangi bir tohum gözlemlenmedi. Toplam çimlenme oranları kıyaslandığında % 2 ve % 3 SUC içeren besiyerleri kontrol ve SG-5 hem istatistiksel hem de sayısal olarak benzer sonuçlar verdi. Denenen %1 SUC konsantrasyonuna sahip SG-4 besiyeri toplam çimlenme oranını olumsuz etkilemekle birlikte kontrolden sadece % 2 oranında düşük bir sonuç verdi. Bununla birlikte % 5 SUC içeren SG-6 besiyeri toplam çimlenme oranı açısından en düşük sonucu olarak bulundu.

Tablo 3.6. Farklı sükröz miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri			
	Kontrol	SG-4	SG-5	SG-6
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^a	13,13 ± 3,30 ^a	12,82 ± 1,89 ^a	13,57 ± 1,24 ^a
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^b	31,13 ± 1,97 ^{ab}	28,21 ± 3,13 ^b	37,15 ± 5,14 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	39,15 ± 1,63 ^b	43,51 ± 3,14 ^b	31,68 ± 3,62 ^c
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^b	12,85 ± 1,21 ^a	12,10 ± 1,24 ^a	15,18 ± 3,33 ^a
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^c	3,75 ± 0,39 ^a	0,35 ± 0,75 ^b	2,41 ± 0,38 ^a
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^a	56,53 ± 0,23 ^{ab}	58,97 ± 3,43 ^a	49,28 ± 5,66 ^b

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiksel fark yoktur

3.5.3. Hindistan cevizi suyu denemelerine ait bulgular

Bu aşamada farklı hindistan cevizi suyu (COW) konsantrasyonları içeren besiyerlerinin etkileri denenmiş ve artan konsantrasyonlarda kullanılan COW'un çimlenmemiş tohum miktarını önemli ölçüde artırdığı bulundu (Tablo 3.7.). SG-7 ve SG-8 besiyerlerinden elde edilen safha 0 tohum yüzdeleri istatistiksel olarak aynıdır. Bu aşamada dikkate değer bulgu, % 10 COW içeren SG-9 besiyerinin çimlenmeye yaptığı olumsuz etkidir. Ön çimlenme aşamasındaki tohumların yüzdeleri de safha 0 tohumlarına benzer bir oran gösterdi. Safha 2 tohumların oranları kontrole oranla % 62 düşük bulundu. Protokorm safhasına ulaşan tohumların oranı SG-7 besiyerinde en yüksek artışı göstermiş yani düşük konsantrasyonda (% 2,5) COW uygulaması çimlenme oranını düşürse de çimlenen tohumların gelişimini hızlandırdı. Benzer bir gelişim safha 4 tohumların oranında da gözlemlendi. Rizoitli safhaya ulaşan çimlenmiş tohum oranı SG-7 besiyerinde en yüksek değerde bulundu. Önceki uygulamalarda olduğu gibi safha 5 aşamasına ulaşmış çimlenen tohum bulunmadı. En yüksek toplam çimlenmiş tohum oranı kontrolde bulunmuş ve COW uygulamalarının tamamının çimlenmeye olumsuz etki yaptıkları anlaşıldı. COW uygulaması neticesinde toplam çimlenme kontrole oranla SG-9 besiyerinde % 45'e düştü. Bununla birlikte besiyerindeki COW oranı arttıkça çimlenme oranları da kademeli olarak azaldı.

Tablo 3.7. Farklı hindistan cevizi suyu miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri			
	Kontrol	SG-7	SG-8	SG-9
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^c	20,19 ± 2,15 ^b	21,68 ± 2,72 ^b	34,08 ± 1,88 ^a
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^b	28,74 ± 0,44 ^{ab}	29,84 ± 2,75 ^{ab}	34,04 ± 0,45 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	28,78 ± 3,99 ^{bc}	33,92 ± 4,26 ^b	22,39 ± 1,05 ^c
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^d	16,26 ± 1,42 ^a	12,24 ± 0,90 ^b	4,38 ± 0,73 ^c
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^d	6,03 ± 0,57 ^a	2,31 ± 0,26 ^c	5,10 ± 0,73 ^b
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^a	51,07 ± 2,59 ^{ab}	48,48 ± 5,05 ^b	31,87 ± 2,11 ^c

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiksel fark yoktur

3.5.4. Aktif kömür denemelerine ait bulgular

Aktif kömürün (ACH) kullanılan tüm konsantrasyonları çimlenmemiş tohum oranını azalttı. Bu azalma en şiddetli olarak ACH'in % 0,25 oranda kullanıldığı SG-10 besiyerinde gözlemlendi (Tablo 3.8.). Ancak artan konsantrasyonlarda ACH kontrole yakın bir safha 0 tohum oranı verdi. Safha 1 tohumlar en az SG-12 besiyerinde gözlenirken çimlenen, safha 2 aşamasındaki tohumların oranı kontrole oranla neredeyse yarıya düştü. Ayrıca denenen besiyerleri arasında safha 2 tohum oranları açısından istatistiksel bir fark yoktur. Bu parametrenin aksine protokorm safhasına ulaşan tohumların oranı son derece artış gösterdi ve SG-10 besiyerinde % 20 seviyesine ulaşıldı. Buna benzer olarak rizoitli safhadaki çimlenen tohumlar son derece hızlı bir gelişim gösterip oransal olarak toplam tohumların % 35'ine kadar yükseldi. Safha 4 tohumlar için kaydedilen bu değer tüm besiyerleri arasında ulaşılan en yüksek değerdir. Ayrıca yaprak primordiyasının gözlemlendiği çimlenmiş tohum ilk defa SG-10 besiyerinde bulundu. Bu oran son derece küçük olsa dahi tohumların hızlı gelişimini göstermesi açısından oldukça önemlidir. Toplam çimlenen tohum oranı açısından en yüksek değere SG-10 besiyerinde ulaşıldığında çimlenme oranı kontrolün % 39'u oranında arttığı bulundu. Tohumların ileriki safhalara geçişlerinin hızlanması ACH içeren besiyerlerindeki çimlenme başarısını da beraberinde getirdiği anlaşıldı.

Tablo 3.8. Farklı aktif kömür miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri			
	Kontrol	SG-10	SG-11	SG-12
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^a	5,76 ± 0,74 ^b	10,55 ± 2,77 ^{ab}	13,40 ± 3,94 ^a
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^a	16,93 ± 1,59 ^b	20,89 ± 2,18 ^{ab}	14,49 ± 2,82 ^b
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	24,99 ± 4,92 ^b	16,60 ± 5,75 ^b	18,14 ± 3,96 ^b
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^c	20,17 ± 1,58 ^a	16,09 ± 1,96 ^b	18,30 ± 3,19 ^{ab}
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^b	31,30 ± 4,76 ^a	35,86 ± 4,74 ^a	35,67 ± 2,78 ^a
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^b	0,84 ± 0,14 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^c	77,31 ± 2,97 ^a	68,56 ± 1,77 ^b	72,11 ± 4,89 ^{ab}

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiksel fark yoktur

3.5.5. Sükroza yerine muz homojenatı kullanımına ait bulgular

Bu denemede sükroza alternatif doğal karbon kaynağı olarak BAN kullanıldı. Çimlenmeyen tohum oranı BAN ilaveli besiyerlerinde kontrole oranla arttığı bulundu. En yüksek safha 0 tohum oranı % 3 BAN içeren SG-14 besiyerinden kaydedildi (Tablo 3.9.). Besiyerinde artan BAN içeriği ön çimlenme aşamasındaki tohum oranını artırdı. Bu oran SG-15 besiyerinde neredeyse ekilen tohumların yarısına ulaştı. Bu parametre için kontrol, SG-13 ve SG-14 besiyerlerinden alınan sonuçlar istatistiksel olarak birbirinden farklı değildir. Çimlenen safha 2 aşamasındaki tohumların oranı kontrolün % 73 oranında azalarak SG-13 besiyerinde en düşük değerine ulaştığı bulundu. Buna karşın çimlenip protokorm safhasına ulaşan tohumların oranı kontrole oranla % 23 artışla SG-13 besiyerinde en yüksek değerine ulaştı. Bu oran % 5 BAN içeren SG-15 besiyerinde tekrar düşmeye başladı. Safha 4 tohumların oranı protokorm safhasına ulaşan tohumlarınkine benzer bir durumda bulundu. Bu parametre için en yüksek değer en düşük oranda BAN içeren (% 1) SG-13 besiyerinden kaydedildi. Bu uygulamada safha 5 aşamasına ulaşan tohum bulunmadı. Toplam çimlenme oranı açısından kontrole oranla tüm besiyerlerinde düşük sonuçlar kaydedildi. SG-13 besiyerinden kontrolden % 4 düşük bir çimlenme oranı alınsa dahi bu oran istatistiksel olarak kontrolden farklı bulunmadı.

Tablo 3.9. Sükroz yerine muz homojenatı kullanımının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri			
	Kontrol	SG-13	SG-14	SG-15
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^b	18,65 ± 2,23 ^b	30,13 ± 2,56 ^a	25,13 ± 3,28 ^a
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^b	26,75 ± 3,34 ^b	25,57 ± 1,94 ^b	47,87 ± 2,97 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	16,10 ± 2,28 ^b	16,53 ± 0,78 ^b	19,73 ± 2,15 ^b
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^c	23,32 ± 3,28 ^a	23,16 ± 3,44 ^a	7,26 ± 0,31 ^b
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^c	15,17 ± 1,34 ^a	4,60 ± 0,52 ^b	0,00 ± 0,00 ^c
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^a	54,60 ± 1,11 ^a	44,30 ± 3,40 ^b	26,99 ± 3,07 ^c

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.5.6. Sükroz yerine hindistan cevizi suyu kullanımına ait bulgular

Bu denemede sükroz yerine kullanılabilen alternatif bir doğal karbon kaynağı olarak COW kullanıldı. Çimlenmeyen tohumların oranı COW ilaveli besiyerlerinde dalgalanma gösterdi. Besiyerinde en düşük oranda kullanılan (% 2,5) COW, çimlenmeyen tohumların oranını kontrolün 2 katına çıkardığı bulundu (Tablo 3.10.). Artan konsantrasyonlarda COW içeren diğer besiyerleri kademeli olarak safha 0 tohumların oranını azalttığı gözlemlendi. Ön çimlenme safhasındaki tohumlar SG-16 besiyerinde azalma gösterse de SG-17 ve SG-18 besiyerlerinden istatistiki olarak kontrolle aynı sonuçlar elde edildi. Çimlenme aşamasındaki tohumlar besiyerindeki COW miktarı arttıkça artış gösterdi. En yüksek safha 2 tohum oranı kontrolden sonra SG-18 besiyerinden elde edildi. Protokorm safhasına ulaşan tohumlar tüm COW uygulamalarında kontrole oranla önemli ölçüde arttı. En yüksek safha 3 tohum oranı SG-17 besiyerinden kaydedildi. Rizoitli safhaya ulaşan çimlenen tohumlar sadece SG-16 ve SG-18 besiyerlerinde gözlemlense de bu oranlar çok düşüktür. Safha 5 aşamasına ulaşan tohum olmadı. Toplam çimlenme oranları denenen besiyerinde COW konsantrasyonu arttıkça artış gösterdi. En yüksek çimlenme oranı SG-18 besiyerinden kaydedilse de bu oran istatistiki olarak kontrolden farklı değildir.

Tablo 3.10. Süzkroz yerine hindistan cevizi suyu kullanımının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri			
	Kontrol	SG-16	SG-17	SG-18
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^{bc}	30,71 ± 3,50 ^a	16,98 ± 3,28 ^b	9,80 ± 0,99 ^c
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^a	19,60 ± 0,54 ^b	29,10 ± 3,05 ^a	29,14 ± 1,49 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	32,59 ± 0,68 ^c	34,02 ± 0,79 ^c	42,76 ± 3,04 ^b
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^b	16,43 ± 2,53 ^a	19,90 ± 3,91 ^a	18,00 ± 2,33 ^a
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^c	0,67 ± 0,06 ^a	0,00 ± 0,00 ^c	0,29 ± 0,06 ^b
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^a	49,02 ± 2,72 ^b	54,31 ± 4,58 ^{ab}	61,06 ± 2,73 ^a

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.5.7. 6-benzilaminopürin denemelerine ait bulgular

Sentetik bir sitokin olan BAP uygulaması sonucunda tohumların çimlenme safhalarında önemli değişiklikler meydana geldi. BAP uygulamaları SG-19 ve SG-22 besiyerlerinde kontrolden daha fazla oranda safha 0 aşamasında tohum vermesine rağmen artan BAP konsantrasyonlarına sahip SG-20 ve SG-21 besiyerlerinde bu oranlar kontrole istatistiki olarak aynı bulundu (Tablo 3.11.). Safha 1 aşamasındaki tohumların oranı genel olarak tüm uygulamalarda birbirine çok yakın bulundu. Safha 2 aşamasındaki tohumlar kontrole oranla önemli ölçüde azaldı. Bu azalma besiyerindeki artan BAP konsantrasyonuyla paraleldir. Bu parametre için SG-19, SG-20 ve SG-21 besiyerlerinden alınan sonuçlar istatistiki olarak aynıdır. Safha 3 aşamasındaki tohumlar en yüksek 2,0 mg l⁻¹ BAP içeren SG-22 besiyerinden kaydedildi. Rizoitli safhadaki tohumlar kontrol hariç tüm besiyerlerinde gözlemlendi. Bu tohumların oranı SG-19 ve SG-20 besiyerlerinde kademeli olarak artmış ve en yüksek oranda SG-20 besiyerinden kaydedildi. Safha 5 aşamasına ulaşan tohum bulunmadı. Toplam çimlenme oranı sadece SG-20 besiyerinde artıp, sonraki besiyerlerinde ise yine kademeli olarak azaldı. Dolayısıyla toplam çimlenme oranı açısından en olumlu etkiyi yapan BAP uygulaması 0,5 mg·l⁻¹ (SG-20) olarak bulundu.

Tablo 3.11. Farklı 6-benzilaminopürin miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri				
	Kontrol	SG-19	SG-20	SG-21	SG-22
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^c	20,30 ± 2,12 ^b	14,33 ± 0,86 ^c	15,95 ± 1,76 ^c	23,89 ± 1,02 ^a
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^{ab}	25,50 ± 1,18 ^b	25,53 ± 0,96 ^b	30,97 ± 0,83 ^a	26,30 ± 2,05 ^{ab}
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	42,61 ± 2,56 ^b	38,83 ± 0,86 ^b	39,54 ± 1,64 ^b	28,22 ± 1,11 ^c
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^c	7,36 ± 0,59 ^d	14,09 ± 2,11 ^b	11,28 ± 0,80 ^c	19,42 ± 1,91 ^a
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^d	4,25 ± 0,34 ^b	7,22 ± 0,98 ^a	2,26 ± 0,48 ^c	2,17 ± 0,30 ^c
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^{ab}	54,21 ± 3,23 ^{abc}	60,13 ± 1,82 ^a	53,08 ± 2,48 ^{bc}	49,82 ± 1,34 ^d

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre p < 0,05 seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.5.8. Kinetin denemelerine ait bulgular

KIN denemelerinden elde edilen verilere göre çimlenmenin görülmeyen safha 0 tohumlar kontrole oranla en düşük değerine $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KIN içeren SG-24 besiyerinde ulaşıldı. Buna rağmen en yüksek safha 0 oranının görüldüğü SG-25 besiyeri haricindeki tüm besiyerlerinden alınan sonuçlar bu parametre için istatistiksel olarak aynıdır. Safha 1 tohumlar en düşük değerine SG-25 besiyerinde ulaşırken en yüksek değeri ise SG-26 besiyerinden hesaplandı (Tablo 3.12.). Çimlenen tohumların oluşturduğu safha 2 aşamasına ulaşan tohumlar KIN uygulamaları arasında en yüksek oranda SG-26 besiyerinde bulundu. Buna rağmen kontrole oranla safha 2 tohumların oranı diğer tüm besiyerlerinde azaldığı gözlemlendi. Bu parametrenin aksine protokorm safhasına ulaşan tohumların oranı kontrole oranla tüm KIN uygulanan besiyerlerinde yüksek bulundu. En fazla safha 3 tohum bulunan besiyeri $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KIN içeren SG-25 olarak belirlendi. Rizoitli tohumlardan oluşan safha 4 aşamasına ulaşan çimlenen tohumların oranları kontrolden sonra artan KIN varlığında kademeli olarak $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ konsantrasyona kadar artıp ve $2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KIN içeren SG-26 besiyerinde ise azalmaya başladı. Buna rağmen KIN uygulaması tüm konsantrasyonlarda kontrolde görülmeyen safha 3 ve 4 tohumların oranlarını artırdı. Safha 5 aşamasına ulaşan tohum bulunmadı. Toplam çimlenme oranları irdelendiğinde SG-25 besiyerinde en yüksek çimlenme oranına ulaşıldığı fakat bunun kontrolden sadece % 3 fazla olduğu görüldü. SG-24 ve SG-25 besiyerlerinin sağladıkları toplam çimlenme oranları istatistiksel olarak aynı bulundu. Ayrıca bu parametre için kontrol ve SG-23 besiyerinden elde edilen sonuçlar da istatistiksel olarak aynıdır.

Tablo 3.12. Farklı kinetin miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri				
	Kontrol	SG-23	SG-24	SG-25	SG-26
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^b	14,96 ± 0,95 ^b	13,37 ± 1,83 ^b	19,74 ± 1,47 ^a	15,01 ± 0,95 ^b
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^b	28,92 ± 1,25 ^{ab}	26,54 ± 2,70 ^{ab}	18,98 ± 1,48 ^c	32,07 ± 2,04 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	36,53 ± 0,48 ^{bc}	33,49 ± 2,63 ^{cd}	27,99 ± 2,71 ^d	39,84 ± 1,85 ^b
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^d	13,77 ± 1,01 ^b	19,57 ± 1,05 ^a	20,70 ± 1,90 ^a	9,37 ± 0,64 ^c
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^d	3,83 ± 0,83 ^c	7,03 ± 0,74 ^b	12,59 ± 1,38 ^a	3,71 ± 0,67 ^b
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^{ab}	56,12 ± 3,89 ^{ab}	60,10 ± 1,73 ^a	61,28 ± 1,03 ^a	52,92 ± 2,43 ^b

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.5.9. İndol-3-asetik asit denemelerine ait bulgular

IAA'nın farklı konsantrasyonlarda besiyerlerinde kullanılmasıyla tohum çimlenmesi üzerine yaptığı etkinin aydınlatılmaya çalışıldığı bu denemede safha 0 tohumların oranları 0,25-1,0 mg·l⁻¹ aralığında IAA içeren SG-27, SG-28 ve SG-29 besiyerlerinde kontrole kıyasla azaldı (Tablo 3.13.). En yüksek çimlenmeyen tohum oranı SG-30 besiyerinden bulundu. Ön çimlenmenin olduğu safha 1 tohumlar arasında IAA uygulamalarına bağlı önemli küçük oranlarda değişimler olduğu kaydedildi. Bununla birlikte çimlenme safhasındaki (safha 2) tohumların oranı yükselen IAA konsantrasyonu ile birlikte kademeli olarak azaldığı görüldü. Protokorm haline dönüşmüş çimlenen tohumların oranı IAA'dan büyük oranda etkilendi. SG-29 besiyerine kadar sürekli artan bu safhadaki tohumların oranı 2,0 mg·l⁻¹ IAA içeren SG-30 besiyerinde azalmaya başladı. En yüksek protokorm safhasına ulaşmış tohum yüzdesi SG-29 besiyerinden kaydedildi. Rizoitli safhaya ulaşan tohumların oranı protokorm safhasına ulaşan tohumların oranlarına paralel bir sonuç gösterdi. Safha 5 aşamasına ulaşan tohum gözlenmedi. Toplam çimlenme oranı en yüksek SG-29 besiyerinde bulunurken SG-27 ve SG-30 besiyerlerinden kaydedilen sonuçlar istatistiki olarak kontrolden farksız olarak bulundu.

Tablo 3.13. Farklı indol-3-asetik asit miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri				
	Kontrol	SG-27	SG-28	SG-29	SG-30
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^b	11,23 ± 1,43 ^c	11,61 ± 0,79 ^c	10,81 ± 0,40 ^c	18,96 ± 1,39 ^a
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^{ab}	28,84 ± 1,81 ^a	26,19 ± 1,57 ^{ab}	22,76 ± 2,09 ^b	23,98 ± 2,55 ^{ab}
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	42,03 ± 1,97 ^b	37,64 ± 2,46 ^{bc}	36,01 ± 2,34 ^c	32,30 ± 1,68 ^c
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^d	14,43 ± 1,40 ^c	21,18 ± 1,36 ^b	25,81 ± 1,03 ^a	22,57 ± 0,45 ^b
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^c	3,47 ± 0,33 ^b	3,37 ± 0,54 ^b	4,61 ± 0,86 ^a	2,52 ± 0,52 ^b
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^b	59,92 ± 1,68 ^b	62,19 ± 2,73 ^{ab}	66,43 ± 2,62 ^a	57,39 ± 2,82 ^b

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.5.10. İndol-3-bütirik asit denemelerine ait bulgular

Farklı konsantrasyonlarda IBA içeren besiyerlerinin tohumların çimlenmesine yaptıkları etkiler incelendiğinde safha 0 tohum oranının SG-31 besiyeri haricindeki IBA uygulamaları neticesinde arttığı gözlemlendi (Tablo 3.14.). Buna karşın SG-31 ve SG-32 besiyerlerinden alınan safha 0 tohum sonuçları istatistiksel olarak kontrolle aynıdır. Ön çimlenme safhasındaki tohumların oranları SG-31 besiyerinde kontrole oranla artsa da takip eden besiyerlerinde dalgalanma gösterdi. Çimlenen tohumların oluşturduğu safha aşamasındaki tohumların oranı en yüksek kontrol grubunda bulunurken IBA uygulamalarının bu safhadaki tohumlara olumsuz etki yaptığı gözlemlendi. Protokorm safhasına ulaşan tohumlar $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IBA içeren SG-33 besiyerinde en yüksek oranına ulaştı. Bu anlamda IBA uygulamaları tohumların safhalar arasında geçişini yani gelişimini hızlandırdı. Safha 4 tohumlar tüm IBA uygulamaları neticesinde görülmüş olsalar dahi oranları düşük seviyede kaldı. SG-33 besiyeri bu safha için de en olumlu etkiyi yaptı. Safha 5 aşamasına ulaşan tohum bulunmamaktadır. Toplam çimlenme oranları açısından tüm SG-32 besiyeri kontrolle istatistiksel açıdan aynı sonucu verse dahi diğer besiyerleri kontrole oranla toplam çimlenmeyi azalttığı bulundu. IBA uygulanan tohumlarda safha 1 aşamasındaki yoğunluk dikkat çekmektedir. Bu safhayı geçen tohumlar ise hızlı gelişmektedirler.

Tablo 3.14. Farklı indol-3-bütirik asit miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri				
	Kontrol	SG-31	SG-32	SG-33	SG-34
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^b	14,88 ± 1,25 ^b	16,40 ± 0,64 ^b	22,18 ± 1,54 ^a	22,01 ± 1,78 ^a
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^b	34,48 ± 2,64 ^a	24,88 ± 1,16 ^b	25,23 ± 1,72 ^b	33,72 ± 0,06 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	41,03 ± 1,44 ^b	41,09 ± 1,75 ^b	29,75 ± 2,81 ^c	36,16 ± 2,35 ^b
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^d	7,76 ± 0,60 ^c	14,71 ± 1,07 ^b	19,59 ± 1,69 ^a	6,19 ± 0,54 ^c
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^c	1,71 ± 0,43 ^b	2,92 ± 0,44 ^a	3,26 ± 0,71 ^a	1,92 ± 0,27 ^b
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^a	50,64 ± 0,74 ^b	58,72 ± 1,11 ^a	52,60 ± 3,06 ^b	44,27 ± 1,83 ^c

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre p < 0,05 seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.5.11. Jasmonik asit denemelerine ait bulgular

Jasmonik asitin tohum çimlenmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bu denemede safha 0 tohumlar tüm JAS denemelerinde kontrolden daha yüksek bulundu (Tablo 3.15.). Çimlenmemiş tohum oranı en yüksek SG-38 ve SG-38 besiyerlerinden elde edildi. Safha 1 aşamasındaki tohumların oranları besiyerlerine göre dalgalanma gösterse de SG-36 ve SG-38 besiyerlerinde arttığı görüldü. Safha 2 tohumlar JAS ilaveli besiyerlerinin tümünde azalan oranlarda bulundu. Buna karşın bütün JAS uygulamaları istatistiksel olarak birbirlerinden farksız sonuçlar verdi. Protokorm ve rizoitli safhalarda bulunan tohumların oranı IBA uygulamalarına benzer şekilde oluştu. Protokorm safhası ve rizoitli safhada bulunan tohumların oranı en fazla $0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ JAS içeren SG-35 besiyerinden kaydedildi. Safha 5 aşamasına ulaşan tohum bulunmamaktadır. Toplam çimlenme oranı JAS uygulamalarından olumsuz etkilendi. Besiyerindeki JAS miktarı arttıkça toplam çimlenen tohum yüzdesinde düşüş kaydedildi. Ön çimlenme aşamasındaki tohumların fazlalığı bu uygulamada da dikkat çekmektedir.

Tablo 3.15. Farklı jasmonik asit miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri				
	Kontrol	SG-35	SG-36	SG-37	SG-38
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^c	21,49 ± 1,22 ^b	23,67 ± 3,21 ^{ab}	27,14 ± 3,28 ^a	26,87 ± 3,15 ^a
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^{ab}	22,72 ± 1,11 ^b	31,33 ± 2,08 ^a	24,05 ± 2,44 ^b	31,37 ± 3,02 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	31,50 ± 3,21 ^b	26,33 ± 3,21 ^b	31,48 ± 3,36 ^b	28,23 ± 0,98 ^b
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^d	19,97 ± 0,87 ^b	31,67 ± 2,08 ^a	16,63 ± 2,98 ^b	12,70 ± 2,39 ^c
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^c	4,33 ± 0,24 ^b	1,33 ± 0,23 ^a	0,69 ± 0,08 ^a	0,83 ± 0,16 ^b
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^a	55,80 ± 1,36 ^{ab}	51,95 ± 1,73 ^{bc}	48,80 ± 3,29 ^c	41,77 ± 2,98 ^d

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.5.12. Oligomerik kitosan denemelerine ait bulgular

Besiyerinde oligomerik kitosan (DP 2-15; CHI 1 kDa) kullanımının tohum çimlenmesi üzerine yaptığı etkilerin incelendiği bu denemede çimlenmemiş tohumların oranı tüm CHI konsantrasyonlarında azaldığı bulundu (Tablo 3.16.). Ön çimlenme aşamasındaki tohumların oranı ise artan CHI konsantrasyonu ile birlikte artarken sadece $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ CHI içeren SG-42 besiyerinde kontrolden yüksek olarak kaydedildi. Buna rağmen SG-42 ile kontrol grubunun safha 1 tohum oranları açısından istatistiksel olarak birbirinden farkı yoktur. Safha 2 aşamasına ulaşan tohumların oranları artan CHI oranlarına sahip besiyerlerinde kademeli olarak azaldı. Buna karşın protokorm ve rizoitli safhaya geçen tohumların oranlarında büyük bir artış yaşandı. Protokorm safhasındaki tohumların en yüksek oranda kaydedildikleri besiyeri SG-42 olurken rizoitli safhada bu durum SG-39 besiyerinde görüldü. Safha 5 aşamasına ulaşan tohum bulunmamaktadır. Toplam çimlenme oranlarında oligomerik CHI uygulaması neticesinde kontrole oranla önemli artış gözlemlendi. En yüksek toplam çimlenmiş tohum oranı en düşük konsantrasyonda ($5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) CHI içeren besiyerinden (SG-39) kaydedildi. Bu çimlendirme özellikleriyle oligomerik CHI uygulaması ACH uygulamasına benzeri bir etki gösterdi.

Tablo 3.16. Farklı oligomerik kitosan (1 kDa) miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri				
	Kontrol	SG-39	SG-40	SG-41	SG-42
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^a	10,89 ± 0,28 ^b	10,70 ± 0,78 ^b	12,10 ± 1,60 ^b	12,10 ± 1,03 ^b
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^a	20,29 ± 1,35 ^b	24,28 ± 1,09 ^{ab}	23,55 ± 2,23 ^{ab}	28,01 ± 2,55 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	37,12 ± 3,47 ^b	36,04 ± 1,74 ^b	31,83 ± 5,75 ^{bc}	24,75 ± 2,92 ^c
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^c	21,33 ± 2,33 ^b	19,82 ± 1,45 ^b	22,28 ± 2,71 ^b	27,18 ± 1,80 ^a
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^d	10,31 ± 0,77 ^a	9,16 ± 0,67 ^b	10,23 ± 0,67 ^{ab}	7,97 ± 0,53 ^c
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^b	68,76 ± 1,45 ^a	64,31 ± 2,65 ^{ab}	61,32 ± 1,90 ^b	59,89 ± 1,17 ^b

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.5.13. Polimerik kitosan denemelerine ait bulgular

Polimerik kitosan denemeleri DP 70 olan (CHI 10 kDa) ve daha yüksek polimerizasyon derecesindeki (\approx DP 220; CHI 100 kDa) iki polimerik kitosandan oluşmaktadır. On kDa moleküler ağırlıktaki polimerik kitosan safha 0 tohumların oranlarını kontrole oranla oldukça azaltırken bu uygulama için en düşük çimlenmemiş tohum oranı SG-45 besiyerinden kaydedildi. En düşük safha 1 tohum oranı ise en az polimerik CHI içeren ($5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) SG-43 besiyerinde bulundu. Çimlenen tohumlardan safha 2 aşamasında bulunanların oranları 10 kDa ağırlıktaki tüm CHI uygulamalarında azaldı. Buna karşın kontrole en yakın safha 2 tohum oranı SG-45 besiyerinde bulundu. Protokorm aşaması ve rizoitli aşamadaki tohumların oranları artış gösterirken bu artış oligomerik kitosan kullanımındakine benzemektedir. En yüksek safha 3 ve safha 4 tohum oranları SG-43 besiyerinden kaydedildi. Safha 5 aşamasına ulaşan tohum bulunmamaktadır. Toplam çimlenme oranı ise yine aynı besiyerinde kontrol değerini % 27 oranında artırdı (Tablo 3.17.).

Yüz kDa moleküler boyuttaki kitosan polimeri ise kontrole oranla safha 0 aşamasındaki tohum oranlarını düşük seviyede artırırken bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Safha 1 tohumlar için de aynı sonuçlar alınmakla birlikte 100 kDa boyutta polimerik kitosan uygulaması ön çimlenme aşamasındaki tohumlara etki etmedi. SG-43 ve SG-44 besiyerlerinde safha 2 aşamasındaki tohum oranı azalsa dahi SG-45 besiyerinde kontrol grubundaki oranına yaklaştı fakat SG-46 besiyerinde tekrar azaldı. Bu moleküler boyuttaki kitosan polimeri en belirgin etkisini safha 3 ve 4 aşamasındaki tohumlar üzerinde gösterdi. Tohumların gelişimini artıran bu uygulama safha 3 aşamasındaki tohumların oranını kayda değer biçimde artırdı. Aynı şekilde çimlenmiş rizoitli tohum oranlarının kontrole oranla en fazla SG-50 besiyerinde arttığı bulundu. Safha 5 aşamasına ulaşan tohum sadece SG-48 besiyerinden kaydedilse de bu oran oldukça düşüktür. Toplam çimlenme oranları bu uygulamada da kontrole oranla yükseldi fakat bu yükseliş % 5 seviyesinde sınırlı kaldı. Ayrıca bu uygulamaların toplam çimlenmeye olan etkileri kontrole istatistiksel olarak aynı bulundu (Tablo 3.18.). Tüm denemelerin sonuçları karşılaştırmalı olarak grafikte gösterilmektedir (Şekil 3.5.).

Tablo 3.17. Farklı polimerik kitosan (10 kDa) miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

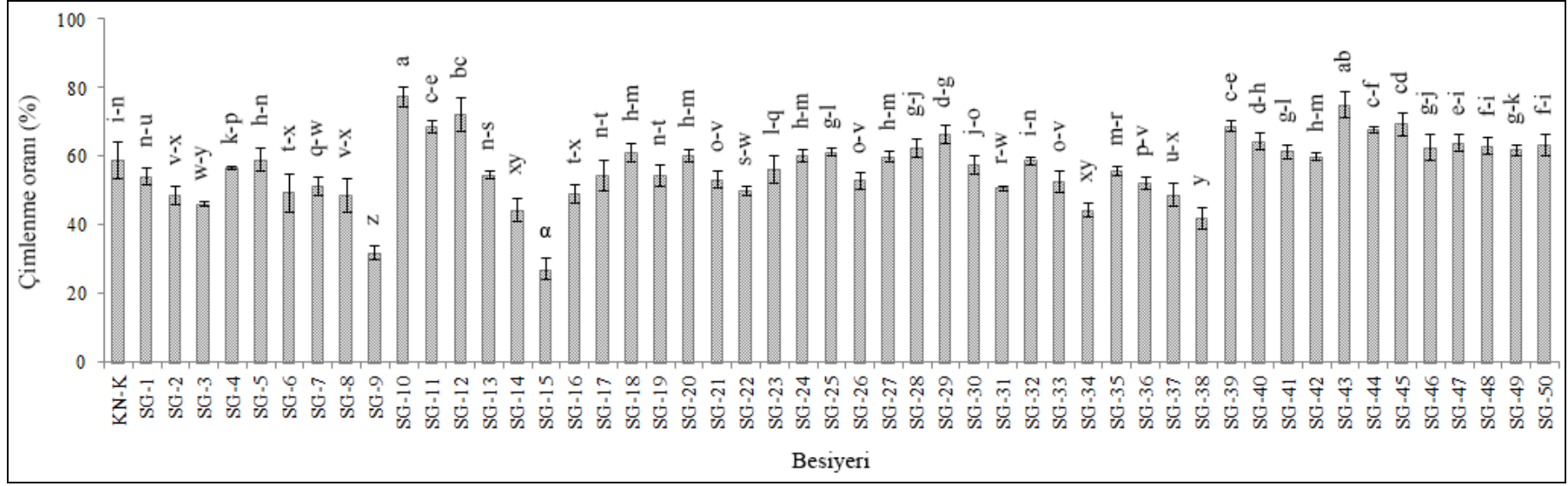
Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri				
	Kontrol	SG-43	SG-44	SG-45	SG-46
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^a	9,06 ± 0,98 ^b	12,84 ± 0,92 ^a	6,84 ± 0,51 ^b	8,57 ± 1,20 ^b
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^a	15,97 ± 1,38 ^c	19,47 ± 1,83 ^{bc}	23,82 ± 2,71 ^{ab}	28,95 ± 1,96 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	37,64 ± 2,56 ^c	39,88 ± 1,55 ^c	51,10 ± 1,21 ^b	43,02 ± 1,08 ^c
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^c	21,70 ± 2,23 ^a	19,45 ± 1,10 ^a	13,03 ± 1,08 ^b	13,47 ± 1,09 ^b
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^d	15,96 ± 1,01 ^a	8,35 ± 0,88 ^b	5,21 ± 0,82 ^c	6,00 ± 0,78 ^c
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^c	74,97 ± 3,62 ^a	67,69 ± 0,92 ^b	69,34 ± 3,27 ^{ab}	62,49 ± 3,83 ^{bc}

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

Tablo 3.18. Farklı polimerik kitosan (100 kDa) miktarlarının *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesine olan etkileri

Çimlenme safhaları (%)	Besiyeri				
	Kontrol	SG-47	SG-48	SG-49	SG-50
Safha 0	15,04 ± 2,68 ^a	13,17 ± 076 ^a	15,01 ± 0,65 ^a	16,69 ± 2,00 ^a	15,60 ± 2,58 ^a
Safha 1	26,19 ± 5,32 ^a	22,36 ± 1,83 ^a	22,79 ± 1,84 ^a	21,48 ± 2,29 ^a	21,06 ± 2,65 ^a
Safha 2	58,77 ± 5,51 ^a	33,51 ± 1,78 ^b	27,71 ± 2,33 ^c	27,65 ± 1,87 ^c	25,71 ± 2,10 ^c
Safha 3	0,00 ± 0,00 ^b	22,77 ± 2,44 ^a	21,58 ± 1,62 ^a	23,33 ± 1,27 ^a	24,49 ± 2,83 ^a
Safha 4	0,00 ± 0,00 ^b	8,19 ± 0,39 ^a	12,49 ± 0,64 ^a	10,85 ± 1,60 ^a	13,46 ± 1,63 ^a
Safha 5	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,42 ± 0,11 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
Çimlenme	58,77 ± 5,51 ^a	63,95 ± 2,33 ^a	63,04 ± 2,29 ^a	61,83 ± 1,57 ^a	63,33 ± 3,16 ^a

*Bir sütündeki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur



Şekil 3.5. Farklı besiyerlerinden alınan tohum çimlenme oranı verilerinin karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

3.6. Faz 2 Besiyerlerinde Protokorm Oluşumlarına Ait Bulgular

Tohumların besiyerlerine ekiminden 90 gün sonra yapılan ölçümlerde protokorm oluşum oranları ölçülmüş olup bu oranlar denenen besiyerlerinin tohumları protokormlara dönüştürme başarıları hakkında bilgi vermektedir. Kontrol grubunda bu oran % $7,45 \pm 0,25$ oranında kaydedildi. Sükrozun etkilerinin denendiği SG-1, SG-2 ve SG-3 besiyerlerinden alınan sonuçlar sırasıyla % $9,24 \pm 0,12$, % $7,84 \pm 0,50$ ve % $7,90 \pm 0,75$ olarak bulundu. SUC ve BAN ile takviye edilmiş SG-4, SG-5 ve SG-6 besiyerlerinde ise bu oranlar kontrole oranla oldukça yükselerek sırasıyla % $59,57 \pm 3,73$, % $64,33 \pm 1,58$ ve % $78,42 \pm 3,11$ olarak kaydedildi. En yüksek protokorm oluşum oranı %5 BAN ilaveli besiyerinde bulundu. SUC ve COW takviyeli besiyerlerinde ise SG-7, SG-8 ve SG-9 için protokorm oluşum oranı sırasıyla % $68,18 \pm 1,72$, % $59,81 \pm 1,83$ ve % $51,14 \pm 1,03$ olarak bulunurken artan konsantrasyonlarda COW kullanımı protokorm oluşumunu olumsuz etkiledi.

SG-10, SG-11 ve SG-12 besiyerlerinde ACH kullanılmış olup protokorm oranı en yüksek BAN-SUC uygulaması ile birlikte bu besiyerlerinden kaydedildi. Bu oranlar denenen besiyerleri için sırasıyla % $69,37 \pm 2,96$, % $80,91 \pm 3,08$ ve % $74,96 \pm 4,07$ olarak bulundu. BAN-SUC uygulaması da SG-13, SG-14 ve SG-15 besiyerlerinde ACH katkısına benzer oranlarda (% $80,34 \pm 7,11$, % $76,10 \pm 2,84$ ve % $62,88 \pm 2,58$) protokorm oluşumunu sağladı. SUC-COW uygulaması ise kontrole oranla protokorm oluşumunu artırsa da etkisi BAN ve ACH uygulamalarına oranla sınırlı kaldı. Bu uygulama için SG-16, SG-17 ve SG-18 besiyerlerinde protokorm oluşum oranları sırasıyla % $36,69 \pm 2,88$, % $38,50 \pm 1,32$ ve % $30,12 \pm 3,66$ olarak bulundu.

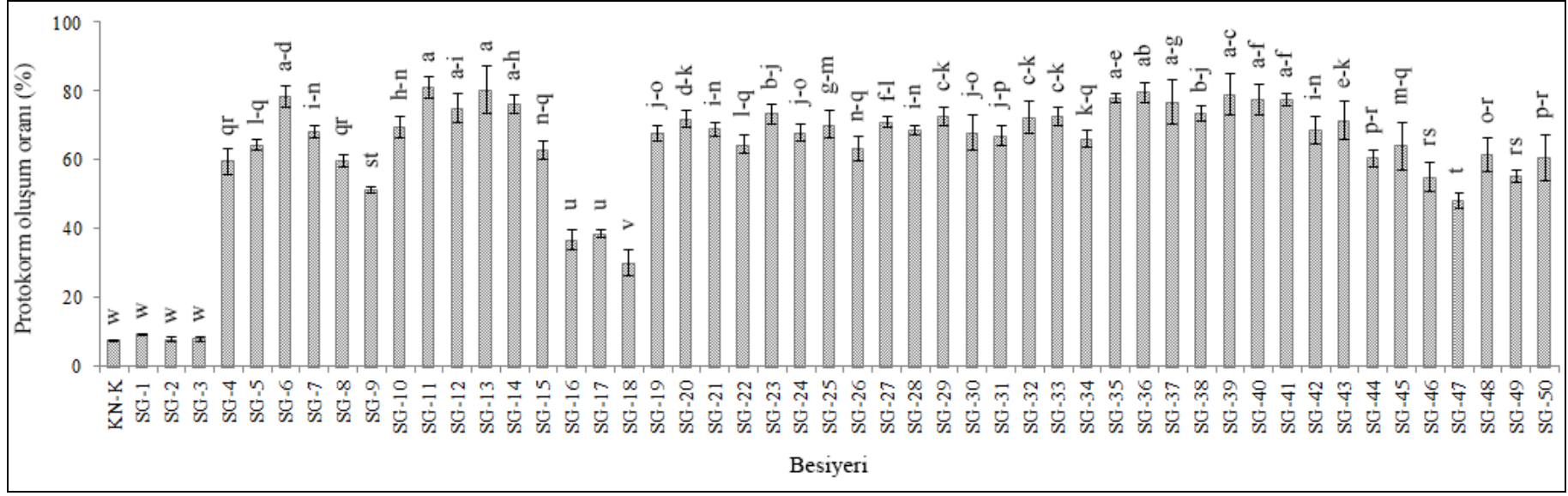
Sitokinin denemelerinde kullanılan BAP ve KIN uygulamaları birbirine benzer protokorm oluşum oranları verdi. Bu aşamada KIN uygulaması BAP'dan daha başarılı bulundu. BAP içeren SG-19, SG-20, SG-21 ve SG-22 besiyerlerinde protokorm oluşum oranları sırasıyla % $67,80 \pm 2,16$, % $71,83 \pm 2,61$, % $68,96 \pm 2,05$ ve % $64,37 \pm 2,68$ olarak kaydedildi. KIN içeren SG-23, SG-24, SG-25 ve SG-26 besiyerlerinde ise bu oranlar sırasıyla % $73,38 \pm 2,93$, % $67,77 \pm 2,49$, % $70,14 \pm 4,03$ ve % $63,15 \pm 3,72$ olarak bulundu.

Denemelerde kullanılan oksinlerden IAA ve IBA protokorm oluşumu üzerine birbirlerine oldukça benzer etkiler yaptıkları bulundu. Kontrole kıyasla tüm oksin

denemeleri protokorm oluşumunu artırdı. IAA katkılı SG-27, SG-28, SG-29 ve SG-30 besiyerlerinde protokorm oluşum oranları sırasıyla sırasıyla % $70,94 \pm 1,52$, % $68,53 \pm 1,18$, % $72,45 \pm 2,79$ ve % $67,90 \pm 5,09$ olarak bulundu. IBA ile güçlendirilen SG-31, SG-32, SG-33 ve SG-34 besiyerlerinde ise bu oranlar sırasıyla % $67,01 \pm 3,04$, % $72,26 \pm 4,76$, % $72,51 \pm 2,60$ ve % $66,05 \pm 2,33$ olarak hesaplandı.

Oksilipinlerden biri olan JAS ile desteklenmiş SG-35, SG-36, SG-37 ve SG-38 besiyerlerinde protokorm oluşum oranları kontrole oranla son derece artmış olup bu uygulama ACH, BAN-SUC ve CHI uygulamalarından sonraki en iyi oranları sağladı. Elde edilen veriler yukarıda anılan ilgili besiyerleri için sırasıyla % $77,86 \pm 1,22$, % $79,58 \pm 2,92$, % $76,66 \pm 6,54$ ve % $73,32 \pm 2,31$ olarak bulundu. Artan JAS konsantrasyonlarının protokorm oluşum oranını düşürdükleri anlaşıldı.

Oligomerik CHI kullanımı SG-39, SG-40, SG-41 ve SG-42 besiyerlerinde protokorm oluşum oranlarını JAS uygulamasına benzer şekilde artırdı. Bu oranlar sırasıyla % $79,02 \pm 6,00$, % $77,58 \pm 4,38$, % $77,53 \pm 1,84$ ve % $68,58 \pm 3,98$ olarak hesaplandı. Oligomerik kitosan kullanımı kontrole oranla protokorm oluşumunu artırsa da artan konsantrasyonlarda olumsuz etki görülmeye başlandı. Polimerik kitosanolardan 10 kDa ağırlığındaki CHI, oligomerik CHI uygulamasından daha düşük protokorm oluşumuna sebebiyet verdi. Buna rağmen bu oranlar kontrolden önemli ölçüde yüksek bulundu. SG-43, SG-44, SG-45 ve SG-46 besiyerlerinden kaydedilen oranlar sırasıyla % $71,36 \pm 5,51$, % $60,41 \pm 2,42$, % $63,99 \pm 6,14$ ve % $55,00 \pm 4,27$ olarak hesaplandı. Artan konsantrasyonda kullanımında ortaya çıkan olumsuz etkiler oligomerik CHI ile benzerlik göstermektedir. Yüz kDa ağırlığındaki polimerik CHI ise SG-47, SG-48, SG-49 ve SG-50 besiyerlerinde sırasıyla % $48,02 \pm 2,12$, % $61,35 \pm 4,99$, % $55,25 \pm 1,64$ ve % $60,63 \pm 6,57$ protokorm oluşum oranlarını verdi. Kitosan uygulamalarından protokorm oluşumu için en verimli olan oligomerik CHI olarak belirlendi. Tüm denemelerin sonuçları karşılaştırmalı olarak grafikte gösterilmektedir (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Farklı besiyerlerinden alınan protokorm oluşum oranı verilerinin karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

3.7. Bitki Büyüme Verilerine Ait Bulgular

3.7.1. Kontrol besiyerine ait bulgular

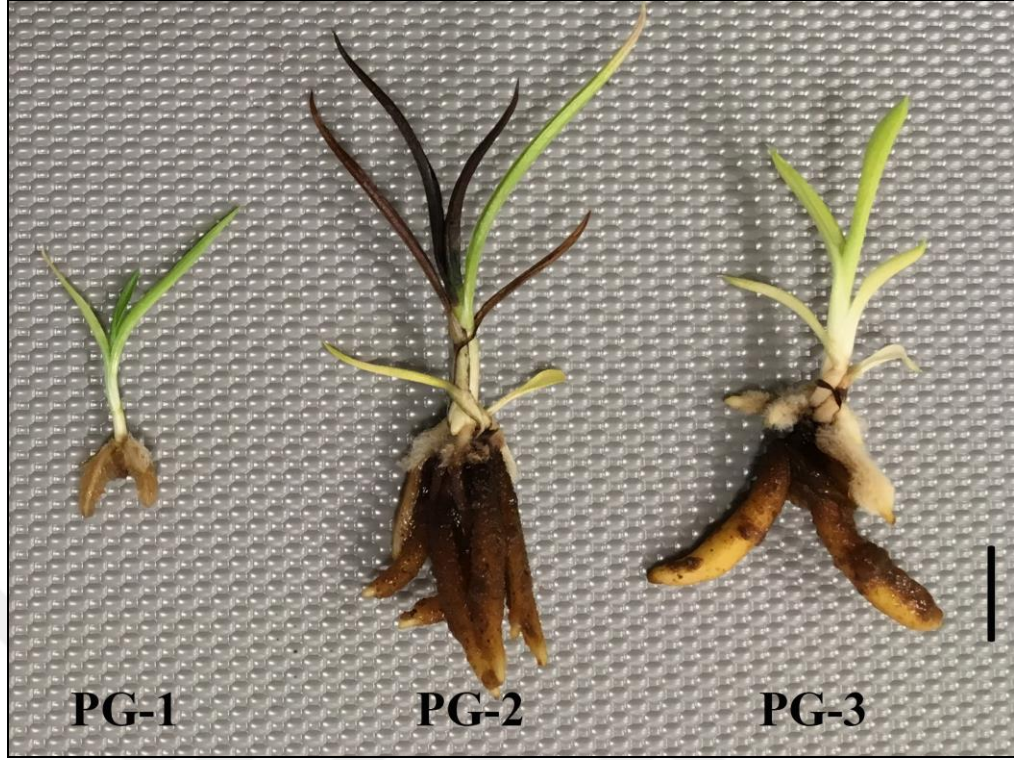
Kontrol besiyeri herhangi bir katkı maddesi kullanılmayan bazal bir katı KN besiyeridir. Kültür süresinin sonunda elde edilen verilere göre ortalama sürgün uzunluğu $1,76 \pm 0,15$ cm, kök uzunluğu ise $0,30 \pm 0,09$ cm olarak bulundu. Kök sayısı ortalama $1,53 \pm 0,11$ olarak bulunurken yumru oluşumu gözlenmedi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Kontrol besiyerinde büyütülen *S. vomeracea* bitkisinin görüntüsü (ölçek: 1 cm)

3.7.2. Muz homojenatı denemelerine ait bulgular

Muz homojenatı (BAN) ile desteklenmiş PG-1, PG-2 ve PG-3 besiyerleri içerisinde büyütülen *S. vomeracea* bitkiciklerinden kültür periyodu sonunda yapılan ölçümlerin sonuçlarına göre besiyeri içerisinde BAN miktarı arttıkça ölçülen tüm parametrelerde kontrole oranla bir artış gözlemlendi (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Muz homojenatı katkılı besiyerlerinde büyütülen *S. vomeracea* bitkilerinin görüntüsü (ölçek: 1 cm)

Sürgün uzunluğu burada gerçek bir sürgünü değil yaprakların birbirine geçerek oluşturduğu durumun ulaştığı en tepe noktayla köklerin başladığı yer arasındaki uzunluğu ifade etmektedir. En yüksek sürgün ve kök uzunlukları % 3 BAN ilaveli besiyerinden kaydedildi (Tablo 3.19.). Kök sayısı besiyerindeki BAN miktarındaki artışla neredeyse doğrusal bir artış sergileyerek en yüksek değerine PG-2 besiyerinde ulaştı (Şekil 3.8.). Yumru çapı ve sayısı ise en yüksek değerine % 5 BAN ilaveli besiyerinde ulaştı. Sadece PG-1 ve kontrol besiyerlerinden ölçülen sürgün uzunlukları istatistiki olarak aynı olup, diğer tüm değerler arasında besiyerlerinden kaynaklanan önemli derecede istatistiksel fark bulunmaktadır.

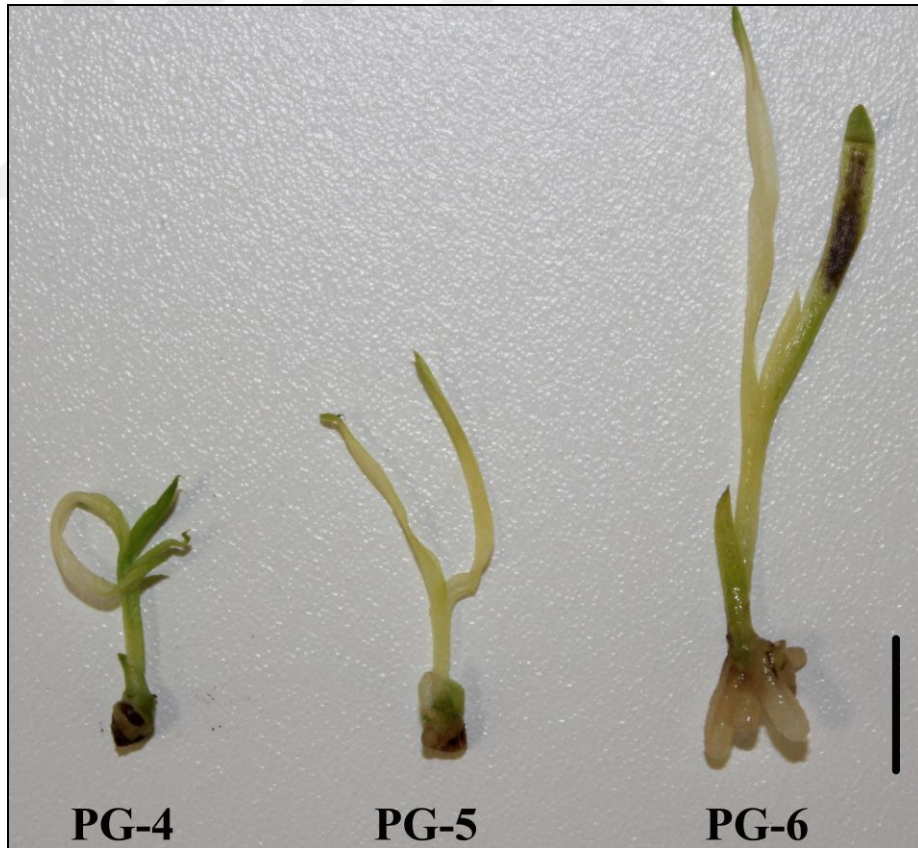
Tablo 3.19. Muz homojenatının *S. vomeracea*'de bitki büyümesi üzerine etkileri

Parametreler	Besiyeri			
	Kontrol	PG-1	PG-2	PG-3
Sürgün uzunluğu (cm)	1,76 ± 0,15 ^c	2,07 ± 0,17 ^c	4,90 ± 0,20 ^a	4,21 ± 0,16 ^b
Kök uzunluğu (cm)	0,30 ± 0,09 ^d	0,74 ± 0,07 ^c	2,23 ± 0,19 ^a	1,32 ± 0,08 ^b
Kök sayısı	1,53 ± 0,11 ^d	3,18 ± 0,30 ^c	8,10 ± 0,35 ^a	6,50 ± 0,35 ^b
Yumur çapı (cm)	0,00 ± 0,00 ^d	0,10 ± 0,03 ^c	0,32 ± 0,05 ^b	0,53 ± 0,07 ^a
Yumur sayısı	0,00 ± 0,00 ^d	0,83 ± 0,11 ^c	2,02 ± 0,13 ^b	2,75 ± 0,26 ^a

*Bir satırdaki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.7.3. Hindistan cevizi suyu denemelerine ait bulgular

Hindistan cevizi suyu (COW) katkılı besiyerlerinin *S. vomeracea*'de sürgün gelişimini olumlu yönde etkilerken kök gelişimini engellediği bulundu. Kök gelişimi ancak % 10 COW içeren PG-6 besiyerinde sınırlı şekilde ortaya çıktı (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Hindistan cevizi suyu katkılı besiyerlerinde büyütülen *S. vomeracea* bitkilerinin görüntüsü (ölçek: 1 cm)

Kök uzunluğu en fazla PG-6 besiyerinde bulunsa da COW ilaveli her üç besiyeri arasında bu parametre için istatistiki fark bulunmamaktadır. Kök sayısının ise PG-4

besiyerine kıyasla PG-6 besiyerinde 3 kat arttığı gözlemlendi. Denenen COW katkı hiçbir besiyerinde yumru meydana gelmedi (Tablo 3.20.).

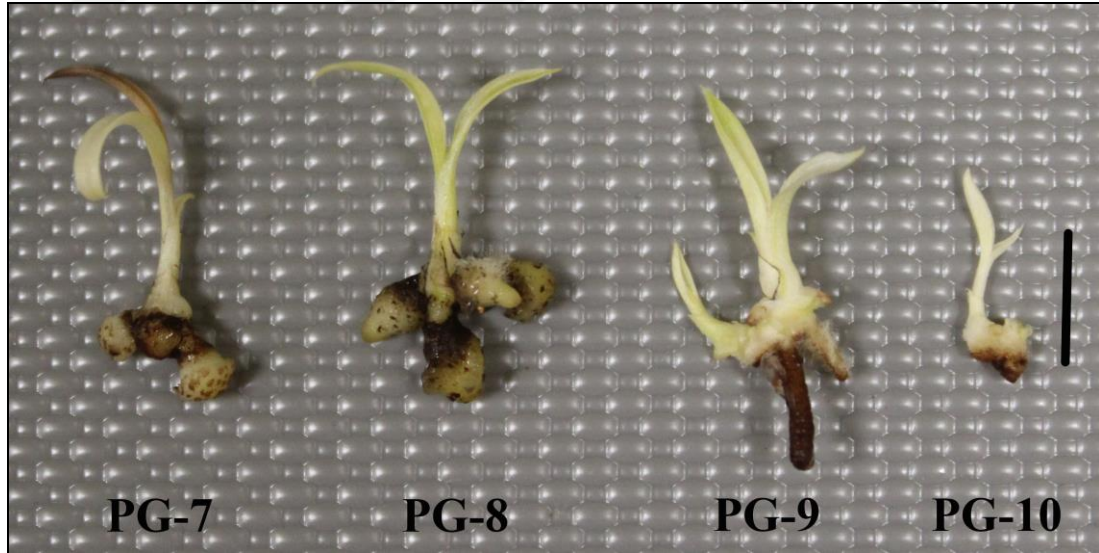
Tablo 3.20. Hindistan cevizi suyunun *S. vomeracea*'de bitki büyümesi üzerine etkileri

Parametreler	Besiyeri			
	Kontrol	PG-4	PG-5	PG-6
Sürgün uzunluğu (cm)	1,76 ± 0,15 ^c	2,15 ± 0,22 ^b	2,21 ± 0,17 ^b	2,93 ± 0,20 ^a
Kök uzunluğu (cm)	0,30 ± 0,09 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,02 ^b	0,11 ± 0,04 ^b
Kök sayısı	1,53 ± 0,11 ^a	0,48 ± 0,07 ^c	1,13 ± 0,13 ^b	1,35 ± 0,14 ^a
Yumru çapı (cm)	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Yumru sayısı	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a

*Bir satırdaki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.7.4. 6-benzilaminopürin denemelerine ait bulgular

6-benzilaminopürin (BAP) ile güçlendirilmiş besiyerlerinde sitokininlerin sürgün oluşumu üzerine bilinen büyüme artırıcı etkilerinin aksine yumru gelişiminde olumlu sonuçlar alındı (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. 6-benzilaminopürin katkı besiyerlerinde büyütülen *S. vomeracea* bitkilerinin görüntüsü (ölçek: 1 cm)

Kontrole oranla en yüksek BAP konsantrasyonunun ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) kullanıldığı PG-10 besiyeri hariç diğer tüm besiyerlerinde sürgün uzunluğunda artış kaydedildi. Bu parametre açısından PG-7, PG-8 ve PG-9 besiyerlerinden alınan sonuçlar arasında istatistiki bir fark bulunmamaktadır. Kök uzunluğu $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP içeren PG-8

besiyerine kadar arttığı fakat artan konsantrasyonlarda kullanılan BAP kök uzunluğunu olumsuz etkilediği bulundu. Buna karşın PG-10 besiyerinde dahi kontrole oranla yüksek bir ortalama kök uzunluğu kaydedildi. Ortalama kök sayısı da kök uzunluklarına benzer bir değişim gösterdi fakat PG-10 besiyerinden kaydedilen ortalama kök sayısı değeri kontrole oranla azaldı. En yüksek ortalama yumru sayısı ve çapı PG-8 besiyerinden elde edilirken tüm BAP uygulamaları yumru oluşumunu kontrole oranla artırdı (Tablo 3.21.).



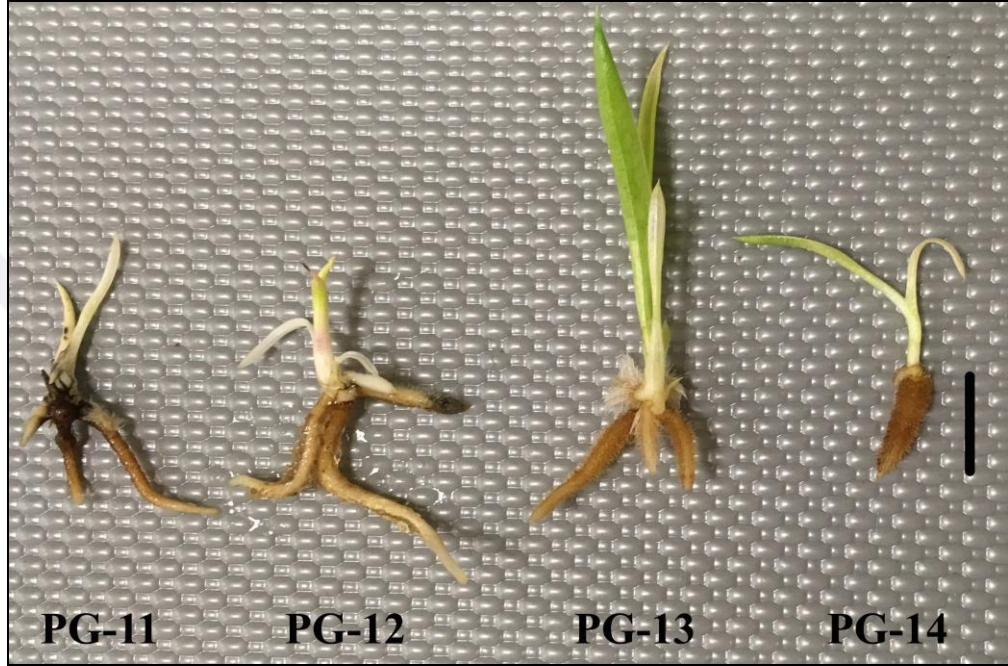
Tablo 3.21. 6-benzilaminopürinin *S. vomeracea*'de bitki büyümesi üzerine etkileri

Parametreler	Besiyeri				
	Kontrol	PG-7	PG-8	PG-9	PG-10
Sürgün uzunluğu (cm)	1,76 ± 0,15 ^b	2,03 ± 0,08 ^a	2,26 ± 0,17 ^a	2,21 ± 0,11 ^a	1,26 ± 0,08 ^c
Kök uzunluğu (cm)	0,30 ± 0,09 ^c	0,73 ± 0,10 ^b	1,18 ± 0,06 ^a	1,03 ± 0,13 ^a	0,44 ± 0,01 ^c
Kök sayısı	1,53 ± 0,11 ^c	2,28 ± 0,25 ^b	3,00 ± 0,17 ^a	2,50 ± 0,29 ^b	1,06 ± 0,10 ^d
Yumru çapı (cm)	0,00 ± 0,00 ^d	0,47 ± 0,08 ^b	0,62 ± 0,03 ^a	0,42 ± 0,03 ^b	0,28 ± 0,03 ^c
Yumru sayısı	0,00 ± 0,00 ^e	1,28 ± 0,10 ^b	2,22 ± 0,10 ^a	0,78 ± 0,10 ^c	0,44 ± 0,10 ^d

*Bir satırdaki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.7.5. Kinetin denemelerine ait bulgular

Kinetin (KIN) katkılı besiyerlerinden alınan sonuçlara göre sadece $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ konsantrasyonda kinetin içeren PG-13 besiyerinin sürgün gelişimi açısından en olumlu sonucu verdiği bulundu. Bu parametre için diğer besiyerlerinden kontrolden daha düşük sonuçlar kaydedildi (Şekil 3.11.)



Şekil 3.11. Kinetin katkılı besiyerlerinde büyütülen *S. vomeracea* bitkilerinin görüntüsü (ölçek: 1 cm)

Ortalama kök uzunluğunun ise kontrole oranla diğer besiyerlerinde 5-9 kat arası arttığı tespit edildi. Kök sayısı üzerine ise düşük konsantrasyonda KIN içeren besiyerleri (PG-11 ve PG-12) olumlu etki yaparken KIN konsantrasyonu arttıkça kök sayısında azalma görüldü (Tablo 3.22.). Buna rağmen kök sayısındaki bu düşüş kontrol grubundan elde edilen sonuçlardan istatistiki olarak farklı değildir. Buna benzer olarak yumru oluşumu sadece PG-11 ve PG-12 besiyerlerinde gözlemlendi. Yumru sayısı ve yumru çapı açısından $0,25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KIN içeren PG-11 besiyeri en yüksek sonuçları verirken PG-12 besiyerinden elde edilen sonuçlar ile arasında istatistiki fark bulunmadı.

Tablo 3.22. Kinetinin *S. vomeracea*'de bitki büyümesi üzerine etkileri

Parametreler	Besiyeri				
	Kontrol	PG-11	PG-12	PG-13	PG-14
Sürgün uzunluğu (cm)	1,76 ± 0,15 ^b	0,88 ± 0,10 ^c	1,04 ± 0,20 ^c	2,21 ± 0,12 ^a	0,96 ± 0,14 ^c
Kök uzunluğu (cm)	0,30 ± 0,09 ^d	2,21 ± 0,10 ^b	2,88 ± 0,16 ^a	1,53 ± 0,15 ^c	1,52 ± 0,14 ^c
Kök sayısı	1,53 ± 0,11 ^b	1,99 ± 0,11 ^a	2,21 ± 0,13 ^a	1,49 ± 0,18 ^b	1,33 ± 0,12 ^b
Yumru çapı (cm)	0,00 ± 0,00 ^b	0,35 ± 0,09 ^a	0,32 ± 0,05 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
Yumru sayısı	0,00 ± 0,00 ^b	0,86 ± 0,14 ^a	0,73 ± 0,09 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b

*Bir satırdaki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.7.6. İndol-3-asetik asit denemelerine ait bulgular

İndol-3-asetik asit (IAA) içeren besiyerlerinden alınan sonuçlar, bu besiyerlerinin kontrole oranla sürgün uzunluğu açısından düşük sonuçlar verdiğini ortaya çıkardı (Şekil 3.12.). Buna rağmen 1,0 mg·l⁻¹ IAA içeren PG-17 besiyerinden alınan ortalama sürgün uzunluğu sonucu ile kontrol grubu arasında istatistiki bir fark bulunmadı.



Şekil 3.12. İndol-3-asetik asit katkılı besiyerlerinde büyütülen *S. vomeracea* bitkilerinin görüntüsü (ölçek: 1 cm)

Ortalama kök uzunluğu tüm uygulamalarda kontrole oranla artmış olup en yüksek değerine PG-16 besiyerinde ulaştığı bulundu. Ortalama kök sayısı da kök uzunluklarına benzer bir değişim gösterdi ve IAA uygulamaları neticesinde kontrole oranla önemli ölçüde arttı. Bu parametre için en yüksek değer PG-16 besiyerinden kaydedildi. Tüm besiyerlerinde yumru oluşumu gözlemlendi fakat kontrol dışındaki besiyerleri arasında yumru sayısı ve çapı bakımından istatistiki olarak önemli bir fark bulunmadı (Tablo 3.23.).

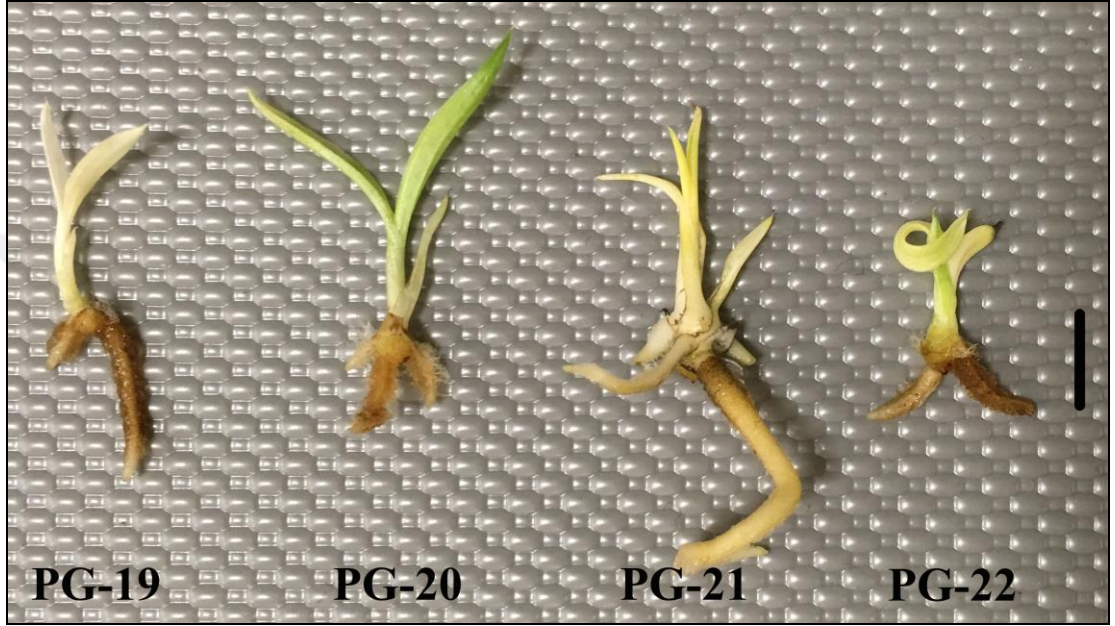
Tablo 3.23. İndol-3-asetik asitin *S. vomeracea*'de bitki büyümesi üzerine etkileri

Parametreler	Besiyeri				
	Kontrol	PG-15	PG-16	PG-17	PG-18
Sürgün uzunluğu (cm)	1,76 ± 0,15 ^a	0,93 ± 0,08 ^c	1,45 ± 0,18 ^b	1,74 ± 0,09 ^a	1,05 ± 0,14 ^c
Kök uzunluğu (cm)	0,30 ± 0,09 ^d	0,73 ± 0,10 ^b	1,34 ± 0,09 ^a	0,75 ± 0,09 ^b	0,47 ± 0,08 ^c
Kök sayısı	1,53 ± 0,11 ^d	2,36 ± 0,21 ^c	3,11 ± 0,10 ^a	2,69 ± 0,17 ^b	1,56 ± 0,09 ^d
Yumru çapı (cm)	0,00 ± 0,00 ^b	0,28 ± 0,07 ^a	0,22 ± 0,05 ^a	0,22 ± 0,05 ^a	0,26 ± 0,07 ^a
Yumru sayısı	0,00 ± 0,00 ^b	0,23 ± 0,04 ^a	0,20 ± 0,10 ^a	0,18 ± 0,04 ^a	0,22 ± 0,03 ^a

*Bir satırdaki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.7.7. İndol-3-bütirik asit denemelerine ait bulgular

İndol-3-bütirik asit (IBA) uygulamalarından elde edilen sonuçlar ortalama sürgün uzunluğunun kontrole oranla azaldığını ortaya koydu. PG-19 ve PG-20 besiyerlerinden alınan ortalama sürgün uzunluğu sonuçları istatistiksel olarak aynı bulundu (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. İndol-3-bütirik asit katkılı besiyerlerinde büyütülen *S. vomeracea* bitkilerinin görüntüsü (ölçek: 1 cm)

Ortalama kök uzunluğu $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IBA içeren PG-21 besiyerine kadar artan konsantrasyonlarda IBA uygulaması sonrasında arttı. PG-22 besiyerinde ise bulunan daha yüksek konsantrasyondaki ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) IBA nedeniyle azalmaya başladı. Ortalama kök sayısı ise kontrolün 2 katına kadar bir artış gösterdi (PG-20) ve tüm diğer IBA destekli besiyerlerinde kontrole oranla daha yüksek bir değerde kaldı. Tüm uygulamalarda yumru oluşumu görülürken bu parametreye ait değerler düşük oranlarda kaldı. En yüksek yumru çapı PG-19 besiyerinden hesaplanırken diğer besiyerleri istatistiksel olarak aynı sonuçları verdi. Yumru oluşumu ise en yüksek PG-21 besiyerinde bulundu (Tablo 3.24.).

Tablo 3.24. İndol-3-bütirik asitin *S. vomeracea*'de bitki büyümesi üzerine etkileri

Parametreler	Besiyeri				
	Kontrol	PG-19	PG-20	PG-21	PG-22
Sürgün uzunluğu (cm)	1,76 ± 0,15 ^a	1,31 ± 0,25 ^b	1,33 ± 0,23 ^b	0,71 ± 0,10 ^c	0,29 ± 0,05 ^d
Kök uzunluğu (cm)	0,30 ± 0,09 ^c	0,89 ± 0,08 ^b	0,95 ± 0,09 ^b	1,39 ± 0,32 ^a	0,92 ± 0,12 ^b
Kök sayısı	1,53 ± 0,11 ^d	2,11 ± 0,29 ^c	3,08 ± 0,05 ^a	2,67 ± 0,21 ^b	2,08 ± 0,12 ^c
Yumru çapı (cm)	0,00 ± 0,00 ^c	0,38 ± 0,07 ^a	0,22 ± 0,04 ^b	0,24 ± 0,05 ^b	0,24 ± 0,06 ^b
Yumru sayısı	0,00 ± 0,00 ^c	0,32 ± 0,08 ^b	0,31 ± 0,07 ^b	0,58 ± 0,08 ^a	0,22 ^b ± 0,03

*Bir satırdaki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre p < 0,05 seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.7.8. Jasmonik asit denemelerine ait bulgular

Jasmonik asit (JAS) takviyeli besiyerlerinden elde edilen veriler ortalama sürgün uzunluğunun *S. vomeracea*'de kontrole oranla arttığını göstermektedir. En yüksek sürgün uzunluğu $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ takviyeli PG-25 besiyerinden elde edildi. Bununla birlikte PG-24 ve PG-25 besiyerlerinden elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel fark bulunmadı (Şekil 3.14.).



Şekil 3.14. Jasmonik asit katkı besiyerlerinde büyütülen *S. vomeracea* bitkilerinin görüntüsü (ölçek: 1 cm)

Ortalama kök uzunluğu ise en yüksek PG-24 besiyerinden kaydedildi. Bu değer kontrol grubundan elde edilen değer 5,5 katına kadar arttığı bulundu. Ortalama kök sayısı da sürgün uzunluklarına benzer bir gelişim gösterdi ve en yüksek değerine PG-24 besiyerinde ulaştı. Buna rağmen PG-24 ve PG-25 besiyerlerinden alınan sonuçlar arasında istatistiksel fark bulunmadı. Ortalama yumru çapı ve sayısı bakımından da en yüksek değerler diğer tüm parametrelerde olduğu gibi PG-24 besiyerinden elde edildi (Tablo 3.25.). JAS ilaveli besiyerlerinde büyütülen bitkilerde gözlemlenen belirgin sonuçlardan bir tanesi de köklerin yumru oluşturmaya dahi daha kalın olarak gelişim göstermesidir. Bununla birlikte bu denemede diğer besiyerlerine oranla fenolik madde birikimine dayalı daha yoğun kararma gözlemlendi.

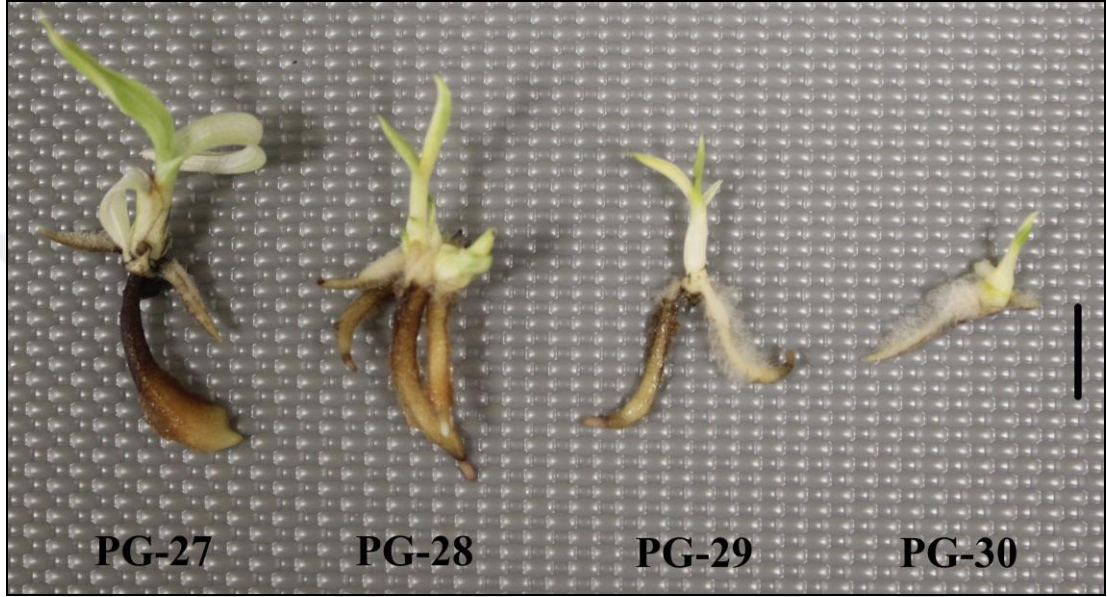
Tablo 3.25. Jasmonik asitin *S. vomeracea*'de bitki büyümesi üzerine etkileri

Parametreler	Besiyeri				
	Kontrol	PG-23	PG-24	PG-25	PG-26
Sürgün uzunluğu (cm)	1,76 ± 0,15 ^c	1,78 ± 0,18 ^c	2,79 ± 0,12 ^a	2,82 ± 0,13 ^a	2,42 ± 0,19 ^b
Kök uzunluğu (cm)	0,30 ± 0,09 ^d	1,43 ± 0,13 ^b	1,69 ± 0,05 ^a	1,61 ± 0,09 ^{ab}	1,38 ± 0,16 ^c
Kök sayısı	1,53 ± 0,11 ^b	1,29 ± 0,15 ^b	2,76 ± 0,23 ^a	2,67 ± 0,11 ^a	1,44 ± 0,15 ^b
Yumru çapı (cm)	0,00 ± 0,00 ^c	0,12 ± 0,03 ^b	0,30 ± 0,09 ^a	0,15 ± 0,04 ^b	0,08 ± 0,02 ^{bc}
Yumru sayısı	0,00 ± 0,00 ^d	0,48 ± 0,10 ^c	1,79 ± 0,22 ^a	0,83 ± 0,10 ^b	0,56 ± 0,11 ^c

*Bir satırdaki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.7.9. Oligomerik kitosan denemelerine ait bulgular

Polimerizasyon derecesi 2-15 arası olan oligomerlerin karışımından oluşan ve 1 kDa moleküler ağırlıktaki oligomerik kitosanla (CHI-1) desteklenmiş besiyerleri ortalama sürgün sayısı üzerine sadece bu karışımının en düşük konsantrasyonda kullanıldığı besiyerinde (PG-27) olumlu etki yaptığı bulundu (Şekil 3.15.).



Şekil 3.15. Kitosan oligomerleri katkılı besiyerlerinde büyütülen *S. vomeracea* bitkilerinin görüntüsü (ölçek: 1 cm)

Ortalama kök uzunluğu en yüksek PG-27 ve PG-28 besiyerlerinde kontrolün sırasıyla 5,5 ve 5 katı değerinde bulunmuş olup bu iki sonuç arasında istatistiki fark bulunmamaktadır. PG-30 besiyeri hariç diğer tüm besiyerlerinde oligomerik kitosan karışımı ortalama kök sayılarını önemli ölçüde artırdı. En yüksek ortalama kök sayısı $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ CHI-1 içeren PG-28 besiyerinden kaydedildi. Buna karşın artan konsantrasyonlar kök gelişimini engelledi. CHI-1 katkılı tüm besiyerleri yumru oluşumunu teşvik ederken, ortalama yumru çapı tüm uygulamalar arasında en yüksek PG-27 besiyerinde bulundu. Bununla birlikte PG-28 en fazla sayıda yumru oluşumunu sağlayan besiyeri olarak belirlendi. Tüm parametreler göz önüne alındığında en düşük konsantrasyondaki CHI-1 uygulamasının diğer uygulamalardan daha olumlu sonuçlar verdiği gözlemlendi (Tablo 3.26.).

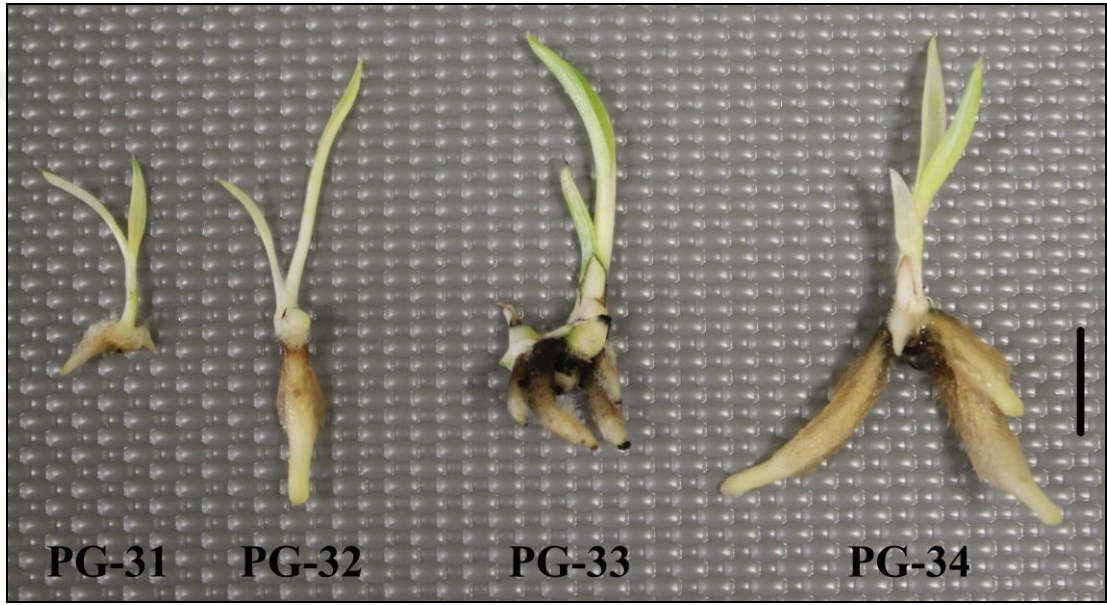
Tablo 3.26. Oligomerik kitosanın (1 kDa) *S. vomeracea*'de bitki büyümesi üzerine etkileri

Parametreler	Besiyeri				
	Kontrol	PG-27	PG-28	PG-29	PG-30
Sürgün uzunluğu (cm)	1,76 ± 0,15 ^b	2,54 ± 0,16 ^a	1,65 ± 0,18 ^b	1,25 ± 0,05 ^c	0,86 ± 0,15 ^d
Kök uzunluğu (cm)	0,30 ± 0,09 ^d	1,66 ± 0,09 ^a	1,53 ± 0,08 ^a	1,10 ± 0,08 ^b	0,88 ± 0,07 ^c
Kök sayısı	1,53 ± 0,11 ^d	3,37 ± 0,21 ^b	4,23 ± 0,28 ^a	2,30 ± 0,06 ^c	1,12 ± 0,05 ^e
Yumru çapı (cm)	0,00 ± 0,00 ^d	0,78 ± 0,09 ^a	0,52 ± 0,11 ^b	0,27 ± 0,07 ^c	0,18 ± 0,02 ^c
Yumru sayısı	0,00 ± 0,00 ^e	1,27 ± 0,06 ^b	2,13 ± 0,15 ^a	0,87 ± 0,10 ^c	0,24 ± 0,04 ^d

*Bir satırdaki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.7.10. Polimerik kitosan denemelerine ait bulgular

Polimerizasyon derecesi 70 olan ve 10 kDa moleküler ağırlıktaki polimerden oluşan kitosan (CHI-10) ile desteklenmiş besiyerlerinin sürgün gelişimini PG-32 ve sonraki besiyerlerinde teşvik ettiği bulundu (Şekil 3.16.). PG-31 besiyeri ise kontrole oranla sürgün uzunluğunu azalttı. Bu besiyeri en düşük konsantrasyonda CHI-10 ($5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) içermektedir. En yüksek ortalama sürgün uzunluğu PG-33 besiyerinden kaydedilirken PG-34 besiyerinden alınan sonuçlarla arasında istatistiki fark bulunmadı.



Şekil 3.16. Kitosan polimeri katkılı besiyerlerinde büyütülen *S. vomeracea* bitkilerinin görüntüsü (ölçek: 1 cm)

Kök uzunluğu besiyerinde artan CHI-10 varlığına paralel olarak kontrole kıyasla artış gösterdi. En yüksek ortalama kök uzunluğu PG-34 besiyerinden kaydedilirken PG-31 ve PG-32 besiyerleri ortalama kök sayısını kontrole oranla azaldığı bulundu. En yüksek ortalama kök sayısı PG-33 besiyerinden kaydedildi. Tüm CHI-10 uygulamaları yumru oluşumunu kontrole oranla artırırken en yüksek değerlerin alındığı PG-32, PG-33 ve PG-34 besiyerlerinden kaydedilen ortalama yumru çapları arasında istatistiki fark bulunmadı. Ortalama yumru sayısı ise kök uzunluğu parametresine benzer şekilde en yüksek değerine PG-33 besiyerinde ulaştı (Tablo 3.27.). Tüm parametreler dikkate alındığında yüksek konsantrasyonlardaki CHI-10 uygulamalarının daha olumlu sonuçlar verdiği gözlemlendi.

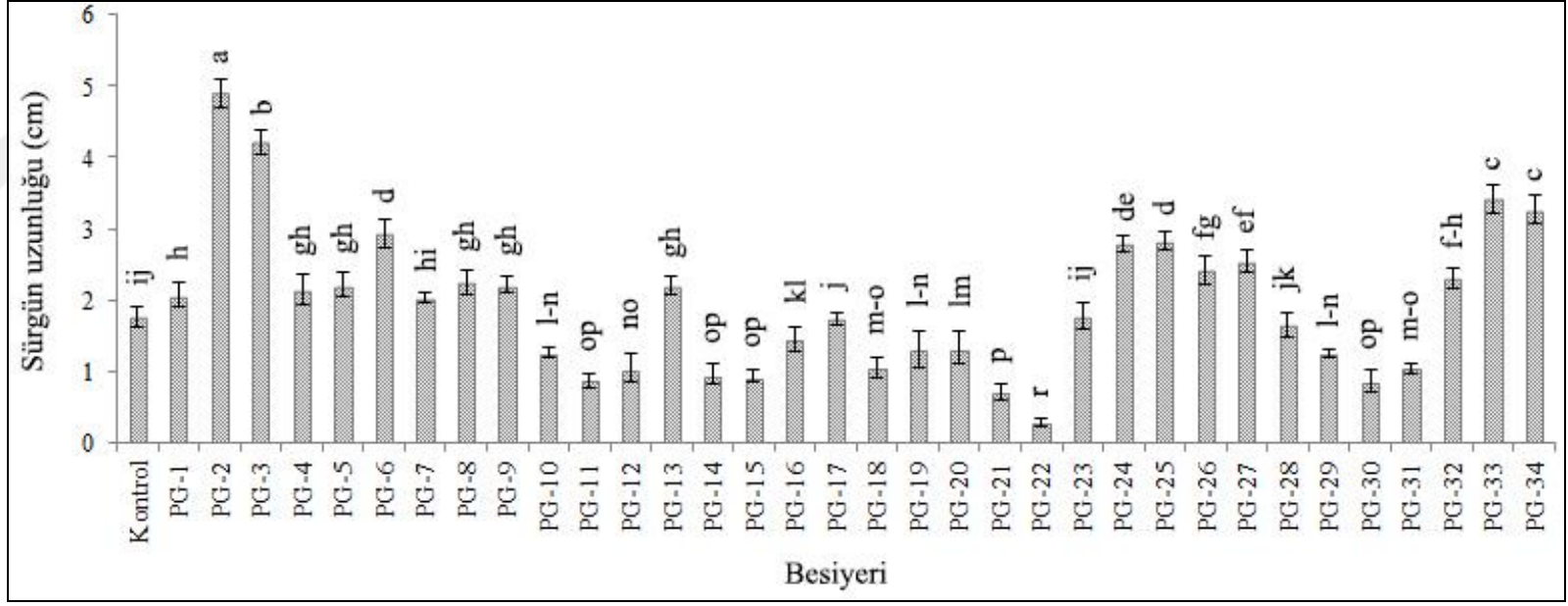
Tablo 3.27. Polimerik kitosanın (10 kDa) *S. vomeracea*'de bitki büyümesi üzerine etkileri

Parametreler	Kontrol	Besiyeri			
		PG-31	PG-32	PG-33	PG-34
Sürgün uzunluğu (cm)	1,76 ± 0,15 ^c	1,05 ± 0,07 ^d	2,30 ± 0,14 ^b	3,41 ± 0,19 ^a	3,26 ± 0,20 ^a
Kök uzunluğu (cm)	0,30 ± 0,09 ^c	0,42 ± 0,06 ^c	0,98 ± 0,08 ^b	0,94 ± 0,12 ^b	1,63 ± 0,15 ^a
Kök sayısı	1,53 ± 0,11 ^c	1,21 ± 0,08 ^d	1,41 ± 0,12 ^{cd}	3,67 ± 0,20 ^a	3,03 ± 0,08 ^b
Yumru çapı (cm)	0,00 ± 0,00 ^c	0,18 ± 0,06 ^b	0,32 ± 0,06 ^a	0,35 ± 0,04 ^a	0,38 ± 0,06 ^a
Yumru sayısı	0,00 ± 0,00 ^c	0,20 ± 0,05 ^b	0,33 ± 0,09 ^b	1,07 ± 0,11 ^a	1,02 ± 0,11 ^a

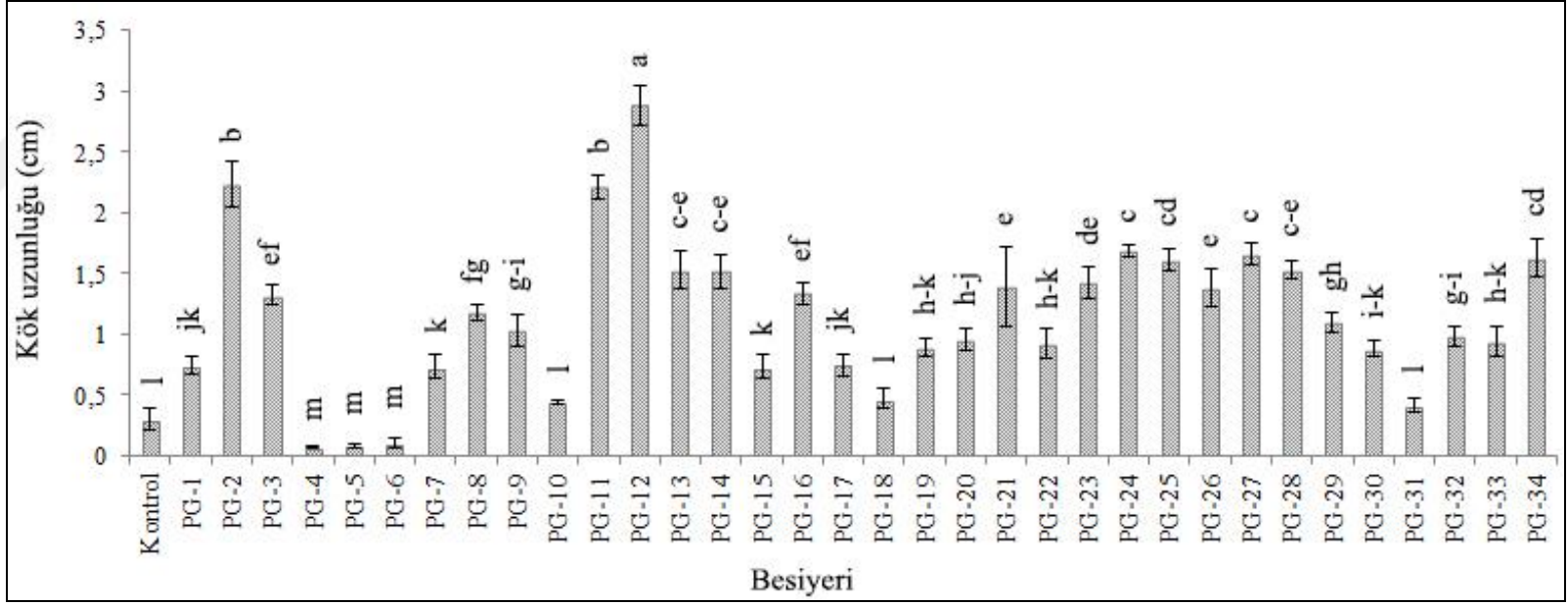
*Bir satırdaki aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre p < 0,05 seviyesinde istatistiki fark yoktur

3.7.11. Bitki büyüme verilerinin toplu karşılaştırması

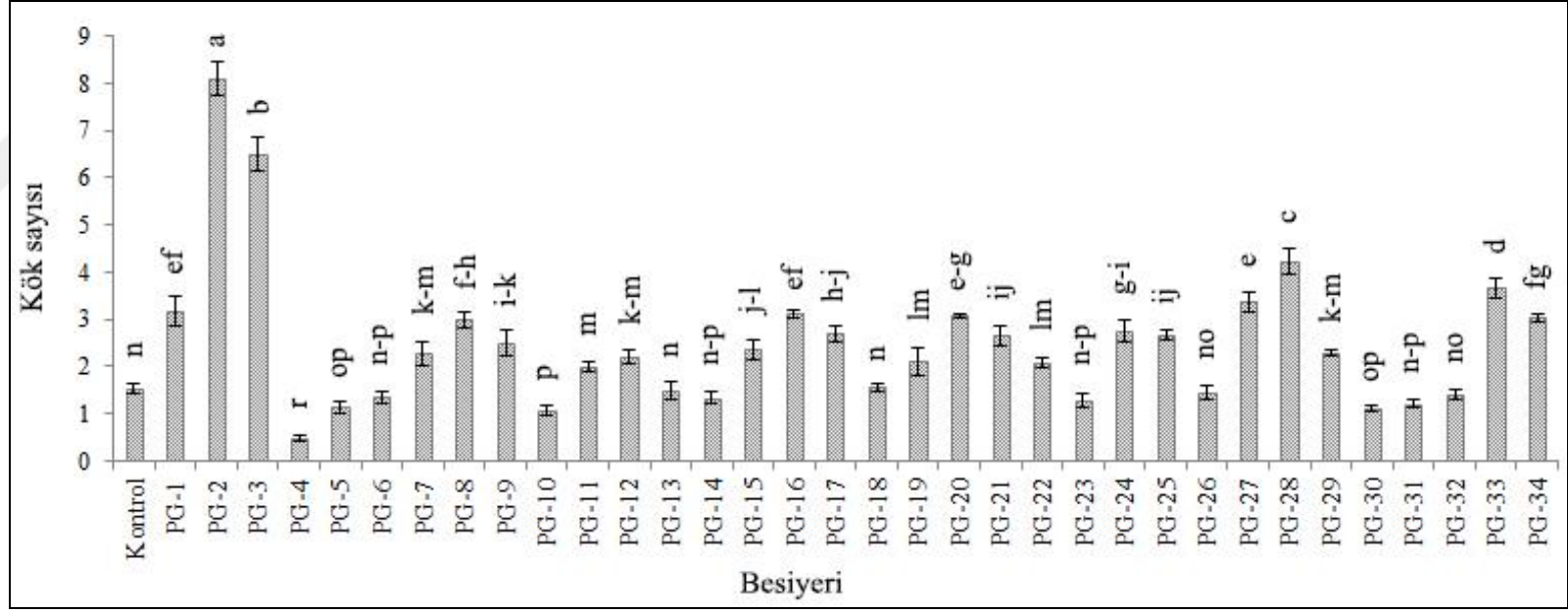
Bitkiciklerin kültürlerde uygulanan farklı BBD ve BBA'lar karşısında morfometrik olarak nasıl cevap verdiklerine odaklanılan bu aşamada elde edilen veriler toplu halde incelendiğinde, ortalama sürgün uzunluğunu en fazla artıran besiyerlerinin sırasıyla SUC yerine % 3 BAN katkılı PG-2, SUC yerine % 5 BAN katkılı PG-3 ve $15 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ CHI-10 katkılı PG-33 besiyerleri olduğu bulundu. PG-33 besiyeri ile PG-34 besiyeri istatistiksel olarak aynı sonucu verdiği gözlemlendi (Şekil 3.17.). Bu parametre özelinde muz homojenatı ve polimerik kitosanın sürgün uzunluğuna olumlu etkisi belirlendi. Ortalama kök uzunlukları karşılaştırıldığında en uzun köklerin sırasıyla $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ KIN destekli PG-12, $0,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ KIN destekli PG-11 ve $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ JAS destekli PG-24 olduğu bulundu. PG-24 ile $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ CHI-1 katkılı PG-27 besiyerinden alınan sonuçlar arasında istatistiki olarak fark tespit edilmedi (Şekil 3.18.). Dolayısıyla düşük konsantrasyonlarda kinetin, jasmonik asit veya oligomerik kitosan kök uzunluğunu artıran başlıca besiyeri bileşenleri olarak bulundu. Kök sayısı ise sürgün uzunluğuna benzer bir büyüme cevabı verdi. Ortalama kök sayısını en fazla artıran besiyerleri PG-2, PG-3 ve $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ CHI-1 içeren PG-28 olarak bulundu (Şekil 3.19.). Bu veriler *S. vomeracea*'de muz homojenatı ve uygun düzeyde oligomerik kitosan kullanılarak kök sayısının artırılabilceğini göstermektedir. Yumru oluşumu görülen köklerde bu yumruların çapları ölçüldü, ortalamaları alındı. En kalın yumruların sırasıyla $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ CHI-1 katkılı PG-27, $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP takviyeli PG-8 ve $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ CHI-1 katkılı PG-28 besiyerlerinde olduğu bulundu (Şekil 3.20.). Bu bulgu, yumru gelişimi için en uygun besiyeri ilavesinin oligomerik kitosan ve benzilaminopürin olduğunu ortaya koymaktadır. Bitki başına ortalama yumru sayısı hesaplandığında sayıca en fazla yumru oluşumunu teşvik eden besiyerlerinin sırasıyla PG-3, PG-8 ve PG-28 oldukları bulundu. PG-2 besiyeri ise PG-28 besiyerinden kaydedilen değere çok yakın bir sonuç ortaya çıkardı (Şekil 3.21.). Bu sonuç *S. vomeracea* kültürlerinde yumru sayısının uygun konsantrasyonda muz homojenatı, benzilaminopürin ve oligomerik kitosan uygulaması ile arttığını göstermektedir.



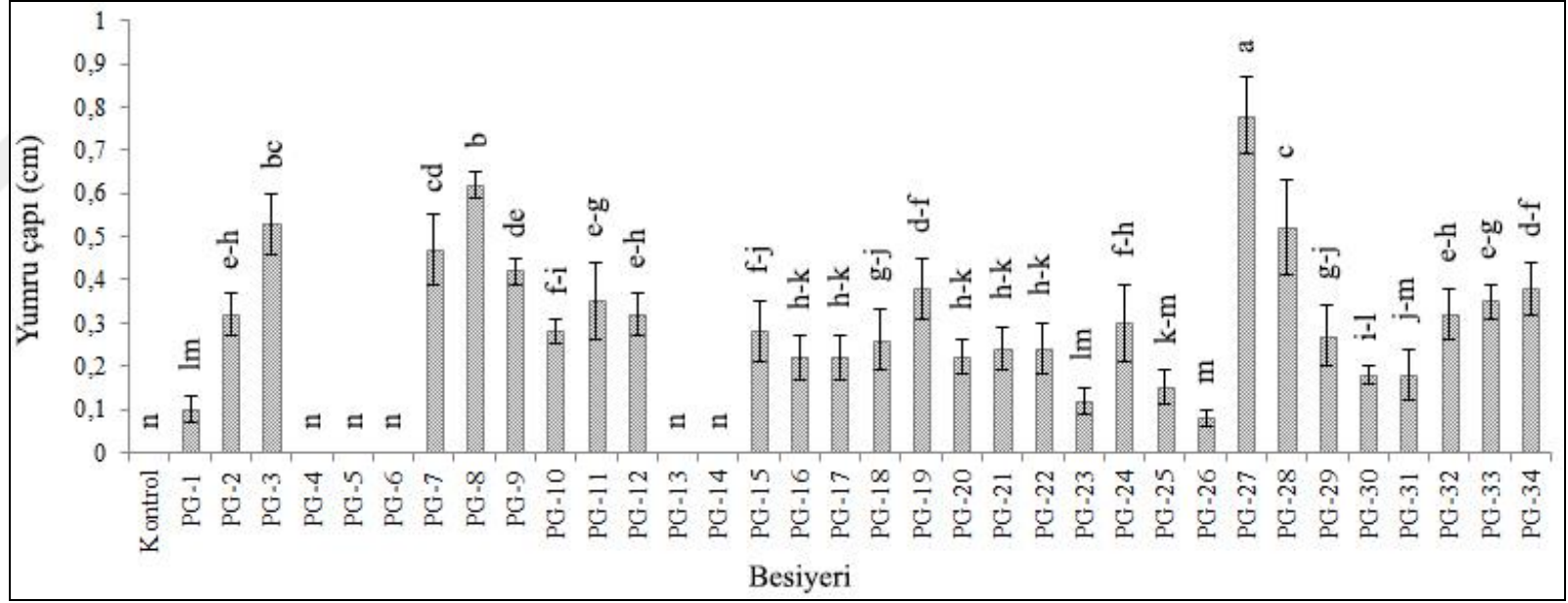
Şekil 3.17. Farklı besiyerlerinden alınan sürgün uzunluğu verilerinin karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)



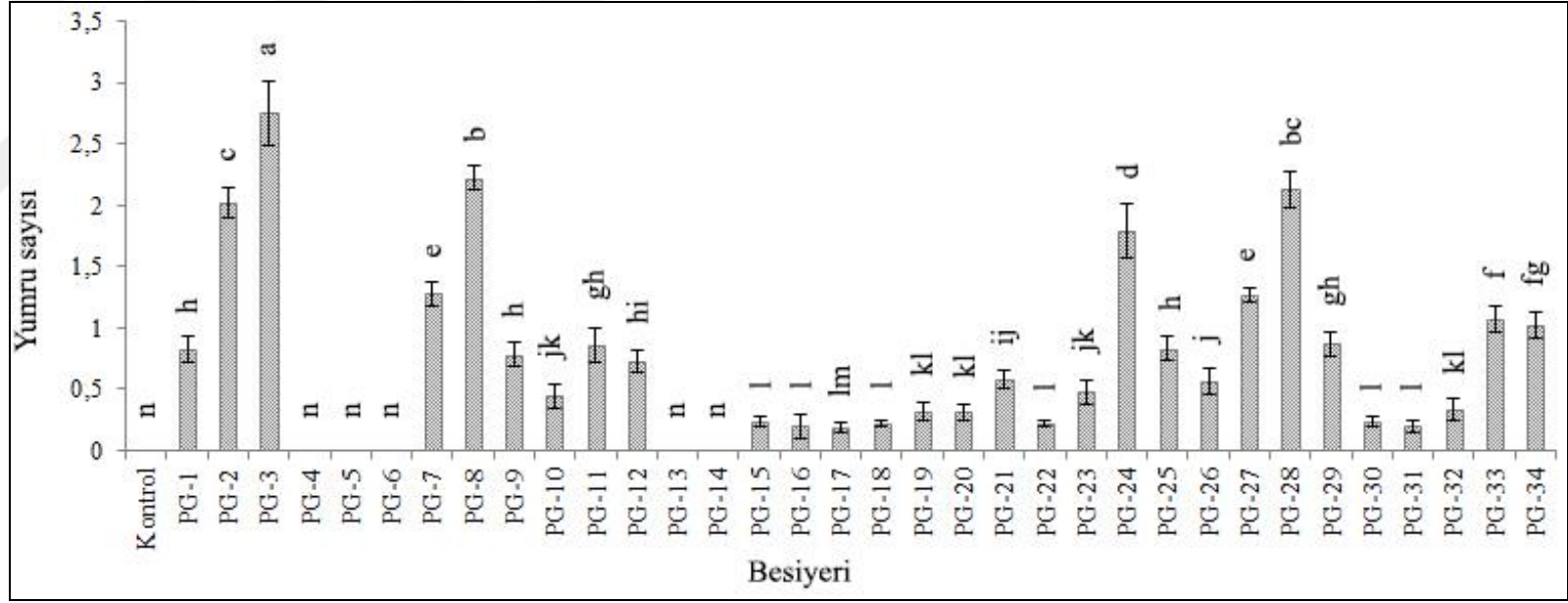
Şekil 3.18. Farklı besiyerlerinden alınan kök uzunluğu verilerinin karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)



Şekil 3.19. Farklı besiyerlerinden alınan kök sayısı verilerinin karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)



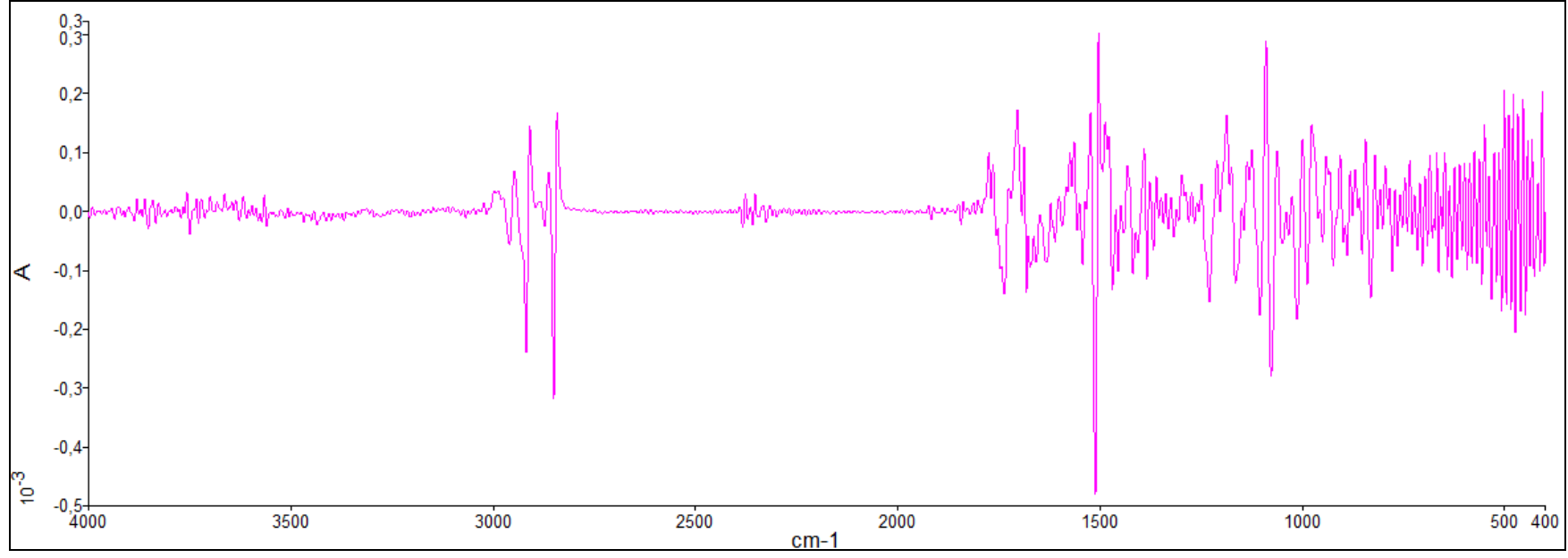
Şekil 3.20. Farklı besiyerlerinden alınan yumru çapı verilerinin karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)



Şekil 3.21. Farklı besiyerlerinden alınan yumru sayısı verilerinin karşılaştırılması (Aynı üst karaktere sahip ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre $p < 0,05$ seviyesinde istatistiki fark yoktur)

3.8. FTIR Verilerine Ait Bulgular

Serapias vomeracea üzerinde denenen kitosan ve diğler çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin sebep oldukları *in vitro* fizyolojik değışimlerin FTIR spektroskopisi aracılığıyla moleküler düzeyde incelenmesi sonucunda elde edilen veriler aşağıda verilmektedir. FTIR spektroskopisi bitki yapısındaki farklı biyomoleküllerin fonksiyonel gruplarından kaynaklanan titreşimleri analiz etme özelliğinden dolayı bu *in vitro* fizyolojik değışimler incelenen moleküllerin yapısal ve fonksiyonel değışimleri kapsamaktadır. Tüm FTIR şekillerden görüldüğü üzere yaprak ve köke ait spektrumlar bitkiye ait her türlü primer ve sekonder metabolitlere ait fonksiyonel gruplardan kaynaklı olduğundan spektrumlar oldukça kompleks ve çok sayıda bant içermektedir (Şekil 3.22). Fazla sayıda bant içeren spektrumların daha rahat bir şekilde sunulması için spektrumlar farklı bölgelere ayrılarak gösterildi.

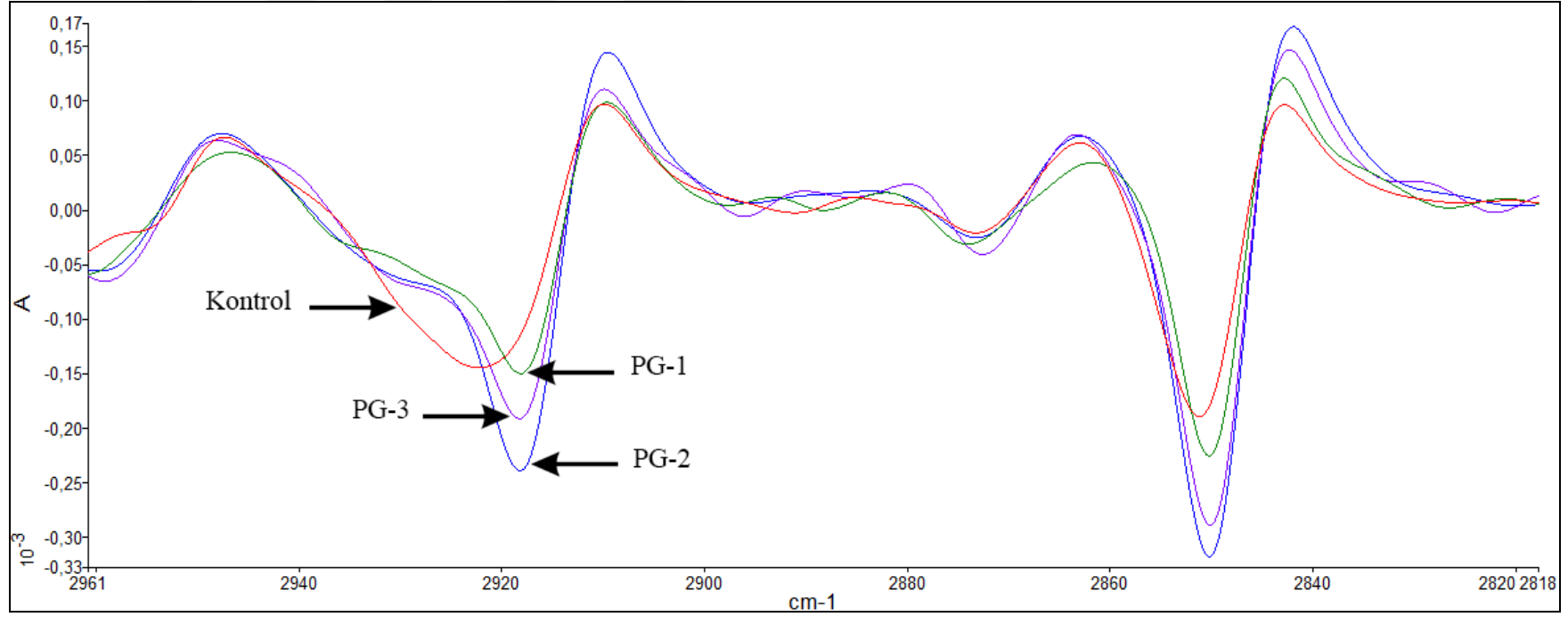


Şekil 3.22. PG-4 besiyerinde büyütülen *Serapias vomeracea*'de yaprak dokusuna ait ikincil türev FTIR spektrumu

3.8.1. Yaprak spektrumlarına ait bulgular

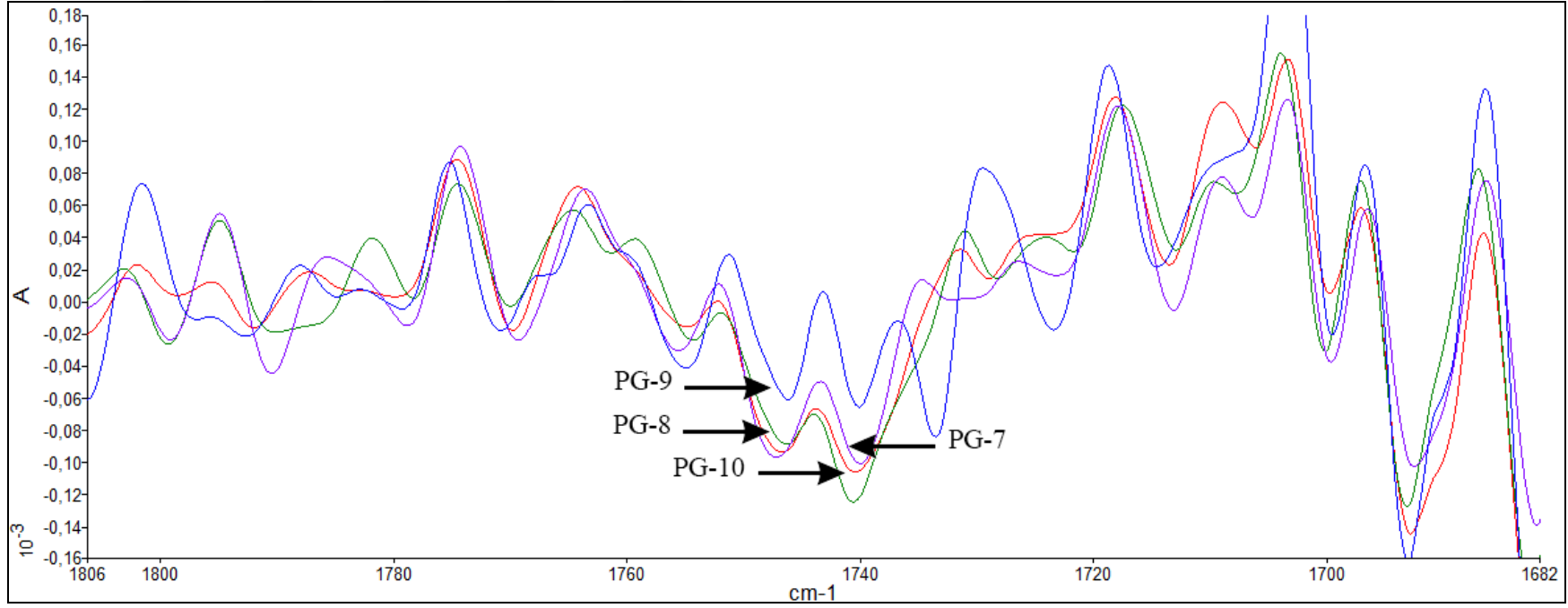
S. vomeracea bitkilerinin yaprak dokularından alınan FTIR spektrumunda 2917-2921 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri kontrol grubuna oranla BAN, COW, JAS, CHI-10 içeren besiyerlerinin tamamında düşüş gösterdi. En yüksek frekans değeri PG-20 besiyerinde gözlenirken en düşük frekans değeri PG-18 besiyerinden elde edildi (Tablo 3.28.). Bu frekansa ait absorptans değerlerinin ise CHI-10 uygulamasıyla kontrole oranla azaldığı bulundu. En yüksek absorptans değeri PG-33, en düşük değer ise PG-15 besiyerinden kaydedildi. Sadece PG-8 besiyerinden alınan bitkiler pozitif absorptans değeri verdi ve kontrolden istatistiki olarak farklı bulundu (Tablo 3.29.).

2848-2850 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri kontrol grubuna oranla BAN, COW, IAA, JAS ve CHI-10 içeren besiyerlerinin tamamında düşüş gösterdi. En yüksek değerlere ise CHI-1 uygulaması sonucunda ulaşıldı. En yüksek frekans değeri PG-20 besiyerinden kaydedilirken en düşük frekans değeri IAA içeren tüm besiyerleri ve PG-31 besiyerinden hesaplandı (Tablo 3.28.). Bu frekansa ait absorptans değerleri tüm CHI-10 konsantrasyonlarında kontrole oranla azaldı. En yüksek ve en düşük absorptans değerleri 2917-2921 cm^{-1} bandından elde edilen verilerle aynıdır. Buna karşın kontrole uygulamalar arasında istatistiki fark bulunmadı (Tablo 3.29.). Farklı besiyerlerinin etkisiyle 2917-2921 ve 2848-2850 cm^{-1} bantlarında görülen absorptans değişimlerini yansıtan örnek spektrum Şekil 3.23.'de verilmektedir.



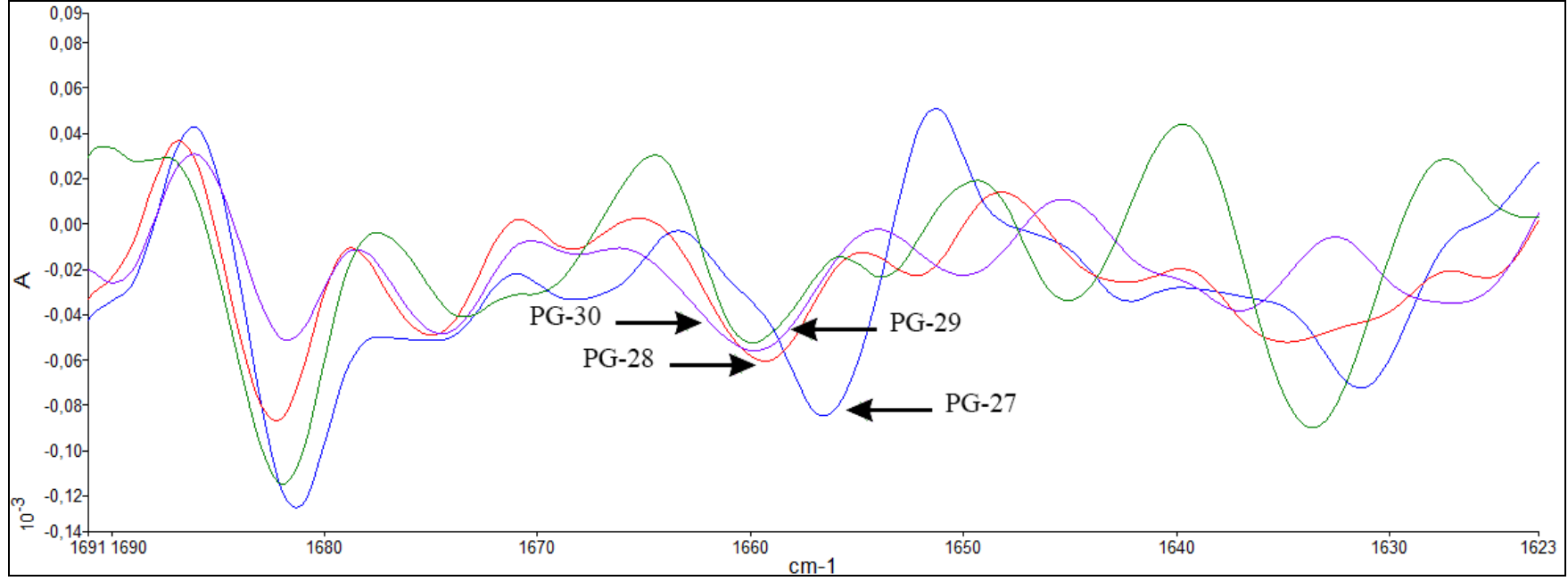
Şekil 3.23. Farklı besiyerlerinde yetiştirilmiş *S. vomeracea* bitkilerinin yaprak dokularına ait ikincil türev FTIR spektrumları (2961-2818 cm⁻¹ frekans aralığında)

1736-1740 cm^{-1} bandındaki ölçülen en düşük frekans değerli kontrol grubundan elde edildi. Denenen tüm uygulamalar bu banttaki ortalama frekans değerini artırdı. En yüksek değere PG-16 besiyerinde ulaşılırken BAP ve IAA uygulamalarının diğer uygulamalara kıyasla genel olarak frekans değerlerini daha fazla yükselttikleri gözlemlendi. Bunun bir sonucu olarak tüm BAP ve IAA uygulamaları kontrolden istatistiki olarak farklı bulundu (Tablo 3.28.). Uygulamaların tamamı bu frekansa ait absorptans değerlerini kontrole oranla azalttı. En yüksek absorptans değeri kontrol grubunda bulunurken en düşük değer PG-25 besiyerinden elde edildi. PG-24 hariç JAS uygulamalarının tamamı ve COW uygulamalarının PG-4 hariç tamamı genel olarak absorptans değerini istatistiki olarak önemli ölçüde düşürdü (Tablo 3.29.). Farklı besiyerlerinin etkisiyle 1736-1740 cm^{-1} bandında görülen absorptans değişimlerini yansıtan örnek spektrum Şekil 3.24.'de verilmektedir.



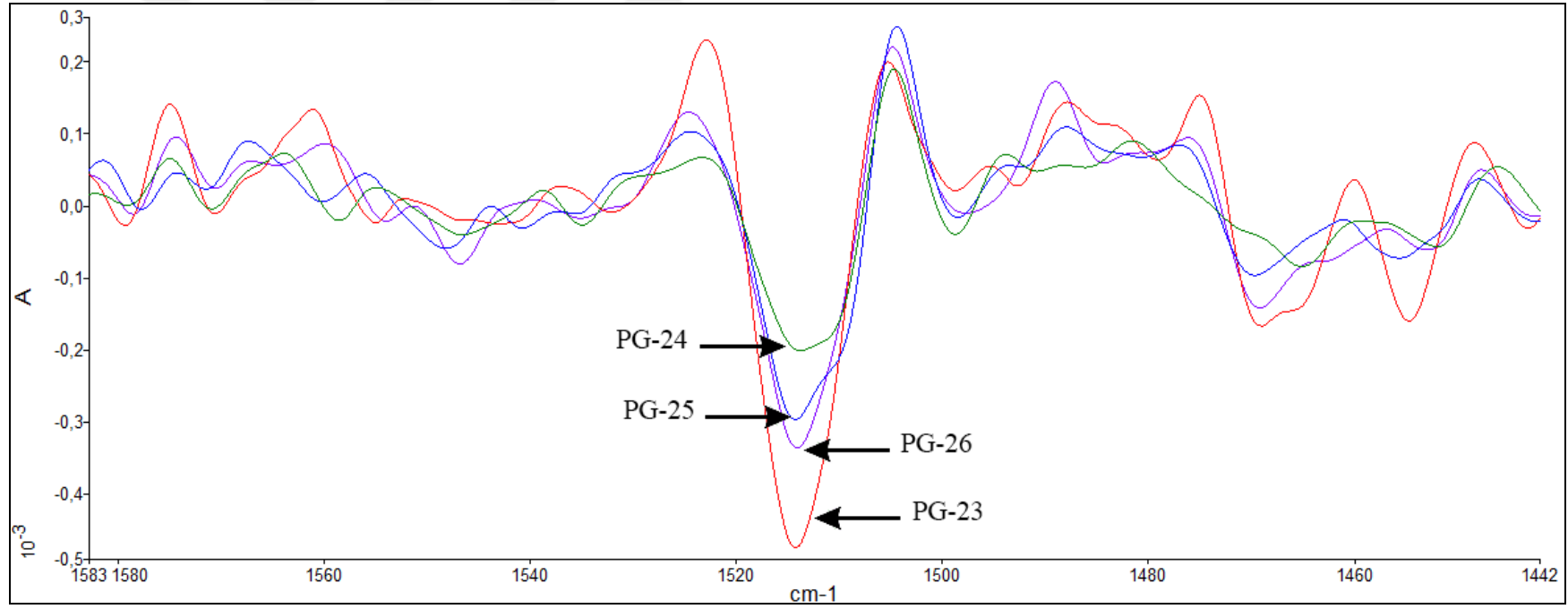
Şekil 3.24. Farklı besiyerlerinde yetiştirilmiş *S. vomeracea* bitkilerinin yaprak dokularına ait ikincil türev FTIR spektrumları (1806-1682 cm^{-1} frekans aralığında)

1653-1657 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri tüm BAP, KIN, IAA, IBA, JAS ve CHI-1 uygulamaları sonucunda kontrole oranla azaldı. En yüksek frekans değeri PG-4 besiyerinde gözlenirken en düşük frekans değeri PG-15 besiyerinden elde edildi. Tüm uygulamalar arasında kontrol grubu ile arasında istatistiki fark bulunan tek uygulama PG-15 besiyeri olarak bulundu (Tablo 3.28.). Bu frekansa ait absorbands değerleri BAN, KIN ve CHI-10 uygulamalarının tümünde kontrole oranla arttı. En yüksek absorbands değeri PG-24, en düşük değer ise PG-26 besiyerinden kaydedildi. Buna karşın düzenli olarak düşük değerler veren uygulamalar BAN ve CHI-10 oldu. Üç BAN uygulamasının 2 tanesi kontrolden istatistiki olarak farklı bulundu (Tablo 3.29.). Farklı besiyerlerinin etkisiyle 1653-1657 cm^{-1} bandında görülen absorbands değişimlerini yansıtan örnek spektrum Şekil 3.25.'de verilmektedir.



Şekil 3.25. Farklı besiyerlerinde yetiştirilmiş *S. vomeracea* bitkilerinin yaprak dokularına ait ikincil türev FTIR spektrumları ($1691\text{-}1623\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında)

1510-1515 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri kontrol grubuna oranla BAN, BAP, KIN, IAA, JAS içeren besiyerlerinin tamamında düşüş gösterdi. En yüksek değerlere ise COW uygulaması sonucunda ulaşıldı. Buna karşın PG-6 besiyerinden elde edilen verilerde bu bant gözlenmedi. En yüksek frekans değeri PG-20 besiyerinden kaydedilirken en düşük frekans değeri PG-3 besiyerinden ölçüldü. BAN uygulamasından elde edilen tüm değerler istatistiki olarak kontrolden farklı bulundu (Tablo 3.28.). Bu frekansa ait absorbands değerleri neredeyse tüm uygulamalarda kontrole oranla azaldı. En yüksek absorbands değeri PG-4 besiyerinden elde edilirken en düşük değer PG-3 besiyerinde bulundu. BAN uygulamalarının kontrol değerini 6-10 kat arasında azalttığı görüldü. Tüm BAN uygulamaları ile kontrol grubundan elde edilen sonuçlar arasında istatistiki fark bulundu (Tablo 3.29.). Farklı besiyerlerinin etkisiyle 1510-1515 cm^{-1} bandında görülen absorbands değişimlerini yansıtan örnek spektrum Şekil 3.26.'de verilmektedir.



Şekil 3.26. Farklı besiyerlerine yetiştirilmiş *S. vomeracea* bitkilerinin yaprak dokularına ait ikincil türev FTIR spektrumları (1583-1442 cm^{-1} frekans aralığında)

1410-1420 cm^{-1} bandında frekans değerleri COW, BAP, IAA, JAS ve CHI-10 uygulamalarının tamamında kontrole oranla azaldı. En yüksek değere PG-27 besiyerinde ulaşılrken en düşük değere PG-7 besiyerinden elde edildi. Yüksek konsantrasyonda BAN içeren besiyerlerinde frekans artışı gözlemlendi (Tablo 3.28.). Uygulamaların tamamının bu frekansa ait absorpsiyon değerlerini kontrole oranla azalttıkları bulundu. En yüksek absorpsiyon değeri PG-29 besiyerinde bulunurken en düşük değere PG-10 besiyerinden elde edildi. IAA uygulamalarının tamamı absorpsiyon değerleri kontrolden yüksek bulundu. CHI-1 ve CHI-10 uygulamaları ise artan konsantrasyonlarla birlikte absorpsiyon değerlerinde yükselişe sebep oldu. BAN uygulamalarında ise bu durum tam tersi olarak gözlemlendi (Tablo 3.29.).

1232-1245 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri IAA içeren PG-16 besiyeri hariç diğer tüm besiyerlerinde kontrole oranla azaldı. En yüksek frekans değeri PG-16 besiyerinde gözlemlenirken en düşük frekans değeri PG-27 besiyerinden elde edildi. COW uygulamalarından sonra bu bant gözlemlenmedi (Tablo 3.28.). Artan konsantrasyonda JAS içeren besiyerleri frekans kontrole oranla istatistik olarak önemli ölçüde azaldı. Bu frekansa ait absorpsiyon değerleri BAN, KIN ve CHI-10 uygulamalarının tümünde kontrole oranla arttı. En yüksek absorpsiyon değeri PG-12, en düşük değere ise PG-26 besiyerinden kaydedildi. Buna karşın BAP ve JAS uygulamaları düzenli olarak kontrolden düşük değerler verdi (Tablo 3.29.).

1200-1208 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri kontrol grubuna oranla BAP ve IBA içeren besiyerlerinin tamamında düşüş gösterdi. En yüksek değerlere ise artan konsantrasyonlardaki CHI-10 uygulamaları sonucunda ulaşıldı. En yüksek frekans değeri PG-33 besiyerinden kaydedilirken en düşük frekans değeri PG-29 besiyerinden ölçüldü. Tüm uygulamalardan elde edilen değerler ile kontrol değerinin arasında istatistik fark bulunmadı (Tablo 3.28.). Bu frekansa ait absorpsiyon değerleri IAA, IBA, CHI-1 ve CHI-10 uygulamalarında kontrolden yüksek bulundu. En yüksek absorpsiyon değeri PG-1 besiyerinden elde edilirken en düşük değere PG-24 besiyerinde bulundu. Uygulamalar ile kontrol grubundan elde edilen sonuçlar arasında istatistik fark bulunmadı (Tablo 3.29.)

873 cm^{-1} bandında frekans en yüksek değere PG-3 besiyerinde ulaşılrken en düşük değere PG-7 besiyerinden elde edildi. Tüm CHI-10 uygulamalarının frekans kontrole

oranla düşürdüğü gözlemlendi. KIN ve IAA uygulamalarında bu bant gözlenmedi. Yüksek konsantrasyonda BAN içeren besiyerlerinde frekans artışı gözlemlendi (Tablo 3.28.). BAN ve CHI-1 uygulamalarının tamamının bu frekansa ait absorban değerlerini kontrole oranla azalttığı bulundu. En yüksek absorban değeri PG-21 besiyerinde bulunurken en düşük değer PG-3 besiyerinden elde edildi (Tablo 3.29.).

812 cm⁻¹ bandındaki en yüksek frekans değeri PG-29 besiyerinde gözlenirken en düşük frekans değeri PG-3 besiyerinden elde edildi. KIN uygulamalarından sonra bu bant gözlenmedi. Artan konsantrasyonda IAA içeren besiyerleri frekansı kontrole oranla istatistiki olarak önemli ölçüde azaldı (Tablo 3.28.). Bu frekansa ait absorban değerleri BAN ve IAA uygulamalarının tümünde kontrol grubu değerinden istatistiki olarak farklı bulundu. IAA ve CHI-1 uygulamalarının tümü kontrole kıyasla absorban değerlerini artırdı. En yüksek absorban değeri PG-5, en düşük değer ise PG-3 besiyerinden kaydedildi (Tablo 3.29.).

Tablo 3.28. *S. vomeracea*'nin yaprak dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslar üzerine besiyerlerinin etkileri

	Ortalama Frekans (cm ⁻¹)									
	2920	2850	1739	1657	1515	1413	1235	1200	873	812
Kontrol	2921,15 ± 1,24	2851,12 ± 0,20	1736,45 ± 1,33	1660,18 ± 0,94	1515,21 ± 0,31	1416,13 ± 2,46	1238,16 ± 2,92	1202,76 ± 3,08	873,71 ± 1,38	813,57 ± 2,08
PG-1	2917,91 ± 0,11	2850,04 ± 0,04	1739,06 ± 1,77	1659,51 ± 0,54	1510,05 ± 0,12**	1413,79 ± 0,47	1232,77 ± 2,00	1199,39 ± 2,48	871,33 ± 3,37	811,93 ± 2,62
PG-2	2917,96 ± 0,30	2849,94 ± 0,09	1739,98 ± 0,57*	1660,68 ± 0,25	1510,02 ± 0,12**	1418,39 ± 0,65	1233,10 ± 2,92	1201,81 ± 1,47	876,00 ± 2,91	815,21 ± 3,32
PG-3	2917,75 ± 0,16	2849,95 ± 0,16	1740,28 ± 0,53	1658,61 ± 0,55	1509,92 ± 0,10**	1418,30 ± 0,19	1233,63 ± 2,75	1199,65 ± 2,08	877,94 ± 2,33	807,38 ± 1,27**
PG-4	2918,10 ± 1,00	2849,96 ± 0,30	1738,24 ± 0,24	1661,25 ± 0,27	1518,26 ± 0,14*	1412,32 ± 0,08	-	1201,83 ± 0,20	871,69 ± 0,13	-
PG-5	2918,62 ± 0,31	2850,29 ± 0,61	1737,62 ± 0,50	1659,94 ± 0,43	1517,93 ± 0,76	1415,51 ± 0,41	-	1201,78 ± 0,38	873,14 ± 0,14	810,61 ± 0,56
PG-6	2917,80 ± 1,38	2849,96 ± 2,80	1737,26 ± 1,10	1659,36 ± 0,70	-	1414,88 ± 0,88	-	1205,39 ± 1,19	-	-
PG-7	2921,20 ± 0,97	2850,91 ± 0,24	1740,61 ± 0,29*	1658,30 ± 1,08	1514,82 ± 0,53	1407,81 ± 1,47**	1231,49 ± 2,26*	1202,84 ± 3,42	869,42 ± 0,35	812,40 ± 1,37
PG-8	2920,36 ± 1,26	2850,91 ± 0,19	1740,25 ± 0,31*	1659,89 ± 0,15	1513,46 ± 0,12	1414,87 ± 0,17	1235,61 ± 1,34	1200,32 ± 3,52	872,21 ± 0,62	813,82 ± 0,53
PG-9	2922,34 ± 0,21	2851,43 ± 0,21	1741,16 ± 0,82**	1657,51 ± 2,08	1514,16 ± 0,49	1414,21 ± 0,35	1232,97 ± 4,35	1202,40 ± 2,15	871,94 ± 2,48	808,63 ± 2,31*
PG-10	2917,87 ± 0,23	2850,06 ± 0,11	1740,05 ± 0,24*	1656,60 ± 0,72	1512,48 ± 0,65	1414,41 ± 0,85	1235,20 ± 0,44	1199,13 ± 0,49	875,45 ± 0,27	-
PG-11	2921,73 ± 0,46	2851,12 ± 0,17	1739,20 ± 0,19	1659,04 ± 1,65	1514,99 ± 0,25	1414,61 ± 1,36	1235,01 ± 0,97	1200,28 ± 1,21	-	-
PG-12	2922,91 ± 0,84	2851,08 ± 0,11	1740,47 ± 1,25*	1657,82 ± 1,57	1514,41 ± 0,49	1413,23 ± 3,90	1231,92 ± 3,00	1205,39 ± 1,37	-	-
PG-13	2920,34 ± 1,88	2850,88 ± 0,36	1738,89 ± 1,66	1659,15 ± 0,83	1514,40 ± 0,66	1416,33 ± 2,44	1234,43 ± 2,56	1202,95 ± 2,94	-	-
PG-14	2921,12 ± 1,82	2851,09 ± 0,35	1739,95 ± 0,94	1659,35 ± 0,61	1513,75 ± 0,34	1415,75 ± 1,35	1230,44 ± 2,20*	1202,27 ± 3,41	-	-
PG-15	2917,78 ± 0,02	2849,89 ± 0,05	1740,03 ± 0,03*	1656,16 ± 0,05*	1513,96 ± 0,26	1413,67 ± 0,16	1235,16 ± 0,06	1202,00 ± 0,13	-	815,82 ± 0,02
PG-16	2920,97 ± 0,92	2849,89 ± 0,06	1741,35 ± 0,51**	1659,64 ± 0,68	1514,40 ± 0,17	1415,07 ± 0,88	1240,53 ± 1,89	1200,63 ± 1,49	-	814,43 ± 3,30
PG-17	2922,71 ± 0,51	2849,89 ± 0,07	1740,84 ± 1,02*	1657,50 ± 1,12	1514,91 ± 0,06	1415,81 ± 1,12	1233,33 ± 2,02	1202,09 ± 0,06	-	808,79 ± 0,51*
PG-18	2917,71 ± 0,06	2849,89 ± 0,08	1740,40 ± 0,78*	1656,94 ± 0,77	1513,21 ± 0,29	1411,59 ± 1,38	1234,25 ± 0,12	1203,45 ± 0,70	-	807,99 ± 0,35**

Tablo 3.28. (Devam) *S. vomeracea*'nin yaprak dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslar üzerine besiyerlerinin etkileri

	Ortalama Frekans (cm ⁻¹)									
	2920	2850	1739	1657	1515	1413	1235	1200	873	812
PG-19	2921,82 ± 0,68	2850,65 ± 0,16	1738,26 ± 2,41	1658,92 ± 0,70	1514,26 ± 0,09	1415,23 ± 1,44	1236,00 ± 3,69	1201,09 ± 3,05	876,26 ± 5,42	811,67 ± 0,30
PG-20	2923,44 ± 0,30	2851,98 ± 0,03	1740,79 ± 1,23*	1658,71 ± 1,52	1518,31 ± 0,78*	1413,53 ± 1,43	1231,67 ± 1,70	1199,69 ± 5,22	870,98 ± 0,89	811,88 ± 0,91
PG-21	2919,37 ± 1,09	2850,47 ± 0,22	1739,83 ± 0,38	1656,95 ± 1,53	1514,32 ± 0,22	1416,47 ± 1,24	1234,35 ± 2,09	1200,01 ± 1,05	873,41 ± 0,59	813,76 ± 0,88
PG-22	2919,78 ± 1,16	2850,51 ± 0,33	1737,70 ± 2,50	1658,08 ± 1,60	1514,38 ± 0,43	1416,00 ± 1,72	1236,80 ± 2,38	1201,38 ± 2,46	872,96 ± 2,49	811,83 ± 0,66
PG-23	2918,01 ± 0,12	2850,16 ± 0,36	1738,54 ± 0,18	1658,79 ± 1,13	1514,41 ± 0,33	1414,90 ± 0,09	1237,12 ± 3,99	1200,14 ± 3,20	873,23 ± 2,66	811,92 ± 0,20
PG-24	2918,39 ± 0,42	2850,58 ± 0,24	1737,49 ± 0,25	1657,93 ± 0,41	1515,03 ± 0,19	1412,91 ± 0,81	1234,91 ± 0,88	1199,97 ± 0,79	873,19 ± 0,10	814,19 ± 0,60
PG-25	2917,90 ± 0,08	2850,80 ± 1,18	1736,97 ± 0,50	1658,01 ± 1,10	1514,08 ± 0,25	1415,56 ± 2,48	1231,74 ± 3,18	1202,43 ± 3,24	873,97 ± 0,18	811,44 ± 0,30
PG-26	2918,75 ± 0,97	2850,15 ± 0,40	1737,08 ± 0,18	1656,61 ± 0,79	1514,45 ± 0,49	1413,24 ± 0,99	1229,67 ± 0,76*	1204,68 ± 0,57	-	811,44 ± 0,50
PG-27	2920,44 ± 2,39	2850,82 ± 0,74	1737,39 ± 0,67	1659,11 ± 2,58	1514,93 ± 2,06	1418,93 ± 1,93	1229,13 ± 1,30**	1204,90 ± 1,17	871,49 ± 1,32	812,77 ± 1,41
PG-28	2921,40 ± 3,12	2851,18 ± 0,93	1740,98 ± 0,44*	1658,10 ± 0,62	1516,08 ± 2,26	1415,83 ± 2,57	1234,08 ± 1,22	1198,11 ± 2,29	871,02 ± 2,28	812,25 ± 1,05
PG-29	2919,81 ± 1,38	2851,21 ± 0,10	1740,27 ± 0,04*	1659,49 ± 0,29	1513,36 ± 0,19	1412,47 ± 0,29	1232,70 ± 0,40	1198,08 ± 2,51	871,93 ± 3,70	817,12 ± 0,96
PG-30	2921,80 ± 1,52	2851,22 ± 0,37	1737,90 ± 2,60	1658,48 ± 1,58	1516,99 ± 2,02	1413,45 ± 2,54	1236,48 ± 1,40	1200,62 ± 0,86	875,70 ± 0,89	816,77 ± 0,75
PG-31	2917,78 ± 0,15	2849,89 ± 0,13	1739,60 ± 0,06	1657,25 ± 1,56	1512,00 ± 1,86*	1414,57 ± 3,79	1236,96 ± 1,27	1200,37 ± 0,76	869,47 ± 1,83	810,25 ± 0,73
PG-32	2919,04 ± 1,31	2850,70 ± 0,59	1738,50 ± 1,36	1661,13 ± 1,68	1516,13 ± 2,17	1413,72 ± 0,68	1233,48 ± 0,14	1200,31 ± 3,06	872,20 ± 0,56	816,42 ± 0,78
PG-33	2919,23 ± 0,20	2850,86 ± 0,10	1741,06 ± 0,20**	1659,21 ± 0,20	1514,89 ± 0,10	1410,86 ± 0,50	1233,34 ± 0,30	1206,66 ± 0,60	872,20 ± 0,05	812,53 ± 0,06
PG-34	2919,00 ± 0,21	2850,69 ± 0,22	1739,41 ± 1,65	1659,11 ± 0,11	1515,12 ± 0,54	1412,53 ± 1,72	1234,47 ± 1,13	1205,74 ± 0,92	872,36 ± 0,39	812,53 ± 0,40

Kontrol grubu ve uygulamalardan elde edilen veriler arasındaki istatistiksel önem derecesi $p < 0,05^$ ve $p < 0,001^{**}$ olarak gösterilmiştir

Tablo 3.29. *S. vomeracea*'nin yaprak dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslara ait absorpsiyonlar üzerine besiyerlerinin etkileri

	Ortalama Absorbans (10^{-3})									
	2920	2850	1739	1657	1515	1413	1235	1200	873	812
Kontrol	-0,152 ± 0,040	-0,215 ± 0,005	-0,037 ± 0,012	-0,050 ± 0,010	-0,144 ± 0,015	-0,095 ± 0,018	-0,097 ± 0,024	-0,076 ± 0,010	-0,027 ± 0,08	-0,121 ± 0,019
PG-1	-0,161 ± 0,029	-0,259 ± 0,067	-0,197 ± 0,022**	-0,130 ± 0,004*	-1,247 ± 0,161**	-0,054 ± 0,010	-0,146 ± 0,021	0,026 ± 0,011**	-0,048 ± 0,014	-0,042 ± 0,007**
PG-2	-0,232 ± 0,069	-0,339 ± 0,089	-0,124 ± 0,033	-0,124 ± 0,037*	-0,809 ± 0,093**	-0,115 ± 0,029	-0,154 ± 0,018	-0,027 ± 0,014**	-0,040 ± 0,009	-0,049 ± 0,012**
PG-3	-0,211 ± 0,039	-0,322 ± 0,054	-0,149 ± 0,012*	-0,097 ± 0,022	-1,469 ± 0,265**	-0,191 ± 0,051*	-0,230 ± 0,024**	-0,050 ± 0,012	-0,101 ± 0,023**	-0,182 ± 0,023*
PG-4	-0,114 ± 0,010	-0,181 ± 0,015	-0,096 ± 0,002	-0,036 ± 0,003	-0,069 ± 0,010	-0,084 ± 0,002	-	-0,097 ± 0,000	-0,092 ± 0,000**	-
PG-5	-0,210 ± 0,020	-0,320 ± 0,040	-0,163 ± 0,020**	-0,088 ± 0,007	-0,211 ± 0,030	-0,082 ± 0,001	-	-0,024 ± 0,003**	-0,019 ± 0,003	-0,001 ± 0,000**
PG-6	-0,250 ± 0,009	-0,348 ± 0,017	-0,214 ± 0,020**	-0,053 ± 0,007	-	-0,120 ± 0,007	-	-0,056 ± 0,004	-	-
PG-7	-0,137 ± 0,038	-0,199 ± 0,064	-0,090 ± 0,016	-0,047 ± 0,008	-0,227 ± 0,063	-0,098 ± 0,028	-0,086 ± 0,016	-0,045 ± 0,008	-0,003 ± 0,002	-0,058 ± 0,014**
PG-8	0,143 ± 0,032**	-0,227 ± 0,064	-0,118 ± 0,012	-0,083 ± 0,014	-0,303 ± 0,023	-0,100 ± 0,003	-0,067 ± 0,004	0,020 ± 0,002**	-0,039 ± 0,014	-0,034 ± 0,001**
PG-9	-0,163 ± 0,018	-0,229 ± 0,009	-0,078 ± 0,017	-0,108 ± 0,019	-0,187 ± 0,032	-0,100 ± 0,027	-0,089 ± 0,013	-0,064 ± 0,014	-0,049 ± 0,008	-0,108 ± 0,027
PG-10	-0,136 ± 0,035	-0,210 ± 0,039	-0,103 ± 0,020	-0,130 ± 0,014*	-0,224 ± 0,048	-0,196 ± 0,021*	-0,072 ± 0,023	-0,010 ± 0,002**	-0,031 ± 0,006	-
PG-11	-0,175 ± 0,036	-0,259 ± 0,064	-0,088 ± 0,021	-0,082 ± 0,021	-0,191 ± 0,050	-0,099 ± 0,022	-0,080 ± 0,014	-0,034 ± 0,015*	-	-
PG-12	-0,149 ± 0,029	-0,190 ± 0,041	-0,110 ± 0,030	-0,153 ± 0,046**	-0,326 ± 0,058	-0,189 ± 0,069*	-0,012 ± 0,060	-0,070 ± 0,012	-	-
PG-13	-0,177 ± 0,042	-0,258 ± 0,045	-0,076 ± 0,018	-0,054 ± 0,006	-0,126 ± 0,016	-0,091 ± 0,005	-0,059 ± 0,009	-0,041 ± 0,003	-	-
PG-14	-0,230 ± 0,064	-0,352 ± 0,086	-0,163 ± 0,045**	-0,139 ± 0,024*	-0,346 ± 0,056	-0,192 ± 0,050*	-0,130 ± 0,012	-0,045 ± 0,010	-	-
PG-15	-0,251 ± 0,000	-0,367 ± 0,000	-0,249 ± 0,000**	-0,043 ± 0,000	-0,896 ± 0,016**	-0,066 ± 0,006	-0,154 ± 0,004	-0,012 ± 0,002**	-	-0,039 ± 0,001**
PG-16	-0,147 ± 0,025	-0,220 ± 0,032	-0,085 ± 0,023	-0,070 ± 0,010	-0,414 ± 0,027*	-0,063 ± 0,009	-0,113 ± 0,017	-0,050 ± 0,010	-	-0,069 ± 0,025*
PG-17	-0,138 ± 0,020	-0,180 ± 0,038	-0,106 ± 0,028	-0,040 ± 0,002	-0,303 ± 0,008	-0,081 ± 0,003	-0,114 ± 0,019	-0,014 ± 0,000**	-	-0,052 ± 0,013**
PG-18	-0,198 ± 0,023	-0,304 ± 0,034	-0,107 ± 0,020	-0,079 ± 0,005	-0,473 ± 0,037**	-0,088 ± 0,000	-0,091 ± 0,000	-0,057 ± 0,012	-	-0,016 ± 0,007**

Tablo 3.29. (Devam) *S. vomeracea*'nin yaprak dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslara ait absorpsiyonlar üzerine besiyerlerinin etkileri

	Absorbans (10^{-3})									
	2920	2850	1739	1657	1515	1413	1235	1200	873	812
PG-19	-0,147 ± 0,036	-0,219 ± 0,062	-0,107 ± 0,027	-0,092 ± 0,030	-0,336 ± 0,035	-0,112 ± 0,023	-0,148 ± 0,033	-0,044 ± 0,015	-0,059 ± 0,012	-0,094 ± 0,000
PG-20	-0,148 ± 0,030	-0,180 ± 0,052	-0,088 ± 0,006	-0,055 ± 0,013	-0,146 ± 0,007	-0,073 ± 0,009	-0,090 ± 0,019	-0,043 ± 0,006	-0,076 ± 0,024*	-0,135 ± 0,034
PG-21	-0,200 ± 0,039	-0,309 ± 0,063	-0,173 ± 0,033**	-0,069 ± 0,011	-0,521 ± 0,108**	-0,167 ± 0,008	-0,160 ± 0,014	-0,024 ± 0,010**	0,105 ± 0,031**	-0,017 ± 0,012**
PG-22	-0,142 ± 0,016	-0,219 ± 0,024	-0,075 ± 0,024	-0,037 ± 0,015	-0,210 ± 0,043	-0,073 ± 0,012	-0,095 ± 0,011	-0,046 ± 0,015	-0,021 ± 0,005	-0,016 ± 0,008**
PG-23	-0,133 ± 0,019	-0,223 ± 0,033	-0,154 ± 0,058**	-0,086 ± 0,016	-0,472 ± 0,059**	-0,057 ± 0,004	-0,120 ± 0,023	-0,080 ± 0,008	-0,065 ± 0,023	-0,158 ± 0,000
PG-24	-0,120 ± 0,036	-0,195 ± 0,062	-0,101 ± 0,000	-0,033 ± 0,016	-0,150 ± 0,038	-0,052 ± 0,018	-0,106 ± 0,023	-0,119 ± 0,002**	0,016 ± 0,000	-0,034 ± 0,000**
PG-25	-0,219 ± 0,069	-0,283 ± 0,091	-0,289 ± 0,085**	-0,059 ± 0,010	-0,309 ± 0,032	-0,129 ± 0,036	-0,206 ± 0,038**	-0,054 ± 0,008	-0,052 ± 0,010	-0,113 ± 0,000
PG-26	-0,114 ± 0,005	-0,138 ± 0,017	-0,230 ± 0,018**	-0,161 ± 0,066**	-0,338 ± 0,060	-0,182 ± 0,044*	-0,259 ± 0,050**	-0,078 ± 0,018	-	-0,040 ± 0,000**
PG-27	-0,169 ± 0,033	-0,223 ± 0,044	-0,081 ± 0,025	-0,086 ± 0,005	-0,276 ± 0,074	-0,098 ± 0,036	-0,093 ± 0,030	-0,063 ± 0,027	-0,051 ± 0,017	-0,082 ± 0,023
PG-28	-0,158 ± 0,032	-0,198 ± 0,047	-0,090 ± 0,025	-0,061 ± 0,007	-0,160 ± 0,050	-0,074 ± 0,027	-0,092 ± 0,017	-0,034 ± 0,011*	-0,047 ± 0,013	-0,061 ± 0,008**
PG-29	-0,127 ± 0,025	-0,155 ± 0,027	-0,072 ± 0,008	-0,060 ± 0,003	-0,153 ± 0,031	-0,040 ± 0,007	-0,080 ± 0,019	-0,010 ± 0,003**	-0,042 ± 0,009	-0,093 ± 0,008
PG-30	-0,108 ± 0,012	-0,171 ± 0,027	-0,092 ± 0,026	-0,040 ± 0,014	-0,210 ± 0,044	-0,069 ± 0,035	-0,136 ± 0,006	-0,072 ± 0,016	-0,048 ± 0,015	-0,050 ± 0,021**
PG-31	-0,148 ± 0,008	-0,211 ± 0,033	-0,072 ± 0,003	-0,118 ± 0,038*	-0,282 ± 0,065	-0,138 ± 0,032	-0,068 ± 0,005	0,017 ± 0,010**	-0,045 ± 0,017	-0,067 ± 0,022*
PG-32	-0,115 ± 0,005	-0,148 ± 0,014	-0,115 ± 0,032	-0,057 ± 0,012	-0,202 ± 0,043	-0,045 ± 0,006	-0,100 ± 0,024	-0,056 ± 0,012	-0,081 ± 0,018*	-0,128 ± 0,038
PG-33	-0,103 ± 0,010	-0,131 ± 0,020	-0,070 ± 0,009	-0,087 ± 0,007	-0,107 ± 0,010	-0,061 ± 0,001	-0,042 ± 0,002	-0,047 ± 0,002	-0,018 ± 0,002	-0,033 ± 0,002**
PG-34	-0,125 ± 0,021	-0,173 ± 0,043	-0,083 ± 0,012	-0,073 ± 0,014	-0,146 ± 0,044	-0,056 ± 0,006	-0,044 ± 0,002	-0,047 ± 0,000	-0,020 ± 0,002	-0,033 ± 0,000**

*Kontrol grubu ve uygulamalardan elde edilen veriler arasındaki istatistiksel önem derecesi $p < 0,05$ * ve $p < 0,001$ ** olarak gösterilmiştir

3.8.2. Kök spektrumlarına ait bulgular

S. vomeracea bitkilerinin kök dokularından alınan FTIR spektrumunda 2917-2921 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri kontrol grubuna oranla BAN, COW, KIN ve JAS içeren besiyerlerinin tamamında düşüş gösterdi. Buna karşın sadece BAN ve JAS uygulamalarından elde edilen frekans değerleri kontrolden istatistiki olarak farklı bulundu. En yüksek frekans değeri PG-29 besiyerinde gözlenirken en düşük frekans değeri PG-14 besiyerinden elde edildi (Tablo 3.30.). Bu frekansa ait absorban değerlerinin ise artan BAN konsantrasyonlarıyla birlikte kontrole oranla kademeli olarak arttığı görüldü. En yüksek absorban değeri PG-24, en düşük değer ise PG-5 besiyerinden kaydedildi (Tablo 3.31.).

2848-2850 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri kontrol grubuna oranla BAN, COW, JAS ve CHI-10 içeren besiyerlerinin tamamında düşüş gösterdi. En yüksek frekans değeri BAP içeren PG-10 besiyerinden kaydedilirken en düşük frekans değeri KIN içeren PG-14 besiyerinden hesaplandı (Tablo 3.30.). Bu frekansa ait absorban değerlerinin konsantrasyonla doğru orantılı olarak COW içeren tüm besiyerlerinde kontrole oranla arttığı görüldü. En yüksek ve en düşük absorban değerleri sırasıyla PG-24 ve PG-23 besiyerlerinden kaydedildi (Tablo 3.31.).

1680-1682 cm^{-1} bandındaki ölçülen frekans değerlerinin tamamı birbirine çok yakındır. Buna karşın BAN, COW, KIN, IAA, IBA ve CHI-1 uygulamaları istatistiki olarak önemli olmasa dahi frekans değerlerinde kontrole oranla sınırlı bir artışa sebep oldu. En yüksek değere PG-6 besiyerinde ulaşılırken en düşük değer PG-34 besiyerinden elde edildi (Tablo 3.30.). İncelenen frekansa ait en yüksek absorban değeri PG-26 besiyerinde bulunurken en düşük değer PG-12 besiyerinden elde edildi. JAS uygulamalarının konsantrasyona bağımlı olarak absorbanı kontrole oranla yükselttikleri bulundu. Sadece PG-12 besiyerinden elde edilen absorban değeri kontrolden istatistiki olarak farklıdır (Tablo 3.31.).

1635-1640 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri artan konsantrasyona bağlı olarak BAP uygulamalarıyla azaldığı fakat IAA uygulamalarıyla kontrole oranla arttığı bulundu. En yüksek frekans değeri PG-6 besiyerinde gözlenirken en düşük frekans değeri PG-11 besiyerinden elde edildi. Tüm uygulamalar arasında kontrol grubu ile arasında istatistiki fark bulunan tek uygulama PG-11 besiyeri olarak bulundu (Tablo 3.30.).

PG-23 besiyerinde bu frekans gözlenmedi. Absorbans değerleri CHI-1 uygulamasında konsantrasyonla ters orantılı olarak kontrole kıyasla azaldı. En yüksek absorbans değeri PG-14, en düşük değer ise PG-25 besiyerinden kaydedildi. PG-23 besiyerinden veri alınamamasına rağmen diğer JAS uygulamaları düzenli olarak kontrole kıyasla düşük değerler verdi (Tablo 3.31.).

1510-1515 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri kontrol grubuna oranla BAN, COW, BAP, IAA, IBA ve JAS içeren besiyerlerinin tamamında düşüş gösterdi. En yüksek değerlere ise CHI-10 uygulaması sonucunda ulaşıldı. Buna karşın PG-6 besiyerinden elde edilen verilerde bu bant gözlenmedi. En yüksek frekans değeri PG-32 besiyerinden kaydedilirken en düşük frekans değeri PG-8 besiyerinden ölçüldü. BAN ve IAA uygulamalarından elde edilen tüm değerler istatistiki olarak kontrolden farklıdır (Tablo 3.30.). Bu frekansa ait absorbans değerleri tüm BAN, COW, BAP ve IAA uygulamalarında kontrole oranla azaldı. En yüksek absorbans değeri PG-8 besiyerinden elde edilirken en düşük değer PG-23 besiyerinde bulundu (Tablo 3.31.).

1380-1385 cm^{-1} bandında frekans değerleri IAA uygulamalarının tamamında kontrole oranla azaldı. En yüksek değere PG-18 besiyerinde ulaşılırken en düşük değer PG-25 besiyerinden elde edildi. Besiyerleri ve kontrol grubundan alınan hiçbir frekans değeri arasında istatistiki fark yoktur (Tablo 3.30.). KIN, IBA ve CHI-10 uygulamalarının tamamı bu frekansa ait absorbans değerlerini kontrole oranla artırdı. En yüksek absorbans değeri PG-15 besiyerinde bulunurken en düşük değer PG-1 besiyerinden elde edildi. COW uygulamaları konsantrasyonla orantılı olarak absorbans değerlerini kontrole kıyasla artırdığı bulundu (Tablo 3.31.).

1075-1080 cm^{-1} bandındaki frekans değerleri tüm COW uygulamaları neticesinde kontrole oranla azaldı. En yüksek frekans değeri PG-14 besiyerinde gözlenirken en düşük frekans değeri PG-18 besiyerinden elde edildi. Besiyerleri ve kontrol grubundan alınan hiçbir frekans değeri arasında istatistiki fark bulunmadı (Tablo 3.30.). Artan konsantrasyonda JAS içeren besiyerleri frekansı kontrole oranla istatistiki olarak önemli ölçüde azalttığı görüldü. Bu frekansa ait absorbans değerleri konsantrasyonla ters orantılı olarak BAN ve COW uygulamaları sonucunda azaldı. IAA uygulamalarında ise absorbans değeri konsantrasyonla doğru orantılı olarak kontrole kıyasla arttı. Tüm BAP ve IBA uygulamaları neticesinde absorbans değerleri

kontrole oranla yükseldi. En yüksek absorbands değeri PG-14, en düşük değeri ise PG-31 besiyerinden kaydedildi (Tablo 3.31.).

873 cm^{-1} bandındaki frekans değeri kontrol grubuna oranla sadece BAN içeren besiyerlerinin tamamında artış gösterdi. En yüksek değerlere ise artan konsantrasyonlardaki BAN uygulamaları sonucunda ulaşıldı. En yüksek frekans değeri PG-3 besiyerinden kaydedilirken en düşük frekans değeri PG-30 besiyerinden ölçüldü. PG-32 besiyerinden alınan sonuçlardan bu frekansa ait değeri elde edilemedi (Tablo 3.30.). Bu frekansa ait absorbands değeri IAA, IBA, CHI-1 ve CHI-10 uygulamalarında kontrolden yüksek bulundu. En yüksek absorbands değeri PG-12 besiyerinden elde edilirken en düşük değeri PG-20 besiyerinde bulundu. KIN uygulamalarından elde edilen sonuçlardan üç tanesinin pozitif absorbands verdiği bulundu (Tablo 3.31.).

812 cm^{-1} bandında frekans en yüksek değere PG-31 besiyerinde ulaşılırken en düşük değeri PG-10 besiyerinden elde edildi. Sadece COW ve BAP uygulamalarında kontrole oranla düşük frekansa rastlandı. CHI-1 ve CHI-10 uygulamaları konsantrasyonla ters orantılı olarak frekans değerlerinde düşüşe sebep oldu. BAN uygulamalarından elde edilen sonuçların tümü kontrolden istatistiki olarak farklı bulundu (Tablo 3.30.). BAN uygulamalarının tamamı bu frekansa ait absorbands değerlerini kontrole oranla artırdı. En yüksek absorbands değeri PG-5 besiyerinde bulunurken en düşük değeri PG-21 besiyerinden elde edildi (Tablo 3.31.).

Tablo 3.30. *S. vomeracea*'nin kök dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslar üzerine besiyerlerinin etkileri

	Ortalama Frekans (cm ⁻¹)								
	2920	2850	1681	1637	1510	1384	1079	873	812
Kontrol	2922,88 ± 0,30	2851,65 ± 0,19	1681,66 ± 0,28	1636,69 ± 0,67	1515,05 ± 0,06	1383,81 ± 0,55	1078,80 ± 0,55	877,72 ± 0,85	808,89 ± 1,86
PG-1	2918,05 ± 0,16**	2851,13 ± 0,52	1681,86 ± 0,27	1637,07 ± 0,50	1510,23 ± 0,13**	1384,50 ± 0,34	1078,39 ± 1,78	871,88 ± 1,94*	815,24 ± 3,24*
PG-2	2917,92 ± 0,20**	2850,61 ± 0,20	1682,21 ± 0,57	1637,91 ± 0,33	1510,37 ± 0,22**	1383,84 ± 0,55	1078,86 ± 0,62	875,13 ± 2,68	817,88 ± 1,25**
PG-3	2918,66 ± 0,58**	2851,08 ± 0,48	1681,83 ± 0,19	1636,20 ± 0,64	1511,86 ± 2,07**	1383,73 ± 1,31	1079,54 ± 0,54	881,16 ± 1,49	814,38 ± 2,73*
PG-4	2918,10 ± 1,00**	2849,96 ± 0,30**	1682,13 ± 0,12	1636,29 ± 0,09	1513,51 ± 0,10	1384,92 ± 0,92	1076,92 ± 0,70	871,69 ± 0,13*	-
PG-5	2918,62 ± 0,31**	2850,29 ± 0,61*	1682,10 ± 1,00	1633,99 ± 0,84	1510,03 ± 0,90**	1382,92 ± 0,81	1077,46 ± 0,45	873,14 ± 0,14	810,61 ± 0,56
PG-6	2920,53 ± 0,70	2850,83 ± 0,32	1682,73 ± 1,03	1639,42 ± 2,10	-	1383,72 ± 0,65	1077,59 ± 1,57	873,74 ± 0,51	814,50 ± 0,25*
PG-7	2922,49 ± 1,23	2851,70 ± 0,31	1681,94 ± 0,69	1638,20 ± 0,69	1510,16 ± 0,10**	1384,98 ± 0,38	1077,11 ± 0,57	875,39 ± 0,30	811,40 ± 0,70
PG-8	2920,99 ± 0,55	2851,02 ± 0,30	1682,29 ± 0,08	1636,50 ± 0,53	1508,86 ± 0,20**	1383,50 ± 0,50	1078,71 ± 1,18	871,38 ± 3,36*	816,91 ± 1,88**
PG-9	2920,51 ± 1,44	2851,16 ± 0,31	1681,99 ± 0,13	1636,45 ± 0,67	1509,42 ± 0,40**	1384,43 ± 0,02	1078,84 ± 0,83	874,30 ± 0,08	815,56 ± 0,90*
PG-10	2923,77 ± 1,70	2852,29 ± 0,27	1681,35 ± 0,37	1635,53 ± 2,43	1514,91 ± 0,10	1383,20 ± 0,95	1078,40 ± 1,28	873,98 ± 3,47	808,17 ± 2,01
PG-11	2922,66 ± 0,62	2851,79 ± 0,26	1682,15 ± 0,20	1633,60 ± 1,05*	1514,80 ± 0,51	1384,55 ± 0,06	1076,79 ± 0,68	874,92 ± 1,29	813,20 ± 0,80
PG-12	2922,33 ± 0,59	2851,26 ± 0,32	1682,12 ± 0,12	1635,77 ± 0,34	1515,36 ± 0,29	1383,12 ± 1,60	1078,15 ± 0,41	875,76 ± 1,50	813,91 ± 2,84
PG-13	2918,17 ± 0,28**	2851,40 ± 0,55	1681,94 ± 0,03	1637,14 ± 1,05	1510,26 ± 0,25**	1383,37 ± 0,97	1078,49 ± 0,26	875,84 ± 1,02	814,56 ± 2,54*
PG-14	2917,60 ± 0,16**	2849,89 ± 1,11**	1681,97 ± 0,53	1636,89 ± 0,20	1510,03 ± 1,00**	1382,16 ± 1,06	1080,47 ± 0,50	871,18 ± 0,50*	817,73 ± 1,20**
PG-15	2919,54 ± 1,76*	2850,55 ± 0,23	1681,83 ± 0,24	1637,13 ± 1,24	1510,35 ± 0,21**	1384,50 ± 0,46	1079,41 ± 0,46	871,02 ± 2,98*	811,18 ± 1,41
PG-16	2923,57 ± 0,55	2852,20 ± 0,18	1682,01 ± 0,37	1637,12 ± 0,14	1510,02 ± 1,00**	1384,68 ± 0,27	1077,34 ± 1,29	873,86 ± 1,41	814,01 ± 0,49
PG-17	2922,49 ± 0,56	2851,44 ± 0,27	1681,94 ± 0,12	1637,39 ± 0,34	1510,02 ± 0,50**	1384,18 ± 0,72	1077,23 ± 2,79	872,22 ± 2,41	811,15 ± 1,91
PG-18	2921,70 ± 1,25	2851,64 ± 0,34	1681,84 ± 0,02	1638,26 ± 0,50	1510,14 ± 0,44**	1386,04 ± 1,45	1076,76 ± 3,68	871,20 ± 2,57*	810,29 ± 1,61

Tablo 3.30. (Devam) *S. vomeracea*'nin kök dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslar üzerine besiyerlerinin etkileri

	Ortalama Frekans (cm ⁻¹)								
	2920	2850	1681	1637	1510	1384	1079	873	812
PG-19	2923,57 ± 0,30	2851,91 ± 0,03	1681,99 ± 0,11	1637,08 ± 1,25	1514,67 ± 0,25	1384,35 ± 1,22	1079,15 ± 1,95	876,11 ± 0,10	813,20 ± 1,85
PG-20	2918,67 ± 0,40**	2850,73 ± 0,17	1681,85 ± 0,15	1637,34 ± 0,29	1510,11 ± 0,36**	1383,11 ± 0,41	1078,85 ± 0,57	871,97 ± 0,95*	814,56 ± 1,23*
PG-21	2923,46 ± 0,20	2851,33 ± 0,41	1682,30 ± 0,00	1634,70 ± 1,21	1514,35 ± 0,32	1385,36 ± 0,50	1078,12 ± 0,57	874,29 ± 0,20	813,35 ± 0,83
PG-22	2922,71 ± 1,00	2851,40 ± 0,35	1682,27 ± 0,17	1637,04 ± 0,57	1509,59 ± 0,57**	1383,65 ± 0,50	1077,78 ± 0,99	876,77 ± 0,10	809,97 ± 0,48
PG-23	2918,20 ± 0,10**	2850,18 ± 0,15*	1681,64 ± 0,20	-	1513,96 ± 0,33	1384,27 ± 0,72	1079,68 ± 2,37	872,29 ± 2,42	811,06 ± 0,16
PG-24	2919,37 ± 0,19*	2851,07 ± 0,49	1682,59 ± 0,92	1636,81 ± 0,85	1513,66 ± 1,50	1383,66 ± 0,08	1078,62 ± 0,86	875,07 ± 1,35	815,31 ± 1,20*
PG-25	2918,85 ± 1,03**	2850,53 ± 0,27	1682,13 ± 1,20	1638,04 ± 0,07	1510,31 ± 0,38**	1381,79 ± 1,31	1078,43 ± 0,99	873,41 ± 2,45	816,58 ± 1,53**
PG-26	2918,37 ± 1,43**	2850,84 ± 0,35	1682,52 ± 0,59	1637,01 ± 1,15	1514,09 ± 0,99	1384,22 ± 0,55	1078,34 ± 0,47	873,46 ± 3,22	814,85 ± 0,63*
PG-27	2921,85 ± 1,38	2851,33 ± 0,56	1681,87 ± 0,43	1636,33 ± 1,32	1515,43 ± 0,62	1384,21 ± 0,95	1078,69 ± 0,91	872,91 ± 2,18	815,91 ± 2,53**
PG-28	2922,79 ± 0,57	2851,74 ± 0,17	1682,24 ± 0,78	1637,73 ± 0,20	1514,91 ± 0,16	1385,08 ± 0,06	1077,81 ± 2,01	871,97 ± 2,14*	814,15 ± 2,84
PG-29	2924,06 ± 0,34	2852,18 ± 0,17	1681,89 ± 0,40	1637,52 ± 0,89	1514,85 ± 0,28	1384,34 ± 0,45	1078,82 ± 0,89	873,11 ± 0,10	812,19 ± 1,58
PG-30	2921,26 ± 1,02	2851,36 ± 0,27	1682,11 ± 0,69	1637,96 ± 0,36	1514,18 ± 1,14	1383,08 ± 1,00	1078,38 ± 0,92	870,83 ± 1,09*	810,78 ± 2,92
PG-31	2923,22 ± 0,20	2851,57 ± 0,40	1681,96 ± 1,06	1635,90 ± 1,10	1517,58 ± 0,50*	1384,16 ± 0,10	1078,53 ± 0,20	872,59 ± 0,30	818,84 ± 0,80**
PG-32	2918,00 ± 1,00**	2850,70 ± 0,20	1682,21 ± 0,20	1636,58 ± 0,33	1518,88 ± 0,60**	1384,33 ± 0,30	1079,51 ± 0,40	-	815,35 ± 0,30*
PG-33	2921,34 ± 0,33	2850,99 ± 0,21	1682,12 ± 1,10	1635,06 ± 1,06	1518,35 ± 0,50**	1384,04 ± 0,82	1078,53 ± 1,13	871,18 ± 0,33*	812,89 ± 0,68
PG-34	2920,40 ± 1,09	2850,99 ± 0,14	1681,28 ± 1,10	1637,85 ± 1,10	1516,87 ± 1,45	1382,60 ± 0,02	1078,03 ± 0,33	871,72 ± 0,41*	812,17 ± 0,17

Kontrol grubu ve uygulamalardan elde edilen veriler arasındaki istatistiki önem derecesi $p < 0,05^$ ve $p < 0,001^{**}$ olarak gösterilmiştir

Tablo 3.31. *S. vomeracea*'nin kök dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslara ait absorpsiyonlar üzerine besiyerlerinin etkileri

	Absorbans (10-3)								
	2920	2850	1681	1637	1510	1384	1079	873	812
Kontrol	-0,134 ± 0,013	-0,161 ± 0,007	-0,148 ± 0,024	-0,087 ± 0,021	-0,287 ± 0,089	-0,075 ± 0,013	-0,310 ± 0,060	-0,039 ± 0,009	-0,094 ± 0,021
PG-1	-0,159 ± 0,017	-0,092 ± 0,014	-0,171 ± 0,043	-0,101 ± 0,024	-0,169 ± 0,027	-0,164 ± 0,032**	-0,142 ± 0,033*	-0,097 ± 0,026*	-0,078 ± 0,019
PG-2	-0,117 ± 0,012	-0,154 ± 0,019	-0,124 ± 0,053	-0,110 ± 0,018	-0,150 ± 0,040	-0,075 ± 0,031	-0,175 ± 0,023	-0,084 ± 0,020	-0,090 ± 0,015
PG-3	-0,074 ± 0,003	-0,092 ± 0,034	-0,231 ± 0,022	-0,084 ± 0,021	-0,149 ± 0,014*	-0,079 ± 0,013	-0,378 ± 0,073	-0,036 ± 0,013	-0,026 ± 0,007
PG-4	-0,114 ± 0,010	-0,181 ± 0,015	-0,104 ± 0,010	-0,066 ± 0,004	-0,093 ± 0,002**	-0,142 ± 0,020*	-0,142 ± 0,030*	-0,092 ± 0,000*	-
PG-5	-0,210 ± 0,020	-0,320 ± 0,040**	-0,246 ± 0,040	-0,154 ± 0,030	-0,140 ± 0,004*	-0,035 ± 0,000	-0,174 ± 0,003	-0,019 ± 0,003	-0,001 ± 0,000*
PG-6	-0,183 ± 0,030	-0,284 ± 0,060*	-0,237 ± 0,020	-0,056 ± 0,003	-	-0,034 ± 0,004	-0,321 ± 0,020	-0,044 ± 0,003	-0,045 ± 0,005
PG-7	-0,142 ± 0,069	-0,192 ± 0,071	-0,083 ± 0,009	-0,087 ± 0,027	-0,168 ± 0,000	-0,062 ± 0,013	-0,212 ± 0,055	-0,033 ± 0,000	-0,066 ± 0,021
PG-8	-0,128 ± 0,012	-0,183 ± 0,015	-0,142 ± 0,010	-0,092 ± 0,021	-0,042 ± 0,000**	-0,109 ± 0,023	-0,259 ± 0,055	-0,078 ± 0,015	-0,100 ± 0,019
PG-9	-0,179 ± 0,028	-0,262 ± 0,040	-0,162 ± 0,028	-0,121 ± 0,022	-0,263 ± 0,000	-0,132 ± 0,030	-0,223 ± 0,027	-0,025 ± 0,005	-0,082 ± 0,020
PG-10	-0,111 ± 0,024	-0,134 ± 0,033	-0,095 ± 0,029	-0,071 ± 0,003	-0,278 ± 0,036	-0,056 ± 0,016	-0,195 ± 0,019	-0,071 ± 0,019	-0,109 ± 0,003
PG-11	-0,183 ± 0,053	-0,249 ± 0,052	-0,170 ± 0,043	-0,100 ± 0,007	-0,180 ± 0,007	-0,036 ± 0,007	-0,250 ± 0,059	0,020 ± 0,003*	-0,036 ± 0,007
PG-12	-0,186 ± 0,027	-0,243 ± 0,045	-0,276 ± 0,028*	-0,146 ± 0,005	-0,291 ± 0,068	-0,028 ± 0,003	-0,351 ± 0,053	0,081 ± 0,010**	-0,063 ± 0,009
PG-13	-0,062 ± 0,009	-0,105 ± 0,020	-0,174 ± 0,038	-0,137 ± 0,053	-0,207 ± 0,048	-0,064 ± 0,004	-0,375 ± 0,037	0,068 ± 0,024**	-0,082 ± 0,009
PG-14	-0,101 ± 0,010	-0,145 ± 0,020	-0,102 ± 0,010	-0,018 ± 0,003*	-0,105 ± 0,010**	-0,023 ± 0,002	-0,108 ± 0,010*	-0,033 ± 0,002	-0,098 ± 0,002
PG-15	-0,068 ± 0,008	-0,112 ± 0,010	-0,251 ± 0,056	-0,096 ± 0,019	-0,284 ± 0,065	-0,020 ± 0,013*	-0,313 ± 0,051	-0,053 ± 0,002	-0,094 ± 0,041
PG-16	-0,174 ± 0,041	-0,216 ± 0,046	-0,142 ± 0,025	-0,149 ± 0,034	-0,192 ± 0,000	-0,088 ± 0,016	-0,280 ± 0,029	-0,021 ± 0,004	-0,122 ± 0,000
PG-17	-0,160 ± 0,022	-0,198 ± 0,038	-0,120 ± 0,027	-0,085 ± 0,024	-0,176 ± 0,000	-0,080 ± 0,013	-0,187 ± 0,028	-0,095 ± 0,017*	-0,132 ± 0,010
PG-18	-0,128 ± 0,035	-0,179 ± 0,045	-0,078 ± 0,011	-0,057 ± 0,000	-0,218 ± 0,023	-0,039 ± 0,022	-0,151 ± 0,013	-0,069 ± 0,015	-0,160 ± 0,041

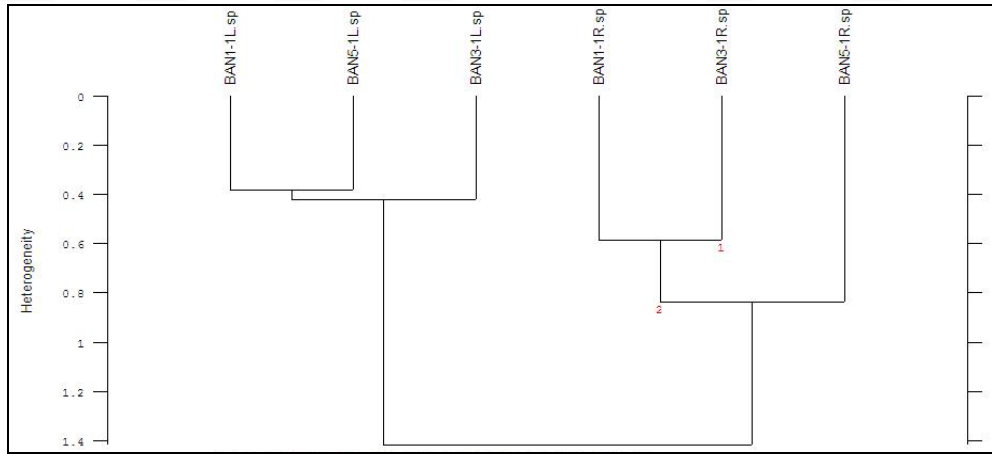
Tablo 3.31. (Devam) *S. vomeracea*'nin kök dokularının FTIR spektrumlarındaki bazı frekanslara ait absorbanlar üzerine besiyerlerinin etkileri

	Absorbans (10^{-3})								
	2920	2850	1681	1637	1510	1384	1079	873	812
PG-19	-0,141 ± 0,019	-0,169 ± 0,031	-0,123 ± 0,057	-0,081 ± 0,005	-0,237 ± 0,038	-0,060 ± 0,017	-0,258 ± 0,073	0,037 ± 0,000**	-0,054 ± 0,012
PG-20	-0,109 ± 0,013	-0,142 ± 0,019	-0,072 ± 0,008	-0,117 ± 0,018	-0,160 ± 0,042	-0,044 ± 0,015	-0,209 ± 0,074	-0,113 ± 0,043**	-0,018 ± 0,002
PG-21	-0,153 ± 0,037	-0,192 ± 0,032	-0,180 ± 0,026	-0,096 ± 0,015	-0,309 ± 0,073	-0,030 ± 0,014	-0,244 ± 0,066	-0,064 ± 0,000	-0,260 ± 0,026**
PG-22	-0,163 ± 0,034	-0,238 ± 0,043	-0,123 ± 0,033	-0,129 ± 0,013	-0,178 ± 0,006	-0,052 ± 0,013	-0,291 ± 0,021	0,017 ± 0,000*	-0,048 ± 0,013
PG-23	-0,179 ± 0,025	-0,325 ± 0,040**	-0,215 ± 0,028	-	-0,661 ± 0,080**	-0,020 ± 0,012*	-0,187 ± 0,019	-0,049 ± 0,007	-0,046 ± 0,013
PG-24	-0,051 ± 0,009	-0,075 ± 0,010	-0,105 ± 0,044	-0,122 ± 0,009	-0,208 ± 0,042	-0,078 ± 0,014	-0,437 ± 0,041	-0,050 ± 0,018	-0,090 ± 0,016
PG-25	-0,128 ± 0,021	-0,161 ± 0,038	-0,113 ± 0,037	-0,189 ± 0,016**	-0,188 ± 0,025	-0,061 ± 0,024	-0,304 ± 0,032	-0,032 ± 0,009	-0,081 ± 0,021
PG-26	-0,062 ± 0,023	-0,078 ± 0,025	-0,069 ± 0,010	-0,121 ± 0,009	-0,162 ± 0,039	-0,052 ± 0,008	-0,239 ± 0,058	-0,071 ± 0,016	-0,101 ± 0,024
PG-27	-0,107 ± 0,017	-0,138 ± 0,012	-0,126 ± 0,029	-0,063 ± 0,018	-0,185 ± 0,031	-0,098 ± 0,016	-0,334 ± 0,079	-0,057 ± 0,008	-0,117 ± 0,029
PG-28	-0,161 ± 0,040	-0,216 ± 0,048	-0,106 ± 0,017	-0,083 ± 0,018	-0,316 ± 0,054	-0,044 ± 0,007	-0,213 ± 0,049	-0,059 ± 0,004	-0,062 ± 0,037
PG-29	-0,158 ± 0,040	-0,169 ± 0,055	-0,132 ± 0,028	-0,092 ± 0,015	-0,263 ± 0,055	-0,096 ± 0,025	-0,437 ± 0,071	0,002 ± 0,000	-0,060 ± 0,015
PG-30	-0,150 ± 0,030	-0,206 ± 0,017	-0,083 ± 0,008	-0,120 ± 0,033	-0,228 ± 0,054	-0,078 ± 0,021	-0,335 ± 0,064	-0,099 ± 0,038*	-0,153 ± 0,042
PG-31	-0,115 ± 0,025	-0,139 ± 0,035	-0,201 ± 0,040	-0,093 ± 0,010	-0,392 ± 0,090	-0,061 ± 0,010	-0,584 ± 0,069**	0,017 ± 0,000*	-0,091 ± 0,000
PG-32	-0,075 ± 0,002	-0,093 ± 0,010	-0,101 ± 0,025	-0,055 ± 0,000	-0,204 ± 0,030	-0,074 ± 0,010	-0,223 ± 0,020	-	0,014 ± 0,000 *
PG-33	-0,075 ± 0,000	-0,088 ± 0,000	-0,153 ± 0,000	-0,079 ± 0,000	-0,273 ± 0,000	-0,064 ± 0,000	-0,280 ± 0,061	-0,038 ± 0,000	-0,081 ± 0,000
PG-34	-0,114 ± 0,029	-0,101 ± 0,000	-0,102 ± 0,033	-0,065 ± 0,019	-0,139 ± 0,010*	-0,072 ± 0,005	-0,245 ± 0,045	-0,094 ± 0,000*	-0,031 ± 0,000

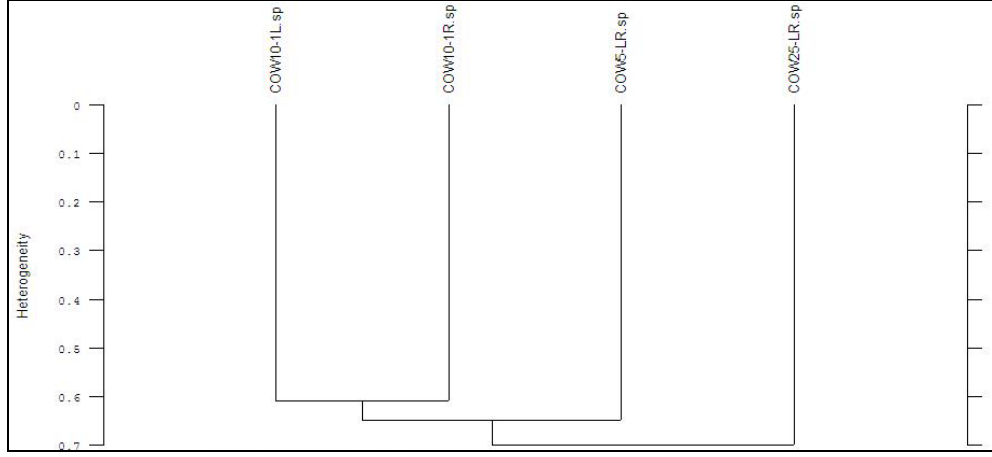
*Kontrol grubu ve uygulamalardan elde edilen veriler arasındaki istatistikî önem derecesi $p < 0,05$ * ve $p < 0,001$ ** olarak gösterilmiştir

3.9. Hiyerarşik Kümeleme Analizi (HCA) Verilerine Ait Bulgular

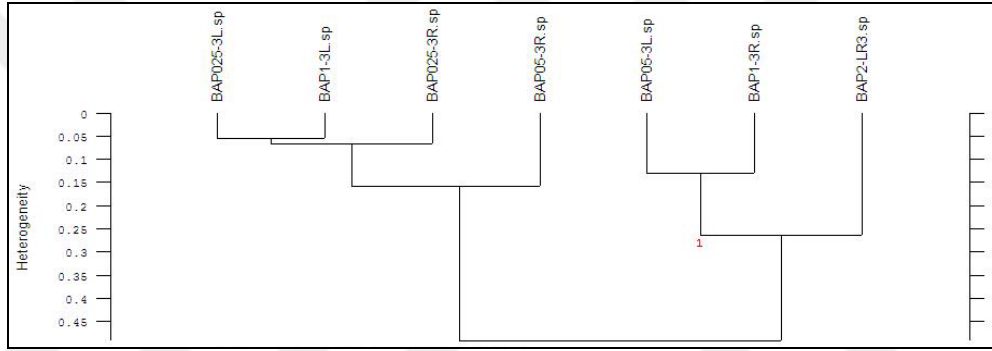
HCA analizinde ilk olarak tüm spektrumlar $4000-400\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında farklı dalga sayılarında ayrıntılı olarak test edildi. Testin sonucunda en uygun tüm örnek spektrumları için en uygun ayırım $1716-1460\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde elde edildi. Adı geçen bölge değişik hücre duvarı polisakkaritleri, proteinler, hemiselüloz, pektin, selüloz, karboksilik asit ve lignin gibi değişik moleküllerinden kaynaklı bantların bulunduğu bir bölgedir. Şekil 3.27.'den görüldüğü üzere BAN grubunda yaprak ve köklere ait spektrumlar iki ayrı grup olacak şekilde tam olarak ayrıldı. Diğer grupların (COW, BAP, KIN, IAA, IBA, JAS, CHI-1, CHI-10 ve kontrol) HCA analizlerine göre ise (Şekil 3.27. - 3.34.) yaprak ve köklerine ait spektrumlar % 80 heterojenite üzerinden başarılı bir şekilde kabul edilebilir ölçülerde ayrıldı. Şekil 3.35. ise tüm örnek spektrumlarının dâhil edildiği HCA dendrogramı göstermektedir. Şekilden görüldüğü üzere, tüm örneklerin yaprak ve kök spektrumları belirlenen frekans aralığında heterojenite gösterdiğinden çok başarılı bir şekilde ayırım elde edilemedi. Fakat tüm dendrogram içinde aynı gruba ait spektrumların birbirlerine yakın çatallarda gruplandığı göz önünde bulundurulmalıdır.



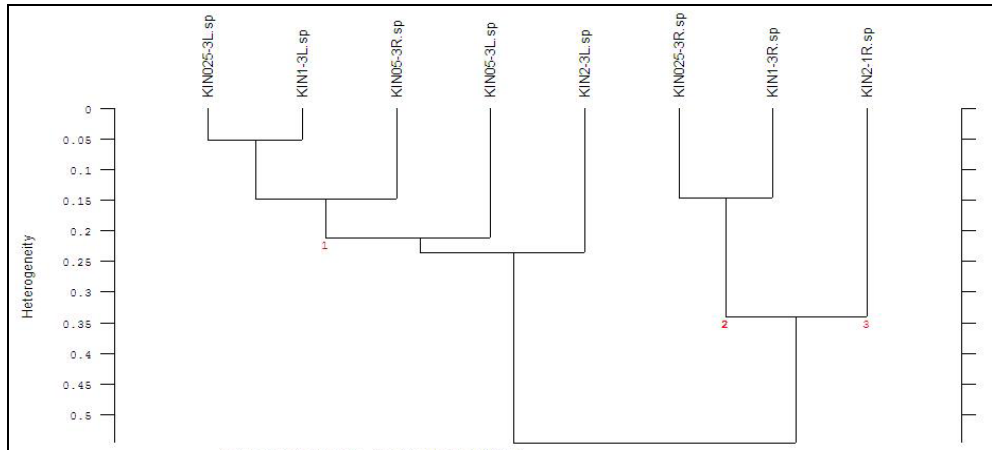
Şekil 3.27. BAN besiyeri grubunun $1716-1460\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi



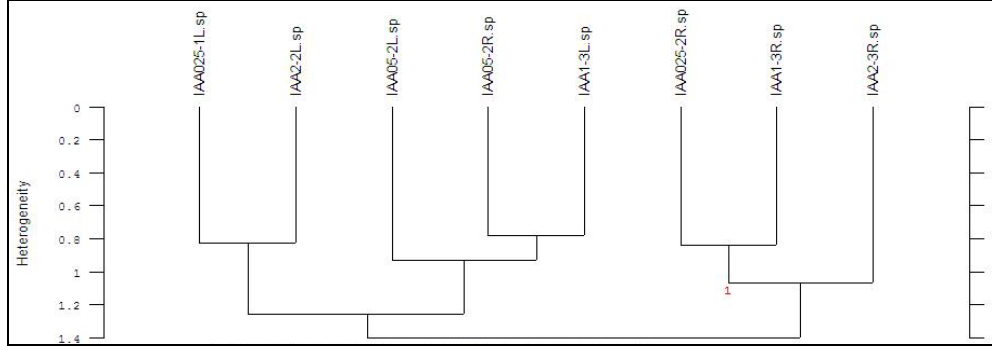
Şekil 3.28. COW besiyeri grubunun 1716-1460 cm^{-1} bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi



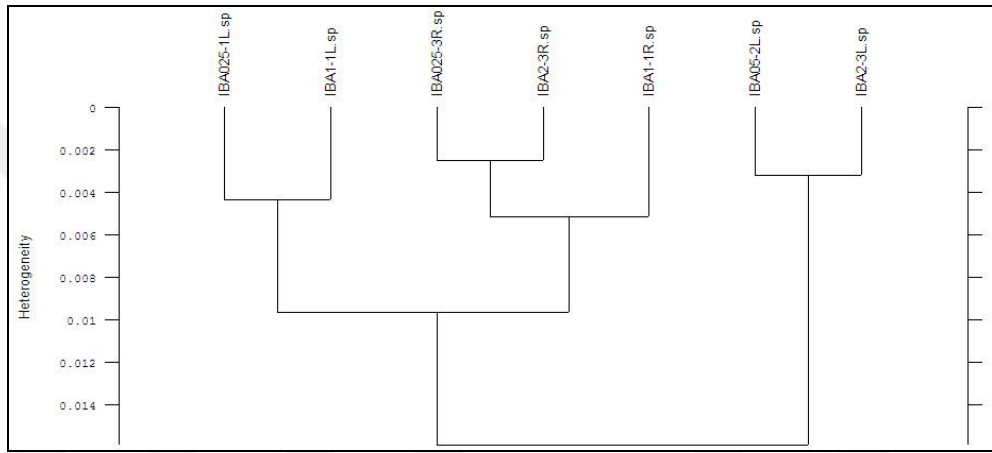
Şekil 3.29. BAP besiyeri grubunun 1716-1460 cm^{-1} bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi



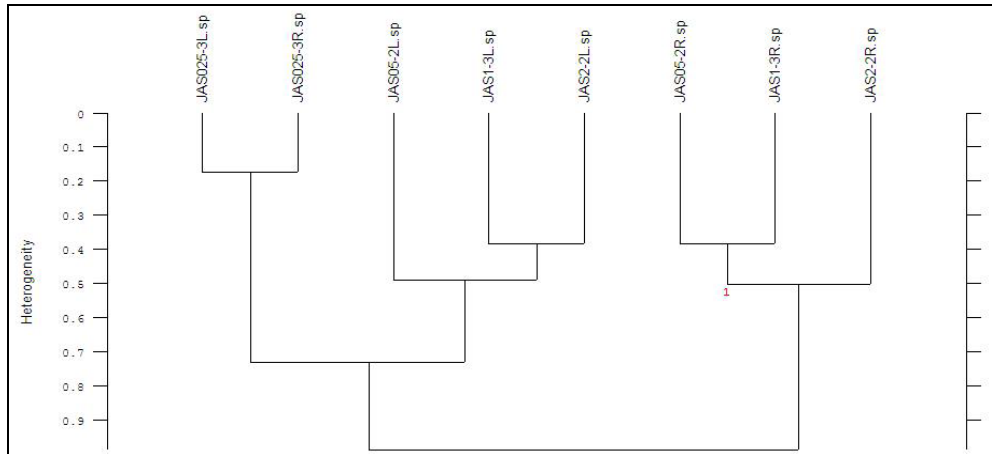
Şekil 3.30. KIN besiyeri grubunun 1716-1460 cm^{-1} bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi



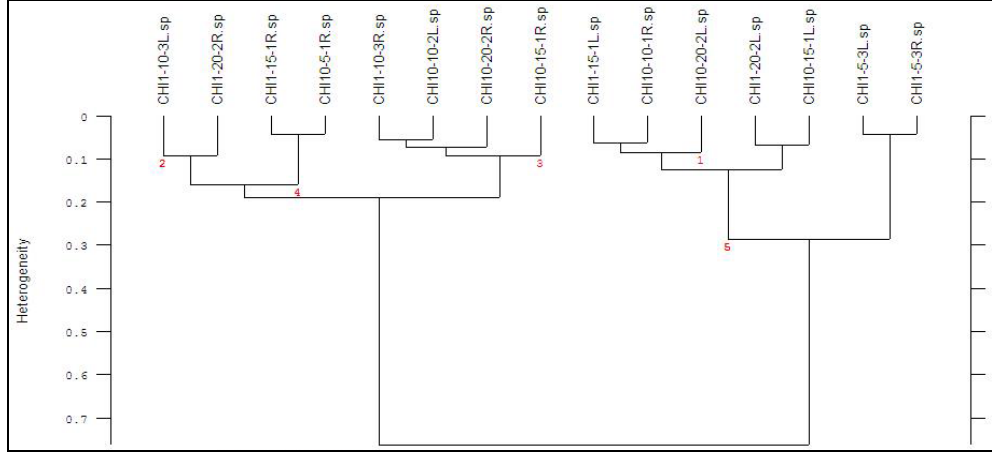
Şekil 3.31. IAA besiyeri grubunun 1716-1460 cm^{-1} bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi



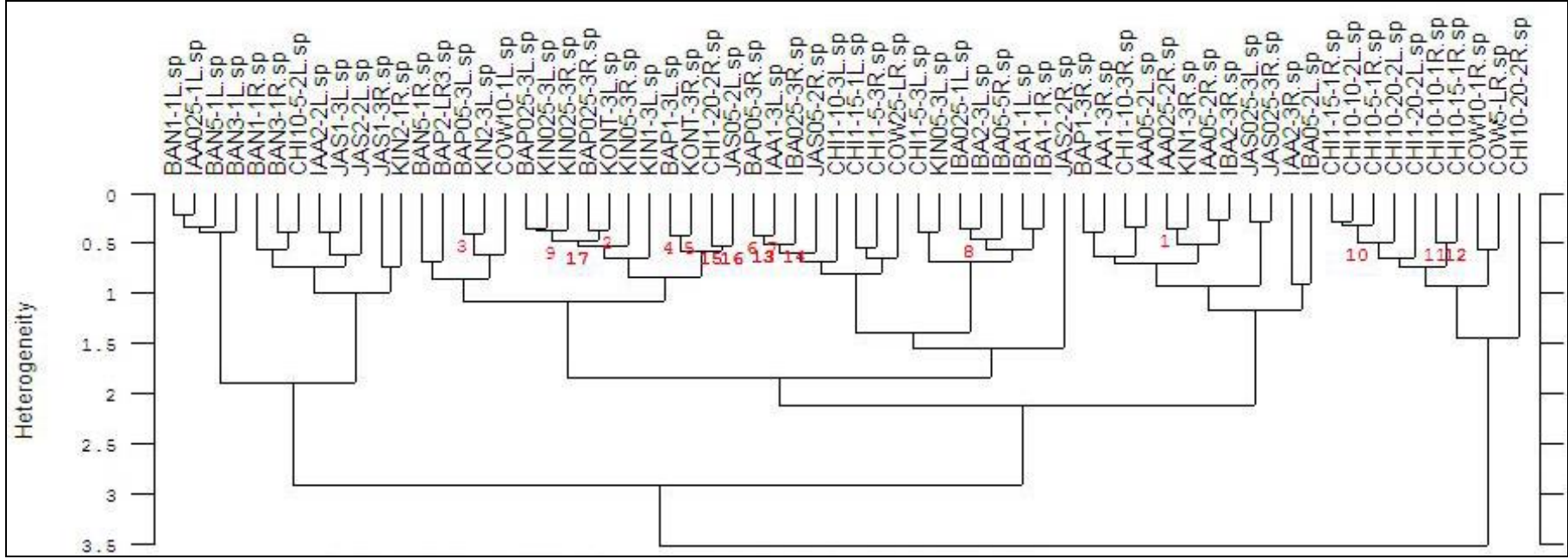
Şekil 3.32. IBA besiyeri grubunun 1716-1460 cm^{-1} bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi



Şekil 3.33. JAS besiyeri grubunun 1716-1460 cm^{-1} bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi



Şekil 3.34. CHI gruplarının 1716-1460 cm^{-1} bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi



Şekil 3.35. Tüm besiyeri gruplarının 1716-1460 cm^{-1} bölgesinde uygulanmış hiyerarşik kümeleme analizi

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, doku kültürü çalışmaları ve FTIR çalışmaları olarak iki ana başlık altında yorumlanmıştır.

4.1. Doku Kültürü Çalışmaları

4.1.1. Yüzeysel sterilizasyon

Bitki doku kültürü çalışmalarında kültürlerin kurulabilmesi için gerekli en önemli aşama başlangıç materyalinin yüzeysel sterilizasyonudur. Bu aşamada gerçekleştirilecek bir hata kültürlerin sürekli kontamine olmasını da beraberinde getirecek ve deneylerin başarısını etkileyecektir. Bu nedenle başlangıç materyaline özgü etkin bir yüzeysel sterilizasyon protokolünün geliştirilmesi gerekir. Bu aşamada kullanılan çeşitli sterilantlar bulunmaktadır. Bunların en yaygın olarak kullanılanları NaOCl, EtOH ve H₂O₂'dir. Bu kimyasallar ile başlangıç materyalinin temas süresinin materyalin canlılığını etkilemeyecek kadar kısa fakat yüzeyindeki tüm mikrobiyal canlıları öldürecek kadar da uzun olması gerekmektedir. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında *Serapias vomeracea* tohumlarının canlılığına zarar vermeyecek şekilde bir yöntem geliştirilmiştir. Doku kültürü çalışmalarında başlangıç materyali olarak tohum kullanılması durumunda deneylerin başarısını etkileyecek en önemli parametre tohumların çimlenme başarısıdır. Bu da büyük ölçüde kullanılan tohumların besiyerinde su alıp şişmelerine ve besiyerindeki makro ve mikro elementleri almalarına bağlıdır. Bu nedenle tohum kabuğundaki su alımını engelleyebilecek mumsu maddelerin ortadan kaldırılması ve bu sayede tohumlara hidrofilik bir yapı kazandırılması gereklidir. Etil alkolün tohum kabuğundaki pektin ve diğer mumsu maddeleri elimine ederek tohuma hidrofilik bir yapı kazandırdığı bu sayede NaOCl uygulamasında bu maddenin tohum kabuğuna etkin temasının sağlandığı ve yüzeysel sterilizasyonun etkinliğinin arttığı ve EtOH ile yapılacak bir ön uygulamanın bu yüzden çimlenme yüzdelerini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Ponert ve diğ., 2011). Bu nedenle *S. vomeracea* tohumları sterilizasyonu için EtOH önemli bir ön sterilant olarak düşünülmektedir.

Tohum kabuğu üzerindeki hidrofilik yapılar türden türe değişse de mevcut sonuçlardaki EtOH etkinliği bu türün tohum kabuğundaki hidrofilik özellikte maddelerin sadece NaOCl sterilizasyonu ile elimine edilemeyecek kadar yoğun olduğunu göstermiştir. Bu çözeltilerde uzun süreler bırakılan tohumların ise canlılıklarını kaybedecekleri bilindiğinden yüzeysel sterilizasyonda kullanılan sürelerin önemi büyüktür. Yüzeysel sterilizasyon işlemlerindeki diğer bir sorun ise tohumların hangi yöntem kullanılarak dezenfekte edileceğidir. Genellikle çalışmalarda kese içerisinde alınmış tohumlar kullanılsa da (Özkoç ve Dalcı, 1994; Gümüş ve Ellialtıoğlu, 2012) ekim sırasında kese içinde artakalan ve ekilemeyen tohumların çokluğu elinde az miktarda tohum bulunan araştırmacıları sınırlamaktadır. Bu nedenle tohum kaybının önüne geçilmesi açısından tohumların şırınga içerisine konularak yüzeysel sterilizasyonu tavsiye edilmiştir (Ponert ve diğ., 2011). Bu tez çalışmasında kullanılan ve diğer bir yöntem olan santrifüj tüpleri kullanılarak tohumların dezenfekte edilmesi tekniğinde ise tohumlar yüzeysel sterilizasyon uygulamaları sırasında santrifüj tüpleri içinde tutuklu kaldığından herhangi bir tohum kaybı söz konusu olmamıştır.

4.1.2. Tohum canlılığı

Tohum canlılığının belirlenmesinde kullanılan TTC testi orkide tohumları gibi canlılığını zamanla yitirebilen ve endospermi olmayan tohumların doku kültüründe kullanılmadan ne kadarının canlı ve dolayısıyla çimlenme kabiliyetinde olduğunu belirlenmesi açısından önemlidir. Bu tez çalışmasında TTC etkinliği tohumların 24 saat suda bekletilmesiyle artmıştır. Bunun nedeni ise su alan tohumlarda metabolik faaliyetlerin başlanması ve/veya hızlanmasıdır. Ayrıca bu başarının artmasını suyun tohum kabuğu üzerindeki gevşetici etkisine bağlamak mümkündür. Ayrıca TTC testinden önce yapılan yüzeysel sterilizasyon işlemleri de kabuktaki süberin benzeri maddeleri uzaklaştırdığı için kabuğun TTC çözeltisine karşı geçirgenliği artmıştır. Dolayısıyla TTC testi uygulanmadan önce *S. vomaeracea* tohumları dezenfekte edilmeli ve 24 saat suda bekletilmelidir. Sonuç olarak TTC testinden elde edilen veriler metodolojinin optimize edilmesini sağlamıştır. Bundan sonra steril edilmeden ve dH₂O uygulanmadan önce yapılacak bir TTC testinin olduğundan daha düşük bir canlılık yüzdesi vereceği belgelenmiştir. *Orchis coriophora* üzerine yapılan bir

çalışmada Bektaş ve diğ. (2013) TTC testinden önce tohumları 12 saat NaOCl katkılı % 5 sükröz çözeltisi içinde bekletmişlerdir. Test sonucunda ise tohum canlılığı % $54 \pm 2,1$ olarak bulunmuştur. Aynı yöntemin kullanıldığı *S. vomeracea* üzerindeki benzer bir çalışmada ise tohum canlılığı sonucu belirtilmemiştir (Bektaş ve Sökmen, 2016). Bu tez çalışmasında ise sükröz uygulaması yapılmamış ve *S. vomeracea* tohum canlılığı % $54,67 \pm 4,16$ oranında bulunmuştur. Bitki tohumları *in vitro* kültüre alındıklarında çimlenip ototrofik hale gelinceye kadar bir karbon ve enerji kaynağına ihtiyaç duyarlar. Bu durum endospermi olmayan orkide tohumlarında daha da belirgin olarak görülmektedir. Bu nedenle TTC testi öncesi sükröz uygulamasının tohum canlılığını artırabileceği öngörülebilir.

4.1.3. Besiyerinin fiziksel durumu

Epifitik ve karasal orkidelerin tohumlarının simbiyotik kültüre alındıklarında agarla katılaştırılmış asimbiyotik kültürdekenden daha hızlı çimlendikleri ve daha fazla su içerdikleri bildirilmiştir. Çünkü mikorizal mantarlar tohumların su alımını kolaylaştırmak suretiyle çimlenmeyi artırır. Dolayısıyla asimbiyotik kültürlerdeki çimlenme süresinin uzunluğu su alımının yavaş olmasıyla ilintilidir (Yoder ve diğ., 2000). Epifitik *Doritaenopsis* orkidesi kültürlerinde sıvı besiyerinde katı besiyerinden daha hızlı çimlenme olduğu fakat inkübasyon süresinin sonunda çimlenme oranının aynı kaldığı bildirilmiştir (Tsai ve Chu, 2008). Bu tezdeki sıvı besiyerleri ise toplu halde ele alındığında katı besiyerlerinden daha iyi sonuçlar vermişlerdir. Buna rağmen en yüksek çimlenme oranı bir katı besiyerinden kaydedilmiştir. Ayrıca genel bir gözlem olarak uzatılan inkübasyon süreleri sonunda safha 4'e geçen protokormların rizoitlerinin sıvı besiyerlerinde çok daha kısa olarak geliştikleri, katı besiyerlerinde ise rizoitlerin normal şekilde uzadıkları görülmüştür. Bunun nedeni sıvı kültürün protokorm üzerinde uyguladığı basınç kuvveti ve/veya protokormun besin elementlerine kolay ulaşabilmesinin bir sonucu da olabilir. Çünkü rizoitler ilkel kök öncülleri oldukları gibi besin elementlerini sonraki büyüme safhaları için karbonhidrat deposu rolünde olan protokorma taşıyan birer köprüdürler (Edwin, 1993). Tohumlar sıvı kültürler içerisinde yüzer durumda bulduklarından dolayı sayım aşamasında katı besiyerlere kıyasla dezavantajlı durumdadırlar. Bununla birlikte kültürlerin zaman zaman çalkalanarak içerisinde barındırdıkları elementlerin sıvı içerisinde çökelmelerinin önüne geçilmesi gerekmektedir. Tüm bu

nedenlerden dolayı *S. vomeracea* kültürlerinde katı besiyerinin kullanımı tavsiye edilmektedir.

4.1.4. Besiyerlerinin çimlendirme başarısı

KN besiyeri denemelerde kullanılan diğer besiyerlerine kıyasla mikroelementler, vitaminler ve aminoasit bakımından VW besiyeri ile birlikte en fakir olan besiyeridir. Buna karşın her iki besiyeri de sıvı kültürler arasında en yüksek sonuçları vermişlerdir. Besiyeri bileşiminde en büyük payı makroelementler almaktadır. Bu nedenle çimlenme başarısındaki bu fark besiyerlerinin makroelement kompozisyonları arasındaki farklılıklara atfedilebilir. KN ve VW besiyerlerinde diğer besiyerlerinin yaklaşık 1,5-2 katı oranında KH_2PO_4 bulunmaktadır. Buna ilaveten yine bir fosfat kaynağı olarak VW besiyerinde $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, KN besiyerinde ise yüksek miktarda $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ bulunmaktadır. Dolayısıyla bu iki besiyerinin sıvı kültürlerdeki çimlendirme başarısı tohumlar üzerindeki fosfatın artan alınabilirliği olabilir. Katı kültürlerde ise çimlendirme başarısı en yüksek olan KN ve MS besiyerleri ise diğer besiyerlerinden sırasıyla $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ve NH_4NO_3 başta olmak üzere toplam azot oranlarının fazlalığıyla ayrılmaktadırlar. Dolayısıyla katı besiyerlerindeki çimlendirme başarısı fosfattan çok daha yüksek oranda bulunan nitrat varlığıyla bağlantılı olabilir. Bu çalışmada elde edilen bulgulara benzer olarak Gümüş ve Ellialtıoğlu (2012) *S. vomeracea* tohumlarının 90 günlük karanlıkta inkübasyonu sonucunda en yüksek oranda (% 76,85), inorganik azot olmayan KN besiyerinde çimlendiklerini bildirmişlerdir. Bektaş ve Sökmen (2016) ise 60 günlük inkübasyon sonunda elde ettikleri bulgularda KN besiyerinde *S. vomeracea* tohumlarının çimlenme oranının $27,95 \pm 2,4$ olduğunu belirtmişlerdir. Mevcut tez çalışmasında ise bazal KN besiyerinde % $58,77 \pm 5,51$ çimlenme oranına 45 günde ulaşılmıştır. Çimlendirme başarılarındaki bu farkın nedenleri tohumların ekim ve yüzeysel sterilizasyon yöntemlerindeki ve canlılık oranlarındaki farklılıklar olabilir. Bu tez çalışmasında kullanılan ekim yönteminde tohumlar santrifüj edildikten sonra üst fazda biriken veya dibe çökmeyip sıvı içinde yüzmekte olan, embriyosuz tohumlar yani sadece tohum kabukları pipetle toplanarak uzaklaştırılmışlardır. Dolayısıyla besiyerlerine büyük oranda çimlenme yeteneğine sahip tohumlar aktarılmıştır. Diğer ekim yöntemlerinde ise embriyosu olmayan/tamamen kurumuş ve sadece tohum kabuğundan oluşan yapılar da besiyerlerine aktarıldığı için hesaplamalarda

farklılıkların meydana geldiği düşünülmektedir. Bunların yanında KN besiyeri *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Kauth ve diğ., 2006), *Dendrobium aphyllum*, *Rhyncostlis retusa*, *Cymbidium longifolium* (Das ve diğ., 2008) ve *C. aloifolium* (Philip ve diğ., 2017) kültürlerinde de yüksek çimlendirme başarısı göstermiştir.

4.1.5. Besiyerine muz homojenatı ilavesi

Besiyerlerinde sükröz içeriğinden bağımsız olarak muz homojenatı ilave edilmesi çimlenme oranını kontrole kıyasla azaltmış fakat en yüksek protokorm oluşum oranlarından bir tanesini vermiştir. Bununla birlikte bitki büyüme parametrelerinin tamamına olumlu etki yaptığı görülmüştür. Tohumların çimlenme aşamasındaki bu olumsuz etkisi tohumlar çimlendikten sonra tamamen kaybolmuş ve diğer denenen besiyeri bileşenlerine kıyasla büyüme parametrelerinden daha üstün verilerin alınmasını sağlamıştır. Organik katkı maddelerinden biri olan muz homojenatı doğal vitaminler, fenoller, lifler, hormonlar ve proteinler bakımından zengin olduğu için bitki doku kültürlerinde kullanılmaktadır (Gnasekaran ve diğ., 2010). Henüz tanımlanmamış çok çeşitli organik besin maddeleri ve büyüme faktörlerinden oluşan bu karmaşık yapısı muz homojenatının etkinliğinin sebeplerinden biridir. Bununla birlikte, muz homojenatının bitkinin çimlenme, protokorm oluşturma ve gelişim evrelerinde farklı etkiler sergilemesinin nedeni bitkinin bu evrelerde besin isteğinin değişmesinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Daud ve diğ. (2011) *Celosia* sp. kültürlerinde muz homojenatı uygulamasıyla sürgün uzunluğunun artışı rapor etmişlerdir. Muz homojenatı uygulaması *Renanthera imschootiana* kültürlerinde ise protokorm benzeri yapılardan bitkicik oluşum oranını artıran bir etkisinin olduğu bildirilmiştir (Wu ve diğ., 2014). Buna benzer olumlu bir etki de *Pogostemon cablin*'de toplam protein, karbonhidrat ve klorofil miktarlarında da gözlenmiştir (Swamy ve diğ., 2014). *S. vomeracea* kültürlerinde ise muz homojenatına ait daha önce bildirilmiş bir veri bulunmamaktadır.

4.1.6. Besiyerindeki sükröz seviyesi

Besiyerinde artan sükröz konsantrasyonu (% 5) çimlenme başarısı üzerine olumsuz etki yapmıştır. Buna karşın tohumlar çimlendikten sonra protokorm oluşum oranları besiyerindeki sükröz miktarı ile doğru orantılı olarak artmıştır. Çimlendirme başarısı % 2 ve % 3 sükröz uygulamalarında birbirine çok yakın bulunmuştur. Bu nedenle

maliyet etkin bir besiyerinde *S. vomeracea* tohumlarının çimlendirilmesi için % 2 sükröz oranı uygundur. Çimlendirmede olumsuz etkileri görülen % 5 sükröz uygulamasının sınırlı sayıda çimlenen tohumu yüksek oranda protokorma dönüştürme başarısı ise bitkinin çimlenme ve protokorm oluşturma safhalarında değişen karbonhidrat ihtiyacından kaynaklanmaktadır. Şekerler metabolik yollara girer ve parçalanarak tohum çimlenmesi, hücre büyümesi, tomurcuk oluşumu, sürgün ve hatta bitki büyümesi için gerekli enerjiyi üretir (Rahman ve diğ., 2010). Çimlenmenin gerçekleşmesi için önce tohumların su alıp şişmesi ve ardından tohum kabuğunun içini tamamen doldurması gerekmektedir. Dolayısıyla bu aşamada tohumun ihtiyacı olan enerji protokorm oluşturup ototrofik hale gelmek için atılan ilk adımdaki enerji ihtiyacından daha düşüktür. Çimlenmedeki düşük fakat protokorm oluşumundaki yüksek sükröz ihtiyacının nedeni buna dayanmaktadır. 0-40 g·l⁻¹ konsantrasyon aralığında sükröz seviyelerinin denendiği *Phalaenopsis* kültürlerinde *in vitro* gelişim için en uygun konsantrasyonun 20 g·l⁻¹ olduğu gösterilmiştir (Zahara ve diğ., 2017). *S. vomeracea* kültürlerinde ise farklı sükröz konsantrasyonlarının etkilerine ait daha önce bildirilmiş bir veri bulunmamaktadır.

4.1.7. Besiyerine hindistan cevizi suyu ilavesi

Besiyerine sükrözle birlikte artan konsantrasyonlarda hindistan cevizi suyu eklenmesi tohumların çimlenme oranını olumsuz etkilemiştir. Çimlenmenin yüksek konsantrasyondaki (% 10) hindistan cevizi suyu besiyerindeki sükrözle birlikte kullanıldığında olumsuz etkilenmesinin besiyerinin osmotik potansiyelinin düşmesine bağlı olarak tohumların su alımının sınırlanması nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Borowitzka, 1985). Buna karşın ortamdan sükröz çıkarıldığında en yüksek konsantrasyondaki hindistan cevizi suyu katkısı kontrole oranla çimlenme oranını artırmıştır. Hindistan cevizi suyu, sitokin olarak işlev gören difenil üre dahil birçok besinsel ve/veya hormonal madde içerir ve bu büyüme düzenleyicisi, büyümeyi ve hücre bölünmesini teşvik eder (Teixeira da Silva ve diğ., 2006). *Dendrobium lasianthera* kültürlerinde VW besiyerine % 15 oranında hindistan cevizi suyu eklenmiş ve sürgün, kök ve yaprak gelişimini artırdığı bildirilmiştir (Utami ve diğ., 2017). Hindistan cevizi suyunun sürgün gelişimi ve bitki rejenerasyonunu artırdığı *Phalaenopsis* orkidesi ile birlikte diğer bitkiler için de rapor edilmiştir (Agampodi ve Jayawardena, 2009; Zahara ve diğ., 2017). *S. vomeracea* kültürlerinde

ise hindistan cevizi suyu kullanımının etkilerine ait daha önce bildirilmiş bir veri bulunmamaktadır.

4.1.8. Besiyerine aktif kömür ilavesi

Besiyerine aktif kömür ilavesiyle hem çimlenme hem de protokorm oluşum verilerinde en yüksek değerlere ulaşılmıştır. Aktif kömür gibi alternatif ve ucuz katkı maddeleri büyüme ve gelişmeyi iyileştirmek için doku kültürü ortamında yaygın olarak kullanılmaktadır. Aktif kömürün çimlenme üzerindeki olumlu etkileri yararlı etkileri sadece kültür ortamının karartılmasından kaynaklanabilir. Çünkü çimlenme aşamasında henüz bitki meydana gelmediği için tohumdan direkt fenolik madde salınımı olamayacağı düşünülmektedir (Prizão ve diğ., 2012). Aktif kömür sadece bitkiden salınan zehirli kimyasalları değil besiyerindeki diğer bitki büyüme düzenleyicilerini de absorbe eder. Besiyerinde aktif kömür kullanımının *Cattleya bicolor* orkidesinde köklenme için uygun olan endojen oksin/sitokinin dengesini sağladığı ve bu yolla kök gelişimini artırdığı bildirilmiştir (Prizão ve diğ., 2012). Buna karşın *Catasetum fimbriatum* orkidesinde endojen oksin seviyelerini azalttığı ve bu yolla yaprak gelişimini artırdığı rapor edilmiştir (Moraes, 2005). Aktif kömürün *S. vomeracea*'de protokorm oluşumuna olumlu yapmasının nedeni bitki büyüme düzenleyicileri ve/veya büyüme faktörlerinin arasındaki etkileşimin ve dengenin sağlanması olabilir. Bektaş ve Sökmen (2016) *S. vomeracea* üzerine yaptıkları bir çalışmada aktif kömür ve $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP katkılı Orchidmax besiyerine ektikleri tohumlarda 60 günlük kültür periyodu sonunda % 84,03 oranında çimlenme oranına ulaştıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada kompleks ve zengin bir besiyeri olmayan KC içerisine sadece $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ aktif kömür eklenerek 45 günlük kültür periyodu sonunda % 77,31 çimlenme oranına ulaşılmıştır. Kültür periyodu uzatıldıkça hesaplanan çimlenme oranının da artacağı öngörülmektedir. Gümüş ve Ellialtıoğlu (2012) *S. vomeracea* tohumlarını KC besiyerinde 90 gün karanlıkta inkübe ettikten sonra % 71,98 - 83,44 aralığında çimlenme oranlarına ulaşmışlardır. Çimlendirme verileri bu çalışmaların sonuçları ile kıyaslandığında kısa zamanda yüksek çimlendirme oranlarına ulaşıldığı görülmektedir.

4.1.9. Besiyerine sitokinin ilavesi

Besiyerinde BAP ve KIN kullanımı sırasıyla 0,5 ve 1 mg·l⁻¹ konsantrasyonlarda kontrol grubundan sonra en yüksek değerlerine ulaşmıştır. Bu konsantrasyonlarda yine sırasıyla % 60,13 ve % 61,28 çimlenme oranlarına ulaşılmıştır. Her iki sitokinin de adenin türevi olup sağladıkları çimlenme başarıları oldukça benzerdir. Bunun yanında BAP, KIN'den daha düşük konsantrasyonda etkinlik sergilemiştir. Bunun nedeni BAP'ın bitki dokularında kolay metabolize edilmesi olabilir (Malik ve diğ., 2005). Besiyerine BAP eklenmesi orkidelerde tohum çimlenmesi protokorm oluşumuna olumlu etki yaptığı bilinmektedir (David ve diğ., 2010; Nongdam ve Tikendra, 2014). Sınırlı da olsa BAP'ın çimlenme üzerine yaptığı olumlu etki *Calanthe tricarinata*'dan da bildirilmiştir (Godo ve diğ., 2010). Diğer bir raporda ise *S. vomeracea*'de en yüksek çimlenme oranlarına (% 83,81 ve % 84,03) sırasıyla 1 ve 2 mg·l⁻¹ BAP eklenmiş aktif kömür katkılı Orchidmax besiyerinde ulaşılmıştır (Bektaş ve Sökmen, 2016). Dolayısıyla anılan çalışmada elde edilen çimlenme oranlarında hem aktif kömür hem de BAP etkisi vardır. Aynı çalışmada kullanılan zeatin ve thidiazuron sitokininlerinin tohum çimlenmesi üzerine etkileri BAP kullanımına kıyasla sınırlı kalmasına rağmen protokorm oluşumunda tam tersi bir sonuç ortaya koymuşlardır. Dolayısıyla *S. vomeracea*'nin tohumlarının çimlendirilmesinde fenilüre tipi değil adenin bazlı sitokininler aktif kömürle birlikte tercih edilebilir.

Protokorm oluşumu verilerine göre BAP ve KIN uygulamaları birbirine yakın sonuçlar vermişlerdir. Bitki büyümesinde ölçülen sürgün uzunluğu parametresine BAP uygulaması düşük konsantrasyonlarda KIN ise yüksek konsantrasyonlarda olumlu etki yapmıştır. Bunun nedeni, BAP'ın sadece kolay metabolize edilmesi değil aynı zamanda bitki dokularında zeatin gibi doğal sitokininlerin oluşumunu tetikleme özelliğinden kaynaklanmaktadır (Sharma ve diğ., 2017). Bu bağlamda BAP'ın diğer sitokininlere karşı üstünlüğü *Amsonia orientalis*'de de gösterilmiştir (Acemi ve diğ., 2013). *S. vomeracea*'de ölçülen kök uzunluğu parametresinde ise KIN uygulamaları BAP'a oranla avantajlı bulunmuştur. Kök sayısı açısından bunun tersi bir durum söz konusudur. Benzer bulgular değerleri birbirilerine çok yakın olarak Bektaş ve Sökmen (2016) tarafından da bildirilmiştir. BAP uygulamaları kısa-kalın fakat yumru oluşumuna daha yatkın köklere sebep olurken KIN uygulamaları ince-uzun

yapıda kök gelişimini tetiklemiştir. BAP uygulamalarının yumrulaşma üzerine olumlu etkisi kök dokularında artan hücre zarı akışkanlığına istinaden hızlanan hücre bölünmesi ve besin elementlerinin alımı olabilir (Acemi ve diğ., 2016).

4.1.10. Besiyerine oksin ilavesi

Besiyerinde en yüksek konsantrasyonu hariç, artan IAA seviyeleri tohum çimlenmesini artırmıştır. Buna karşın IBA uygulamalarının hiçbirinin çimlenme üzerine olumlu etkisi yoktur. Pedroza-Manrique ve diğ. (2010) çimlenme ve protokorm gelişiminin bir bitki büyüme düzenleyicisi uygulamadan da başarılabilirliğini belirttikleri çalışmalarında tüm orkidelerin çimlenme için eksojen hormon ilavesine ihtiyaç duymadıklarını belirtmiştir. Ayrıca Godo ve diğ. (2010) naftalen asetik asit (NAA), IAA ve IBA uygulamalarının tohum çimlenmesi açısından orkidelerde sitokinin kullanımından daha zayıf etkilere sahip olduklarını belirtmiştir. Buna karşın, Bektaş ve Sökmen (2016) ise bu çalışmadaki bulgulara paralel olarak artan konsantrasyonda kullanılan IAA'nın aktif kömürlü Orchidmax besiyerinde 60 gün sonunda *S. vomeracea* tohumlarının çimlenme oranını artırdığını, benzer bir artışın daha sınırlı olarak IBA uygulamasında da gözlemlendiğini belirtmişlerdir. IAA besiyerinde stabilitesi IBA'ya göre zayıf olan ve ışıqla birlikte kolayca okside olup bozunabilen fakat IBA'ya oranla mobilitesi yüksek bir bitki büyüme düzenleyicisidir (Acemi ve diğ., 2013). IAA'nın düşük konsantrasyonlarda zayıf kalan bu etkisi foto-oksidasyonuna bağlanabilir. IBA ise doku içerisinde hareket kabiliyeti yüksek moleküler ağırlığına bağlı olarak daha sınırlı olan bir oksindir. Buna karşın protokorm oluşumunu verilerden görüleceği üzere kontrole oranla önemli ölçüde artırmıştır. Bu bulgunun aksine Bektaş ve Sökmen (2016) kontrole oranla IBA uygulamasının *S. vomeracea* kültürlerinde protokorm oluşumunda kayda değer bir artışa sebep olmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan KN besiyerinin IBA ile takviyesinden elde edilen kontrole kıyasla protokorm oluşum başarısı aktif kömürlü Orchidmax besiyerinde gözlenmemesinin nedeni aktif kömürün besiyeri içindeki sadece toksik maddeleri değil kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerini de yüksek absorpsiyon kabiliyeti nedeniyle kendine bağlamasıdır (Thomas, 2008).

Adventif köklenme doku kültürlerinde aynı anda endojen ve eksojen oksin seviyeleri, mineral beslenme, ışık ve sıcaklık gibi birçok faktör tarafından kontrol edilmektedir (Da Costa ve diğ., 2013). Bununla birlikte, oksinler köklenme konusunda anahtar rol oynarlar. IBA'nın adventif kökler oluşturmadaki üstünlüğü çeşitli raporlarda bulunabilir (Acemi ve diğ., 2013, Quambusch ve diğ., 2017). Bununla birlikte IBA uygulamasının IAA uygulamasına kıyasla *S. vomeracea*'de yumru oluşumunu artırdığı Bektaş ve Sökmen (2016) tarafından da bildirilmiştir. Ayrıca, IBA'nın diğer bir oksin türü olan NAA uygulamasına oranla *Cymbidium mastersii*'nin kök uzunluğu ve kök sayısı parametrelerinde artış sağladığı rapor edilmiştir (Mohanty ve diğ., 2012).

4.1.11. Besiyerine jasmonik asit ilavesi

S. vomeracea tohumlarının çimlenmesi üzerine JAS uygulamaları olumlu bir etki yapmamıştır. Literatürde JAS uygulamaları çoğunlukla *in vitro* yumru oluşumunun teşviki için patates ve benzeri bitkilerde tercih edilmektedir. Jasmonatların şeker patates (*Dioscorea* spp.), sarımsak (*Allium sativum*) ve *Narcissus triandrus* gibi monokotiledonlarda, patates (*Solanum tuberosum*) ve Kudüs enginarı (*Helianthus tuberosus*) gibi dikotiledonlarda yumru ve soğan gibi depolama organlarının oluşumunu teşvik ettiği bildirilmiştir (Koda 1994; Abdala ve diğ., 1996; Jasik ve Mantell 2000; Kenar ve diğ., 2017). Yumru oluşumu çoğunlukla hücrelerin uzamayı takiben şişmesi ile başlar. Jasmonatların ise yumru ve soğan oluşumunu hücre bölünmesini tetiklenmesiyle artırdıkları bilinmektedir (Debeljak ve diğ., 2002). *S. vomeracea*'de JAS uygulaması protokorm oluşum oranını kontrole kıyasla artırmıştır. Bunun yanında sürgün ve kök uzunluklarında artış da kaydedilmiştir. Bu yüzden *S. vomeracea* kültürlerinde JAS uygulamaları sadece yumru oluşumunu teşvik edici özellikte değil aynı zamanda hücre uzamasını teşvik edici özellikte oldukları sonucuna varılmaktadır. Jasmonatlar bitkilerde aynı salisilik asit gibi stres faktörlerine cevaben sentezlenirler. Bu nedenle dışardan yapılan bir JAS uygulamasının bitkide strese bağlı çeşitli moleküler mekanizmaları harekete geçireceği ve bunun da endojen büyüme düzenleyicilerinin miktarında geçici bir artışa neden olabileceği bildirilmiştir (Teixeira da Silva, 2012; Ha ve diğ., 2012). *S. vomeracea* kültürlerinde *in vitro* yumru oluşturma başarısı JAS uygulamasının bu elisitör etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca mekanik yaralama gibi

stres faktörleri de JAS öncülü olan linoleik asit miktarını artırmakta ve bu da dolaylı olarak JAS sentezini tetiklemektedir (Chitarrini ve diğ., 2017). *S. vomeracea* kültürlerinde ise jasmonik asit kullanımının etkilerine ait daha önce bildirilmiş bir veri bulunmamaktadır.

4.1.12. Besiyerine kitosan ilavesi

Besiyerine DP 2-15 oligomerik kitosan karışımı ilavesi düşük konsantrasyonlarda *S. vomeracea* tohumlarının çimlenmesini artırsa dahi çimlenme üzerine esas olumlu etkiyi yine düşük konsantrasyonlarda kullanılan DP 70 polimerik kitosan sergilemiştir. Yaklaşık DP değeri 220 olan büyük polimerik kitosan uygulaması ise bu parametre için kontrole yakın değerler vermiştir. Kitin, bir *N*-asetil-D-glukozamin polimeri, kitosan ise bir D-glukozamin ve *N*-asetil-D-glukozamin kopolimeridir. Yaygın olarak kitosanlar yüklü ve polar moleküller ile güçlü etkileşimlere girerler. Bir kitosan polimerinde tekrar eden kitosan birimleri birim başına 8-9 bölgede polar moleküller ile hidrojen bağları oluşturabilir. Kitosan, polimerik zincirler arasında iyonik köprüler yoluyla ağ oluşumuna yol açan negatif yüklü moleküller ile reaksiyona girebilir. Dolayısıyla bu ağ bir hidrojel gibi davranabilir. Hidrojeller, suda veya biyolojik sıvılarda şişme yapabilen ve şişmiş durumda çok miktarda sıvı tutabilen üç boyutlu hidrofilik polimer ağlardır (Mengatto ve diğ., 2013). Kitosanın bu hidrofilik özelliği polimerik zincirin uzunluğuyla da doğru orantılıdır. Dolayısıyla DP 70 (10 kDa) polimerik kitosan uygulamasının besiyerinin osmotik potansiyelini düşürmek suretiyle bu olumlu etkiyi yaptığı düşünülmektedir. Nitekim tohumların besiyerine ekilmeden su potansiyelinin polietilen glikol 6000 (PEG 6000) uygulamasıyla ayarlandığı çözeltilerde bekletildiği bir doku kültürü çalışmasında *Orchis palustris* tohumlarının çimlenme oranının azalan su potansiyeliyle bitlikte arttığı rapor edilmiştir (Esitken ve diğ., 2004). Besiyerinde aktif kömür kullanılmamasına rağmen DP 70 polimerik kitosan uygulaması yüksek çimlenme oranı sağlamıştır.

Kitosanlar büyüme artırıcı rollerinin dışında bitkilerde oluşan ve strese bağlı bir takım tepkiler için uyarıcı görevi görmektedirler. Bitkilerde bir stres faktörü gibi H₂O₂ oluşumunu tetikleyebilirler (Pichyangkura ve Chadchawan 2015). H₂O₂ ise bitkiler için sadece zararlı bir molekül değil aynı zamanda bir sinyal molekülü olarak

görev almaktadır. H_2O_2 seviyesindeki kabul edilebilir bir artış endojen sitokinin seviyelerinde geçici bir artışa sebep olmaktadır (Ha ve diğ., 2012). Dolayısıyla kitosan uygulamalarının protokorm oluşturma başarısı kitosanın bu özelliğine atfedilebilir. Bu çalışmada sürgün uzunluğu parametresinin oligomerik kitosan uygulamasıyla birlikte arttığı bulunmuştur. Vasconsuelo ve diğ. (2004), kitosanın bitkilerde lignin biyosentezinde ve hücre duvarı lignifikasyonunda uyarıcı rol oynadığını belirtmiştir. Bu nedenle, *S. vomeracea*'de kitosan uygulamalarıyla sürgün ve yaprak büyümesinin teşvik edilmesinin nedenlerinden biri, lignifikasyondaki bu artış olabilir (Bayraktar ve diğ. 2016). Buna rağmen oligomerik kitosanın bu olumlu etkisi besiyerindeki konsantrasyonuyla ters orantılıdır. Besiyerinde fazla miktarda kitosan kullanımı orkidede şiddetli stres yanıtlarını da beraberinde getirmiş olabilir. Benzer bir etki $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kitosan uygulamasından sonra *Dendrobium* türlerinden de rapor edilmiştir (Pornpienpakdee ve diğ., 2010). Bu çalışmada *S. vomeracea*'de oligomerik kitosanın artan konsantrasyonlarda kök uzunluğunu azalttığı, polimerik kitosanın ise artırdığı tespit edilmiştir. Buna karşın oligomerik kitosan düşük konsantrasyonlarda kök sayısını hem kontrole hem de polimerik kitosan uygulamasına oranla son derece artırmıştır. Oligomerik kitosanın bu kök gelişimini sayıca uyarıcı etkisi çilekte (El-Miniawy ve diğ., 2013) ve kivide de gösterilmiştir (Corsi ve diğ., 2015). Bununla birlikte her iki rapor da kitosan uygulamasının köklerde kuru ve yaş ağırlığı artırdığını vurgulamıştır. Bu durum aynı zamanda kök sayısı ve/veya uzunluklarının da arttığı anlamına gelmektedir. Başka bir çalışmada ise DP 70 ve DA %15 olan bir kitosan polimerinin *Arabidopsis* köklerinde oksin homeostazını etkilediği ve dokularda IAA birikimini tetiklediğini ortaya koymuştur. Araştırmacılar yüksek konsantrasyonda kitosanın *Arabidopsis*'in kök apikal meristeminde ($0,1-1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5) geninin ifadesini azaltmak suretiyle kök gelişimini baskıladığını bulmuşlardır. WOX5 geni, kök dokusunun hücre bölünmesinin düzenlendiği kök ucu merkezindeki (quiescent center) hücrelerin hücresel aktivitelerini düzenlemekten sorumludur (Lopez-Moya ve diğ., 2017). Bu bulgu, kitosan oligomerinin artan konsantrasyonlarda kullanımının kök uzunluğunu azaltmasının bir nedeni olabilir. Buna karşın polimerik kitosan artan konsantrasyonlarla birlikte kök parametrelerinde başarı sağlamıştır. Lopez-Moya ve diğ. (2017) çalışmalarında polimerik kitosan uygulamasıyla olumsuz kök gelişimi sonucuna varmalarının bir nedeni de son derece

yüksek konsantrasyonda kitosan kullanımlarıdır. Bu tez çalışmasında en fazla 20 mg·l⁻¹ kitosan uygulanırken, adı geçen çalışmada 100-1000 mg·l⁻¹ (0,1-1 mg·ml⁻¹) kitosan uygulamasından sonra bu sonuca varılmıştır. Tüm bu tartışmaya rağmen kitosan oligomer ve polimerlerinin moleküler etki mekanizmaları hala model bitkiler üzerinde açıklanmaya muhtaçtır. *S. vomeracea* kültürlerinde ise kitosan kullanımının etkilerine ait daha önce bildirilmiş bir veri bulunmamaktadır.

Kitosan uygulamasının etkilerinin gözlemlendiği literatürdeki diğer bazı çalışmalar şu şekilde özetlenebilir; Acemi ve diğ. (2018) *Ipomoea purpurea* üzerine yaptıkları doku kültürü çalışmasında oligomerik kitosanların sürgün gelişimini artırmada sitokinin benzeri etkiye sahip olduklarını buna karşın kök uzunluğunu azalttığını göstermişlerdir. Demiray ve diğ. (2012) *Odontoglossum grande* (Kaplan orkidesi) için bir mikroçoğaltım metodu geliştirmişler ve *O. grande*'nin çiçek tomurcuklarını sıvı ve katı ortamda fungal kitosan ve hindistan cevizi sütü katkılı Vacin ve Went (VW) (1949) besiyerinde gelişime bırakmışlardır. Uzak doğunun değerli bir orkide türü olan bu çiçeğin kültürlerinde hindistan cevizi sütü ile birlikte kitosan uygulamasının, ortamda büyüme düzenleyicisi gibi davranarak orkide meristematik tomurcuklarının hızlı ve sağlıklı büyümesini uyardığı saptanmıştır. Genellikle Şubat ayı başında çiçek tomurcuklarını gösteren bitkiden bu ayda eksplant olarak alınan tomurcukların çok sayıda bitkiciğe dönüştüğü gözlenmiştir. Böylece oldukça zor ve yavaş gerçekleşen orkide üretimine pratik ve 2 ay gibi oldukça kısa bir sürede çözüm bulmuşlardır. Prasertsongskun ve Chaipakdee (2011) *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f. protokormlarını sıvı VW ortamında kültüre almışlardır. Bu ortamın içerisine sırasıyla 5, 10, 15, 20 ve 25 mg·l⁻¹ kitosan ekleyip 4 hafta inkübe etmişlerdir. Kontrole kıyasla bütün kitosan uygulamalarının protokorm oluşumunu artırdığını gözlemlemişlerdir. *Dendrobium* orkidelerinde yapılan başka bir çalışmada ise kitosan konsantrasyonları, deasetilasyon derecesi ve kitosanın polimer büyüklüğünün orkide büyümesine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada 10, 20, 40, 80 ve 160 mg·l⁻¹ konsantrasyonlarında kitosan kullanılmış ve 80 ile 160 mg·l⁻¹ konsantrasyonunun protokorm benzeri yapıların (PLB) oluşumu için inhibitör etki gösterdiği belirtilmiştir. Deasetilasyon derecesi olarak % 70, % 80 ve % 90'lık kitosanlar kullanılmış ve % 70 ve % 80 deasetilasyon derecesine sahip kitosanların PLB oluşumunu teşvik ettikleri gösterilmiştir (Pornpienpakdee ve diğ. 2006).

Dendrobium phalaenopsis PLB lerinin *in vitro* ortamda büyütülmesi üzerine farklı moleküler büyüklüklerdeki kitosan uygulamalarının etkilerini deneyen Nge ve diğ. (2006) 1 kDa büyüklüğündeki karides kökenli kitosanın 10 ve 100 kDa moleküler büyüklükteki kitosanolardan daha çok büyümeyi teşvik ettiğini ve meristematik dokulardan PLB oluşumunu tetiklediğini göstermişlerdir. Ayrıca, fungal kökenli 10 kDa boyutundaki kitosan 15 mg·l⁻¹ konsantrasyonda kullanıldığında karides kökenli 1 ve 10 kDa boyutundaki kitosan oligomerlerine oranla PLB gelişimini önemli ölçüde artırdığını göstermişlerdir. Bu nedenle kitosan oligomerinin seçimi moleküler büyüklükleri ve asetilasyon dereceleri göz önüne alınarak yapılmalıdır.

4.2. FTIR Çalışmaları

FTIR çalışmalarından elde edilen bulguların yorumlanabilmesi için incelenen frekans aralıklarındaki bantların hangi moleküllerden kaynaklanan titreşimsel hareketleri temsil ettiklerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla önceki çalışmalardan derlenmiş bantların hangi frekanslarda tespit edildiği ve temsil ettikleri titreşimsel hareketleri gösteren bilgiler Tablo 4.1.'de verilmiştir. Tablodan görüldüğü üzere 2917 - 2921 ve 2848 - 2850 cm⁻¹ frekans aralıklarındaki titreşimsel hareketler çoğunlukla hücre zarlarındaki lipitler ve az miktarda da zar proteinlerindeki CH₂ gruplarının asimetric ve simetric gerilmelerini temsil eder (Türker ve diğ., 2016; Acemi ve diğ., 2016). Hücre zarı lipitlerinin CH₂ grupları, onların yağ asidi kuyruklarını oluşturduklarından *Serapias vomeracea*'nin yaprak dokularında kontrol grubuna oranla değişen ortalama frekans değerleri hücre zarının düzeni ile alakalıdır (Türker ve diğ., 2016). Frekans değerinin yüksek değerlere kayması, gauche konformerlerin artmasına yani lipitlerin daha düzensiz olmasına, düşük değerlere kayması ise trans konformerlerin sayısının artmasına yani lipitlerin daha düzenli olmasına işaret eder (Akkas ve diğ., 2007; Türker ve diğ., 2016). Elde edilen sonuçlara göre her iki frekans aralığında da ortak olarak gözlenen frekans değerinin azalması BAN, COW, JAS ve CHI-10 uygulamalarının tamamının *S. vomeracea*'nin yapraklarındaki hücrelerin zar yapılarının daha düzenli hale gelmesi yani sistemin daha kararlı hale gelmesini sağlamıştır. Benzer bir durum kök dokularında da BAN, COW ve JAS uygulamaları neticesinde görülmektedir. Uygulama konsantrasyonlarına bağlı olarak hücre zarının lipit düzeninde meydana gelen bu farklılıklar, zar lipitleri ile zar proteinleri arasında gerçekleşmiş olan yüksek oranda

lipit-protein etkileşmelerinden kaynaklı olabilir. Bu durum, çapraz bağlı lipit-protein kısımlarının oluşumu ile birlikte değişmiş lipit yapısını ifade eder (Türker ve diğ., 2016; Türker-Kaya ve Huck., 2017). Yaprak dokularında gözlenen en yüksek frekans değerinin her iki frekans aralığı için de PG-20 besiyerinden kaydedilmesi, IBA uygulamasının histidin kinazlar gibi zar yapısına yerleşik proteinlerin aktivasyonuna bağımlı olarak zar lipit yapısında meydana getirdiği modifikasyona işaret edebilir (Choi ve diğ., 2012). Bu durum daha aktif veya daha az aktif zar proteinlerinin varlığını temsil edebilmektedir. Tüm bunlara ek olarak, yapısal bir parametre olan lipit düzenindeki söz konusu artış dolaylı olarak fonksiyonel bir parametre olan zar akışkanlığına da etkileyebilmektedir (Türker ve diğ., 2016). Daha düzenli lipit sisteminin proteinlerle etkileşiminin arttığı düşünülürse, zar lipitlerinin daha az hareketli olabileceği literatürde rapor edilmiştir (Akkas ve diğ., 2007; Türker ve diğ., 2007). Ayrıca 2848 - 2850 cm^{-1} frekans aralığındaki titreşimler az miktarda hücre duvarında bulunan mumsu maddelerdeki CH_2 gruplarından da kaynaklanabilir (Suresh ve diğ., 2016). Buna göre frekansdaki artış, mumsu maddelerin yapılarında gerçekleşen farklılıkların da göstergesi olabilir (Acemi ve diğ., 2016). Spektrumlardan kaydedilen çeşitli piklere ait absorpsiyon değerleri ise titreşimsel hareketlerin kaynaklandığı moleküllerde miktar bilgisini işaret etmektedir (Türker-Kaya ve Huck, 2017). Yaprak dokularında özellikle BAN uygulamaları ile 2917 - 2921 ve 2848 - 2850 cm^{-1} frekanslarındaki bantların absorpsiyonlarındaki istatistiksel olarak anlamlı derecedeki artma, zar lipitlerinin konsantrasyonunda dikkat çekici artıştan kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan CHI uygulamaları kontrol değerlerine yakın absorpsiyonlar ortaya çıkarması, CHI'nın lipit zarlarının miktarlarında çok çarpıcı bir etkiye sebep olmadığı anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, artan CHI seviyeleri zar lipitlerinin miktarında istatistiksel olarak önemli olmasa bile azalmaya neden olmuştur. Kök dokularında ise benzer bir durum JAS uygulamaları neticesinde ortaya çıkmıştır. Zar lipitlerinin miktarlarında meydana gelen farklılıklar 2917 - 2921 ve 2848 - 2850 cm^{-1} bantlarının absorpsiyon değerleri üzerinde etkiliyken, yukarıda da belirtildiği gibi mumsu maddelerin artma ve azalması da özellikle 2848 - 2850 cm^{-1} bandının absorpsiyon değişimlerine katkıda bulunmuştur.

Tablo 4.1. Spektrumların analizinde odaklanılan bantlar ve temsil ettikleri moleküler gruplar

Bant No	Frekans (cm ⁻¹)	Açıklama	Kaynak
1	2917 - 2921	CH ₂ asimetric gerilme: çoğunlukla lipitler, protein	Turker ve diğ., 2007; Renuka ve diğ., 2016; Suresh ve diğ., 2016
2	2848 - 2850	CH ₂ simetric gerilme: lipit, protein ve mumsu maddeler	Turker ve diğ., 2007; Renuka ve diğ., 2016; Suresh ve diğ., 2016
3	1736 - 1740	Karbonil C=O gerilme: lipitler, klorofil Alkil ester C=O gerilme: lipitler, esterleşmiş pektinler	Suresh ve diğ., 2016 Dokken ve Davis, 2007; Szymanska-Chargot ve Zdunek, 2013
4	1680 - 1682	Amid I (protein ikincil yapıdaki β-tabaka ve β-dönüş)	Zhang ve diğ., 1999; Shih ve diğ., 2010; Lahlali ve diğ., 2014
5	1653 - 1657	Amid I (çoğunlukla C=O asimetric gerilme ve C-N gerilme): proteinler ve pektinler	Dokken ve Davis, 2007; Palacio ve diğ., 2014; Acemi ve diğ., 2016
6	1635 - 1640	Amid I (C=O gerilme): protein, pektin, suyla ilişkili selüloz veya lignin, alkaloitler Aromatik C=C gerilme: lignindeki hidrosinamik asit C=C fenolik gerilme: ligninin guayasil halkası	Suresh ve diğ., 2016; Türker-Kaya ve Huck, 2017 Dokken ve Davis, 2007 Dokken ve Davis, 2007
7	1510 - 1515	C=C aromatik gerilme: lignin C=C fenolik gerilme: lignin fenolik iskeleti	Türker-Kaya ve Huck, 2017 Palacio ve diğ., 2014
8	1410 - 1420	Asimetric CH ₃ geriliminde C-H bükülmeleri: lipitler, polisakaritler ve selüloz COO ⁻ simetric gerilme: karboksilat (pektin ester grubu)	Dokken ve Davis, 2007 Kacurakova ve Wilson, 2001; Szymanska-Chargot ve Zdunek, 2013
9	1380 - 1385	C-H simetric bükülme (CH ₂ ve CH ₃): hücre duvarı polisakaritleri, lipit ve protein	Wang, 2012; Suresh ve diğ., 2016; Türker-Kaya ve Huck, 2017
10	1232 - 1245	Amid IV (C=N ve N-H gerilme): çoğunlukla protein (1238-1240: protein ikincil yapı)	Rodriguez-Saona, 2010; Fabian ve Naumann, 2012; Türker-Kaya ve Huck, 2017
11	1200 - 1208	O-H düzlemsel bükülme: selüloz	Lammers, 2008; Türker-Kaya ve Huck, 2017
12	1075 - 1080	C-O halkası gerilme: ksiloglukan (yüksek esterleşmiş pektinler) C-O halkası gerilme: ramnogalakturonan ve β-galaktan (düşük esterleşmiş pektinler)	Wilson ve diğ., 2000; Szymanska-Chargot ve Zdunek, 2013; Türker-Kaya ve Huck, 2017
13	873	C-H bükülme: glukozdaki β-piranoz halkası	Galichet ve diğ., 2001; Hua ve diğ., 2004
14	812	C-H bükülme: mannozdaki β-piranoz halkası	Hua ve diğ., 2004

Lipitler ve klorofillerde karbonil gruplarındaki C=O gerilmelerinden ve yine lipit ve esterleşmiş pektinlerde alkil esterlerdeki C=O gerilmelerinden kaynaklanan titreşimsel hareketler 1736 - 1740 cm^{-1} frekans aralığında kaydedilmiştir. Hemiselülozlar, lignin, protein ve pektik polisakkaritler gibi bitki hücre duvarı bileşenleri kovalent bağ ve diğer bağlar sayesinde birbirleriyle yakın ilişki içindedirler. Bu moleküllerin fonksiyonel özellikleri fenolik maddelerin varlığından etkilenebilir (Peaucelle ve diğ., 2012). Hücre bölünmesi beraberinde hücre duvarı yapımını da hızlandırmaktadır. Bu nedenle odaklanılan bu frekans değerinin absorbansındaki bir artış hücre duvarlarındaki lipit ve esterifiye pektin miktarındaki artışa karşılık gelmektedir (Acemi ve diğ., 2016). Ayrıca frekans değerinin yükselmesi de esterleşme derecesindeki artışa karşılık gelir (Szymanska-Chargot ve Zdunek, 2013). Bu bağlamda, denenen tüm uygulamalar yaprak dokularındaki hücrelerin duvarlarındaki lignin moleküllerinin esterleşme derecesini artırmıştır. Bu durum yaprak dokusunda özellikle BAP ve IAA uygulamalarında baskın olarak görülmüştür. Pektin molekülünün hücre duvarındaki miktarı ise uygulamaların tamamında kontrol grubundan yüksektir. Bunun nedeni bitki büyüme düzenleyicileri ve kitosanın hücre bölünmesini artırması nedeniyle hücre duvarı yapımının ikinci plana atılması olabilir. Bunlara ek olarak, C=O gerilmesi ayrıca zar lipitlerinin sulu kısmına yakın gliserol omurgasından kaynaklıdır (Türker ve diğ., 2007; Türker ve diğ., 2016). Bu bandın frekans değerindeki artma C=O gruplarının hidrojen bağı yapma kapasitesindeki azalmayı temsil eder (Türker ve diğ., 2016). Tüm uygulamaların etkisiyle bu bandın frekansındaki artma, zar lipitlerinin C=O gruplarının kendi aralarında daha az miktarda hidrojen bağı yaptığı, diğer taraftan yukarıda belirtildiği gibi esterleşmenin etkisiyle ortamdaki diğer moleküllerle etkileşmelerinin daha fazla olduğu anlamına gelebilir (Akkas ve diğ., 2007). Bu da hücre zarı lipitlerinin paketlenmesinde farklılıklara yol açacaktır (Acemi ve diğ., 2016; Türker-Kaya ve Huck, 2017).

Amid I bandı genel olarak 1700 - 1600 cm^{-1} frekans aralığında kalan bölgeyi temsil eder. Amid I bandı proteinlerin ikincil yapıdaki α -heliks, β -tabaka ve β -dönüş gibi ikincil yapıları tarafından modüle edilen peptit bağlarındaki C=O gerilmeleriyle karakterize edilir (Türker ve diğ., 2007). Odaklanılan 1680 - 1682 cm^{-1} frekans aralığı proteinlerin ikincil yapısındaki β -tabaka ve β -dönüşler, 1653 - 1657 cm^{-1}

frekans aralığı çoğunlukla protein ve pektin kaynaklı C=O asimetrik ve C-N gerilmeleri, 1635 - 1640 cm^{-1} frekans aralığı ise (protein, pektin, suyla ilişkili selüloz veya lignin, alkaloit kaynaklı C=O gerilmelerini veya hidrosinamik asitteki C=C gruplarındaki gerilmeyi temsil eder. Özellikle 1680 - 1682 cm^{-1} frekans aralığı sadece protein kaynaklı olduğu için bu bandın absorbands değerlerindeki artışlar protein miktarındaki artışa karşılık gelmektedir. Bu noktada belirtilmelidir ki; FTIR spektroskopisi spesifik proteinleri ayırt edemez fakat sadece hücre dışı, plazma zarı, sitoplazma ve nükleer proteinler de dahil olmak üzere *S. vomeracea*'nin tüm protein profili ile ilgili bilgi sağlayabilir (Türker ve diğ., 2007). Bu çalışmada, frekans değerleri arasında uygulamalardan kaynaklanan önemli bir fark bulunmaması, kitosan ve BBD'lerin protein ikincil yapılarında farklılık yaratmak üzere çok etkin bir role sahip olmadıkları anlamına gelmektedir (Türker ve diğ., 2017; Türker-Kaya ve diğ., 2017). Yine, Amid I modunun kök dokularının spektrumlarındaki absorbands değerlerinde kontrole oranla BAN uygulamaları neticesinde bir artış meydana gelmesi, BAN uygulamasının protein miktarında artışa neden olduğunu göstermektedir.

1653 - 1657 cm^{-1} frekans aralığında ise titreşimlere sadece protein değil pektinde de kaynaklanan bir katılım bulunmaktadır. BAN ve CHI-10 uygulamaları neticesinde absorbandslarda gözlenen düzenli artış bu uygulamaların hem protein hem de pektin miktarını artırdığını ifade etmektedir (Acemi ve diğ., 2016). Bunun nedeni muz homojenatının sahip olduğu çeşitli büyüme faktörleri ile kitosanın bir stres faktörü gibi davranarak endojen sitokinin miktarında neden olduğu geçici artış olabilir (Acemi ve diğ., 2017). Çünkü sitokininler ve büyüme faktörleri protein sentezinin uyarılmasında rol oynamaktadırlar. Bir sentetik sitokinin olan metatopolinin *Raphanus sativus* kotiledonlarında bazı proteinlerin miktarını artırdığı bildirilmiştir (Çağ ve Palavan-Ünsal, 2003). Aynı durum pektin için de geçerlidir. Bu uygulamalar bitki gelişimi parametreleri açısından da olumlu sonuçlar vermişlerdir. Bu durum da anılan uygulamaların hücre bölünmesini uyardığına işaret etmektedir. Mitotik bölünmeye hazırlık aşamasında gözlenen bitki hücre genişlemesi sırasında orta lamelin oluşturulduğu ve böylece pektik maddelerin üretildiği bilinmektedir (Evert ve Eichhorn, 2005).

Odaklanılan 1635 - 1640 cm^{-1} frekans aralığında ise titreşimlere proteinin yanında pektin, suyla ilişkili selüloz veya lignin ve alkaloidler de katılmaktadır (Suresh ve diğ., 2016; Türker-Kaya ve Huck, 2017). Frekanstaki yükselmeler lignin ve selüloz açısından su bağlama kapasitelerinin arttığı sonucunu çıkarabilir. Dolayısıyla IAA uygulamaları anılan biyopolimerlerin yapısında bu yönde bir etki yaparken, BAP uygulamaları su bağlama kapasitesinde bir azalmaya işaret etmektedir. *S. vomeracea*'nin kök dokularında CHI-1 uygulaması neticesinde konsantrasyonla doğru orantılı olarak protein, su bağlı pektin ve ligninler, hidrosinamik asit ve genel olarak alkaloit miktarlarındaki artıştan söz edilebilir. Bu moleküller için en dikkat çekici artış 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ JAS uygulaması sonucu meydana gelmiştir.

Bitki dokularında lignini işaret eden ana frekans aralığı 1510 - 1515 cm^{-1} olarak belirtilmektedir. Bu aralık lignindeki guayasil halkası ve ligninin genel fenolik iskeletindeki fenolik yapılarındaki C=C gruplarının gerilimini ifade etmektedir (Palacio ve diğ., 2014). Genel olarak tüm uygulamalar yaprak dokularında ligninleşmeyi artırmıştır. BAN uygulamaları neticesinde meydana gelen lignleşmenin boyutu ise oldukça dikkat çekicidir. Bu durum bitki gelişimi üzerine muz homojenatının yaptığı olumlu etkiyi vurgulamaktadır. Kök dokularında ligninleşme ise düşük konsantrasyonda JAS ve CHI uygulamalarıyla artmıştır. Diğer hücre duvarı bileşenlerinden olan selüloz ve pektin lipitler ve polisakkaritlerin de katılımıyla 1410 - 1420 cm^{-1} frekans aralığında lipitler, polisakkaritler, selüloz ve pektik maddeler sırasıyla CH_3 gruplarındaki asimetric gerilim ve COO^- gruplarındaki simetric gerilim ile gözlenmektedir. Artan konsantrasyonlarda BAN uygulaması neticesinde *S. vomeracea* yaprak dokularında bu moleküllerin miktarlarında artış gözlenmiştir. CHI uygulamaları ise sadece en düşük konsantrasyonda kullanıldıklarında pektik madde ve selüloz miktarında kontrole oranla artışa sebep olmuşlardır. Bölünmek üzere büyüyen bitki hücresi hızlı genişlemeyi teşvik etmek için selülozun hemiselüloza dönüşümünü uyarır. Bu durum hücre duvarının genişlemek için daha esnek hale gelmesine ve absorbanstaki artışın hücre büyümesi sırasında selülozdan hemiselülozun dönüşümünü temsil edebileceğini gösterir (Türker ve diğ., 2007; Acemi ve diğ., 2016).

Hücre duvarı bileşenlerini ifade eden diğer bir frekans aralığı ise 1380 - 1385 cm^{-1} olarak belirtilmiştir. Bu aralık hücre duvarı polisakkaritleri, lipit ve proteinlerdeki

CH₂ ve CH₃ gruplarındaki C-H simetrik bükülmelerinden kaynaklanan titreşimleri ifade eder (Wang, 2012). Bu moleküllerin konsantrasyonlarındaki artış kök dokularında sadece düşük konsantrasyonda BAN ve COW uygulaması sonucunda açığa çıkmıştır. Bunun nedeni yukarıda belirtildiği gibi içerdikleri doğal büyüme faktörleri olabilir.

Proteinlere özgü diğer bir bant olan Amid IV, proteinlerin yapılarındaki C=N ve N-H gerilmelerinden kaynaklanan titreşimleri ifade eder ve 1232 - 1245cm⁻¹ frekans aralığında gözlenir. COW uygulamalarının sonucunda bu frekans değerindeki absorbanslar düşük olduğu için hesaplanmamıştır. BAN ve KIN uygulamaları yaprak dokularında bu bağlara sahip proteinlerin miktarında artışa neden olmuştur. Bunun yanında CHI-10 uygulaması ise artan konsantrasyonlarla birlikte bu proteinlerde artış gözlenmiştir. Amid IV bandından elde edilen bu sonuç, amid I bandı sonucu ile örtüşmektedir.

Bitki dokularında bulunan selülozdaki O-H gruplarının düzlemsel bükülmesinden kaynaklanan titreşimleri ifade eden frekans aralığı 1200 - 1208cm⁻¹ olarak ifade edilmektedir (Lammers, 2008). Kontrol grubuna oranla genel olarak diğer uygulamalar sonucunda selüloz miktarında düşüş gözlenmesi, 1410 - 1420 cm⁻¹ frekans aralığında kaydedilen titreşimlere katkı yapan selülozdaki durum için de ifade edildiği gibi bitki gelişimi sırasında selülozun hemiselüloza çevrimi nedeniyledir. Bu çevrim birincil hücre duvarı bölünmesinde gerçekleştirilir. Hemiselülozlar selülozdan daha esnek bir yapıya sahip oldukları için hücrelerin genişlemesi ve duvar bölünmesi sırasında tercih edilmektedirler (Kačuráková ve diğ., 2000). Bir hemiselüloz olan ksiloglukandaki C-O halkalarının geriliminden kaynaklanan titreşimlerin de ifade edildiği 1075 - 1080 cm⁻¹ frekans aralığındaki absorbanslarda selüloz için kaydedilen absorbanslara kıyasla olan artış bu yorumu desteklemektedir. Çeşitli pektik maddeleri de ifade eden 1075 - 1080 cm⁻¹ frekans aralığı, yüksek esterleşme derecesine sahip pektinleri veya ksiloglukandaki ve düşük esterleşme derecesine sahip ramnogalakturonan veya β-galaktandaki C-O halkalarının geriliminden kaynaklanan titreşimleri gösterir. Ksiloglukan bir hemiselülozdur, ramnogalakturonan pektik bir polisakkarit ve β-galaktan ise galaktoz polimeri olan bir polisakkarittir. Köklerde düşük konsantrasyonda CHI-10 ve JAS

uygulamaları ile yüksek konsantrasyodaki CHI-1 uygulaması bu moleküllerin miktarlarında önemli artışa sebep olmuştur.

Orkide köklerindeki glukomannanı direkt olarak ölçebilecek bir yöntem henüz bulunmamıştır. Bilinen diğer tüm yöntemler köklerden serbest haldeki glukoz ve mannoz moleküllerinin temizlenip geriye kalan büyük moleküler ağırlıktaki glukomannanın izole edilmesine dayanır. Daha sonra bu polimer glukoz ve mannoz olarak hidrolize edilerek her iki molekülün miktarı ayrı ayrı hesaplanır ve bir formül yardımıyla glukomannan miktarı belirlenmeye çalışılır. Köklerden glukomannan izole etmeden ve FTIR spektroskopisinin avantajlarını kullanarak glukoz ve mannoz moleküllerindeki β -piranoz halkalarından kaynaklanan titreşimlerin şiddetleri belirlenmek yoluyla glukomannan miktarı göreceli olarak belirlenebilir. Bu bağlamda 873 cm^{-1} frekansında kaydedilen titreşimler glukozun, 812 cm^{-1} frekansında kaydedilen titreşimler ise mannozun β -piranoz halkasındaki C-H bükülmelerini vermekte olduğu bildirilmiştir (Hua ve diğ., 2004; Galichet ve diğ., 2001). Dolayısıyla buradan elde edilecek absorbanların toplamı glukomannan miktarlarının kıyaslanmasında kullanılabilir. Toplam absorban değerleri göz önüne alındığında PG-1, PG-2, PG-8, PG-9, PG-12, PG-14, PG-15, PG-16, PG-17, PG-18, PG-21, PG-26, PG-27 ve PG-30 besiyerleri kontrole kıyasla glukomannan miktarlarında artışa sebep olmuşlardır. Özellikle $1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IBA, $20\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ oligomerik kitosan ve $1-2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA içeren besiyerleri en yüksek sonuçları vermişlerdir.

Ayrıntılı FTIR analizlerinden elde edilen sonuçlara göre, çalışma kapsamında test edilen uygulamaların hepsi *S. vomeracea* bitkisi yaprak ve dokularının özellikle primer metabolitleri üzerinde farklı derecelerde yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olmuştur. Tespit edilen bu farklılıklar FTIR spektrumların bant pozisyon ve absorban değerlerinde yansıdıkları için HCA analizi sayesinde aynı uygulama grubu için yaprak ve kök dokularının ayrımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu başarılı ayırım, yaprak ve kök dokuları arasındaki primer metabolitler açısından moleküler farklılıkların yani heterojenitenin varlığından kaynaklıdır. Söz konusu dokular arasındaki bu farklılıklar uygulamaların etkisi ile birlikte FTIR spektroskopisi ile ölçülebilir seviyede kalmıştır. Diğer taraftan, yaprak ve köke ait spektrumların aynı gruplarda kümelenmesi ile aynı dokuların moleküler benzerliklerini ortaya koymaktadır. Fakat sadece BAP uygulamasında çok başarılı

bir ayrımın elde edilememesinin nedeni, uygulanan her bir BAP konsantrasyonunun dokularda birbirinden bağımsız olacak şekilde fizyolojik değişikliklere sebep olmasıdır. BAP etkisiyle gerçekleşen yaprak ve kök dokularının primer metabolitlerinin yapısal ve fonksiyonel değişimleri, aynı dokular arasındaki homojenite ve farklı dokular arasındaki heterojenitenin ortadan kalkmasına neden olmuştur. Bunlara ek olarak, tüm spektrumların katıldığı HCA analizi sonucuna göre tüm örneklerde her bir uygulama grubunun bir küme içinde gruplanamaması yine aynı şekilde bazı farklı uygulamaların benzer heterojenite ya da homojenite yarattığı anlamına gelebilir. Diğer taraftan şekilden de görüldüğü üzere CHI gibi bazı grupların birbirine yakın şekilde kümelenmesi bu uygulamaların diğer uygulamalardan çok farklı olarak ayırt edilebilir etkiler yarattığını göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının sonucunda elde edilen kazanımlar genel hatlarıyla şu başlıklar halinde özetlenebilir;

- Canlılığını kaybetmiş tohumları ve/veya döllenenmemiş *Serapias vomeracea* tohum taslaklarını yüzeysel sterilizasyon basamağında ortamdaki ayırmak için pratik bir metot geliştirilmesi.
- *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi ve protokorm oluşumu için etkili ve emsallerine kıyasla düşük maliyetli bir besiyeri bileşimi tanımlanması.
- Polimerik kitosanın *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi ve bitkinin büyütülmesi için oligomerik kitosandan daha uygun olduğunun belirlenmesi.
- Polimerizasyon derecesinin kitosanın yapı-fonksiyon ilişkisi bakımından bitki yetiştiriciliğinde önemli role sahip olduğunun ortaya konulması.
- *S. vomeracea*'de kitosanın hücre duvarı mimarisi üzerindeki etkilerin hassas bir şekilde belirlenmesi.
- FTIR spektroskopisinin sunduğu avantajların bitki doku kültürü uygulamalarına entegre edilmesiyle bitkide gerçekleşen fizyolojik değişimlerin moleküler düzeyde aydınlatılması.

Bulgular ve tartışma ışığında elde edilen ve yorumlanan sonuçlar, kimyasal maddelerden ziyade bazı doğal katkı maddelerinin *S. vomeracea*'nın *in vitro* gelişimine daha fazla katkı sağladığını ortaya koymaktadır. Kitosan ve muz homojenatı bu bağlamda verilebilecek en iyi iki örnektir. Oligomerik ve polimerik kitosan denemelerinden elde edilen farklı sonuçlar bitki yetiştiriciliğinde eğer kullanılacaksa mutlaka iyi karakterize edilmiş kitosanın tercih edilmesini önermektedir. Bu biyobozunur, çevreye zararsız ve doğal polimer iyi karakterize edildiğinde bahçe bitkileri yetiştiriciliğinde ve tarımda sentetik büyüme düzenleyicilere alternatif olarak kullanılabilir. Yine de, kitosanın bu tez çalışmasında ortaya konan etkilerinin bitki türleri arasında farklılık gösterebileceği unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

Abdala G., Castro G., Guinazu M.M., Tizio R., Miersch O., Occurrence of Jasmonic Acid in Organs of *Solanum tuberosum* L. and Its Effect on Tuberisation, *Plant Growth Regul.*, 1996, **19**, 139-143.

Acemi A., Özen F., Kiran R., *In vitro* Propagation of *Amsonia orientalis* Decne. from Nodal Segments of Adult Plants, *Propag. Ornam. Plants*, 2013, **13**(1), 25-32.

Acemi A., Türker-Kaya S., Özen F., FT-IR Spectroscopy Based Evaluation of Changes in Primary Metabolites of *Amsonia orientalis* After *In vitro* 6-benzylaminopurine Treatment, *Not. Bot. Hort. Agrobot.*, 2016, **44**(1), 209-214.

Acemi A., Duman Y., Karakuş Y.Y. Özden K., Özen F., Analysis of Plant Growth and Biochemical Parameters in *Amsonia orientalis* After *In vitro* Salt Stress, *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 2017, **58**, 231-239.

Acemi A., Bayrak B., Çakır M., Demiryürek E., Gün E., El Gueddari N.E., Özen F., Comparative Analysis of the Effects of Chitosan and Common Plant Growth Regulators on *In vitro* Propagation of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth from Nodal Explants, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, DOI: 10.1007/s11627-018-9915-0.

Agampodi V.A., Jayawardena B., Effect of Coconut Water (*Cocos nucifera* L.) Water Extracts on Adventitious Root Development in Vegetative Propagation of *Dracaena purple compacta* L., *Acta Physiol. Plant.*, 2009, **31**, 279-284.

Akkas S.B., Inci S., Zorlu F., Severcan F., Melatonin Affects the Order, Dynamics and Hydration of Brain Membrane Lipids, *J. Mol. Struct.*, 2007, **834-836**, 207-215.

An N.T., Thien D.T., Dong N.T., Dung P.L., Du N.V., Characterization of Glucomannan from Some *Amorphophallus* Species in Vietnam, *Carbohydr. Polym.*, 2010, **80**, 308-311.

Arditti J., *Fundamentals of Orchid Biology*, John Wiley & Sons, New York 1992.

Arvill A., Bodin L., Effect of Short-term Ingestion of Konjac Glucomannan on Serum Cholesterol in Healthy Men, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995, **61**, 585-589.

Asghari-Zakaria R., Maleki-Zanjani B., Sedghi E., Effect of *In vitro* Chitosan Application on Growth and Minituber Yield of *Solanum tuberosum* L., *Plant Soil Environ.*, 2009, **55**(6), 252-256.

Assmann S.M., Armstrong F., Hormonal Regulation of Ion Transporters: The Guard Cell System, Editors: Hooykaas P.J.J., Hall M.A., Libbenga K.R., *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 337-361, 1999.

Çeçen F., Activated Carbon, *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.*, DOI: 10.1002/0471238961.0103200902011105.a01.pub3.

Bañuelos-Hernández K.P., García-Nava J.R., Leyva-Ovalle O.R., Peña-Valdivia C.B., Trejoa C., Ybarra-Moncada M.C., Chitosan Coating Effect on Vase Life of Flowering Stems of *Heliconia bihai* (L.) L. cv. Halloween, *Postharvest Biol. Technol.*, 2017, **132**, 179-187.

Bayraktar M., Naziri E., Akgun I.H., Karabey F., Ilhan E., Akyol B., Bedir E., Gurel A., Elicitor Induced Stevioside Production, *In vitro* Shoot Growth, and Biomass Accumulation in Micropropagated *Stevia rebaudiana*, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2016, **127**, 289-300.

Bektaş E., Cüce M., Sökmen A., *In vitro* Germination, Protocorm Formation and Plantlet Development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), A Naturally Growing Orchid Species in Turkey, *Turk J. Bot.* 2013, **37**, 336-342.

Bektaş E., Sökmen A., *In vitro* Seed Germination, Plantlet Growth, Tuberization, and Synthetic Seed Production of *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq., *Turk J. Bot.*, 2016, **40**(6), 584-594.

Bellusci F., Pellegrino G., Musacchio A., Different Levels of Inbreeding Depression Between Outcrossing and Selfing *Serapias* Species (Orchidaceae), *Biol. Plant.*, 2009, **53**, 175-178.

Borowitzka L.J., Glycerol and Other Carbohydrate Osmotic Effectors, Editors: Gilles R., Gilles-Baillien M., *Transport Processes, Iono- and Osmoregulation, Proceedings in Life Sciences*, Springer, Berlin, 437-453, 1985.

Calamar A., De Klerk G.J., Effect of Sucrose on Adventitious Root Regeneration in Apple, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2002, **70**(2), 207-212.

Chitarrini G., Zulini L., Masuero D., Vrhovsek U., Lipid, Phenol and Carotenoid Changes in 'Bianca' Grapevine Leaves After Mechanical Wounding: A Case Study, *Protoplasma*, 2017, **254**(6), 2095-2106.

Choi J., Lee J., Kim K., Cho M., Ryu H., An G., Hwang I., Functional Identification of OsHk6 as A Homotypic Cytokinin Receptor in Rice with Preferential Affinity for Ip, *Plant Cell Physiol.*, 2012, **53**, 1334-1343.

Chugh S., Guha S., Rao U., Micropropagation of Orchids: A Review on the Potential of Different Explants, *Sci. Hort.*, 2009, **122**, 507-520.

Corsi B., Riccioni L., Forni C., *In vitro* Cultures of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) C.F. Liang & A.R. Ferguson: A Tool to Study the SAR Induction of Chitosan Treatment, *Org. Agr.*, 2015, **5**(3), 189-198.

Costa M.L., Civello P.M., Chaves A.R., Martínez G.A., Effect of Ethepon and 6-benzylaminopurine on Chlorophyll Degrading Enzymes and A Peroxidase-Linked Chlorophyll Bleaching During Post-harvest Senescence of Broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 °C, *Postharvest Biol. Technol.*, 2005, **35**(2), 191-199.

Çağ S., Palavan-Ünsal N., The effect of Meta-topolin on Protein Profile in Radish Cotyledons, *J. Cell Mol. Biol.*, 2003, **2**, 31-34.

Da Costa C.T., de Almeida M.R., Ruedell C.M., Schwambach J., Maraschin F.S., Fett-Neto A.G., When Stress and Development Go hand in Hand: Main Hormonal Controls of Adventitious Rooting in Cuttings, *Front Plant Sci.*, DOI: 10.3389/fpls.2013.00133.

Das A.K., Das J., Gogoi H.K., Srivastava R.B., Mass Propagation of Orchids Through *In vitro* Seed Culture Technology, *J. Cell Tissue Cult. Res.*, 2008, **8**(2): 1585-1588.

Das S.N., Madhuprakash J., Sarma P.V.S.R.N., Purushotham P., Suma K., Manjeet K., Rambabu S., El Gueddari N.E., Moerschbacher B.M., Podile A.R., Biotechnological Approaches for Field Applications of Chitooligosaccharides (COS) to Induce Innate Immunity in Plants, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2015, **35**(1), 29-43.

Daud N., Taha R.M., Noor N.N.M., Alimon H., Effects of Different Organic Additives on *In vitro* Shoot Regeneration of *Celosia* sp., *Pak. J. Biol. Sci.*, 2011, **14**(9), 546-551.

David D., Gansau J.A., Abdullah J.O., Effect of NAA and BAP on Protocorm Proliferation of Borneo Scented Orchid, *Vanda helvola*, *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 2010, **18**, 221-224.

Davis P., Davis J., Huxley A., *Wild Orchids of Britain and Europe*, The Hogarth Press, London, 1983.

Debeljak N., Regvar M., Dixon K.W., Sivasithamparam K., Induction of Tuberculosis *In vitro* with Jasmonic Acid and Sucrose in An Australian Terrestrial Orchid, *Pterostylis sanguinea*, *Plant Growth Regul.*, 2002, **36**, 253-260.

Demiray H., Dereboylu A., Yazıcı I., Şenol S., Pirhan A., Bildik S., Doku Kültürü Yöntemiyle *Cycas revoluta*, *Araucaria heterophylla* ve *Odontoglossum grande* Türlerinin Mikroçoğaltımı., *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül, 2012.

Dewir Y.H., El-Mahrouk M.E., Murthy H.N., Paek K.Y., Micropropagation of *Cattleya*: Improved *In vitro* Rooting and Acclimatization, *Hort. Environ. Biotechnol.*, 2015, **56**(1), 89-93.

Ebert A., Taylor F., Blake J., Changes of 6-benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid Concentrations in Plant Tissue Culture Media in the Presence of Activated Charcoal, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 1993, **33**, 157-163.

Edwin F.G., *Plant Propagation by Tissue Culture*, Exegetics Ltd., Edington Wilts, 1993.

Ellis D.I., Goodacre R., Metabolic Fingerprinting in Disease Diagnosis: Biomedical Applications of Infrared and Raman Spectroscopy, *Analyst.*, 2006, **131**(8), 875-885.

El-Miniawy S.M., Ragab M.E., Youssef S.M., Metwally A.A., Response of Strawberry Plants to Foliar Spraying of Chitosan, *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, 2013, **9**(6), 366-372.

Epstein E., Ludwig-Müller J., Indole-3-butyric Acid in Plants: Occurrence, Synthesis, Metabolism and Transport, *Physiol. Plant.*, 1993, **88**, 382-389.

Esitken A., Ercisli S., Eken C., Tay D. Seed Priming Effect on Symbiotic Germination and Seedling Development of *Orchis palustris* Jacq., *HortScience*. 2004, **39**(7), 1700-1701.

Evert R.F., Eichhorn S.E., *Raven Biology of Plants*. W.H. Freeman Press, New York, 2005.

Fabian H., Naumann D., Millisecond-to-minute Protein Folding/Misfolding Events Monitored by FTIR Spectroscopy, Editors: Fabian H., Naumann D., *Protein Folding and Misfolding*, Springer, Berlin, 53-89, 2012.

Freifelder D., *Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, W.H. Freeman Press, New York, 1982.

Galichet A., Sockalingum G., Belarbi A., Manfait M., FTIR Spectroscopic Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Walls: Study of An Anomalous Strain Exhibiting A Pink-colored Cell Phenotype, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, **197**, 179-186.

George E.F., Hall M.A., Klerk G.J.D., Plant Tissue Culture Procedure – Background, Editors: George E.F., Hall M.A., Klerk G.J.D., *Plant Propagation by Tissue Culture*, Springer, Dordrecht, 1-28, 2008.

Gnasekaran P., Rathinam X., Sinniah U.R., Subramaniam S., A Study on The Use of Organic Additives on The Protocorm-like Bodies Growth of *Phalaenopsis violacea* Orchid, *J. Phytol.*, 2010, **2**(1), 29-33.

Godo T., Komori M., Nakaoki E., Yukawa T., Miyoshi K., Germination of Mature Seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl An Endangered Terrestrial Orchid, By Asymbiotic Culture *In vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2010, **46**, 323-328.

Gümüş C., Ellialtıoğlu Ş., Seed Germination and Development of *Serapias vomeracea* (Burm. fil.) Briq. ssp. *orientalis* Greuter in Tissue Culture, *Res. J. Biotechnol.*, 2012, **7**(3), 4-8.

Ha S., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L.S.P., Cytokinins: Metabolism and Function in Plant Adaptation to Environmental Stresses, *Trends Plant Sci.*, 2012, **17**, 172-179.

Hadley G., Harvais G., The Effect of Certain Growth Substances on Asymbiotic Germination and Development of *Orchis purpurella*, *New Phytol.*, 1968, **67**, 441-445.

Haebel S., Bahrke S., Peter M.G., Quantitative Sequencing of Complex Mixtures of Heterochitooligosaccharides by vMALDI-linear Ion Trap Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 2007, **79**(15), 5557-5566.

Hong P-L., Chen J-T, Chang W-C., Plant Regeneration via Protocorm-like Body Formation and Shoot Multiplication from Seed-derived Callus of A Maudiae Type Slipper Orchid, *Acta Physiol. Plant.*, 2008, **30**(5), 755-759.

Huh Y.S., Lee J.K., Nam S.Y., Hong E.Y., Paek K.Y., Son S.W., Effects of Altering Medium Strength and Sucrose Concentration on *In vitro* Germination and Seedling Growth of *Cypripedium macranthos* Sw., *J. Plant Biotechnol.*, 2016, **43**, 132-137.

Jasik J., Mantell S.H., Effects of Jasmonic Acid and Its Methyl ester on *In vitro* Microtuberisation of Three Food Yam (*Dioscorea*) Species, *Plant Cell Rep.*, 2000, **19**, 863-867.

Kačuráková M., Capeka P., Sasinkova V., Wellner N., Ebringerová A., FT-IR Study of Plant Cell Wall Model Compounds: Pectic Polysaccharides and Hemicelluloses, *Carbohydr. Polym.*, 2000, **43**, 195-203.

Kačuráková M., Wilson R.H., Developments in Mid-infrared FT-IR Spectroscopy of Selected Carbohydrates, *Carbohydr. Polym.*, 2001, **44**, 291-303.

Kananont N., Pichyangkura R., Chanprame S., Chadchawan S., Limpanavech P., Chitosan Specificity for The *In vitro* Seed Germination of Two *Dendrobium* Orchids (Asparagales: Orchidaceae), *Sci. Hortic.*, 2010, **124**, 239-247.

Karalija E., Čavar Zeljković S., Tarkowski P., Muratović E., Parić A., Media Composition Affects Seed Dormancy, Apical Dominance and Phenolic Profile of *Knautia sarajevensis* (Dipsacaceae), Bosnian Endemic, *Acta Bot. Croat.*, DOI: 10.1515/botcro-2017-0011.

Kauth P.J., Vendrame W., Kane M.E., *In vitro* Seed Culture and Seedling Development of *Calopogon tuberosus*, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2006, **85**(1), 95-102.

Kenar S., Furtana G.B., Ellialtıoğlu Ş., Tıprıdamaz R., Patateste (*Solanum tuberosum* L.) *In vitro* Mikrotuberizasyon Üzerine Fotoperiyot, Jasmonik Asit ve Aktif Kömürün Etkileri, *YYU J. Agr. Sci.*, 2017, **27**(3), 318-325.

Kitsaki C.K., Zygouraki S., Ziobora M., Kintzios S., *In vitro* Germination, Protocorm Formation and Plantlet Development of Mature versus Immature Seeds from Several *Ophrys* Species (Orchidaceae), *Plant Cell Rep.*, 2004, **23**, 284-290.

Knudson L., A New Nutrient Solution for Germination of Orchid Seed, *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 1946, **15**, 214-217.

Koch K., Carbohydrate-modulated Gene Expression in Plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 1996, **47**(1), 509-540.

Koda Y., Takahashi K., Kikuta Y., Involvement of Jasmonic Acid and Related Compounds in Tuberisation of Jerusalem Artichoke Plants (*Helianthus tuberosus* L.), *Jpn. J. Crop Sci.*, 1994, **63**, 333-338.

Korasick D.A., Enders T.A., Strader L.C., Auxin Biosynthesis and Storage Forms, *J. Exp. Bot.*, 2013, **64**(9), 2541-2555.

Kowalski B., Terry F.J., Herrera L., Peñalver D.A., Application of Soluble Chitosan *In vitro* and in The Greenhouse to Increase Yield and Seed Quality of Potato Minitubers, *Potato Res.*, 2006, **49**, 167-176.

Lahlali R., Jiang Y., Kumar S., Karunakaran C., Liu X., Borondics F., Hallin E., Bueckert R., ATR-FTIR Spectroscopy Reveals Involvement of Lipids and Proteins of Intact Pea Pollen Grains to Heat Stress Tolerance, *Front. Plant Sci.*, 2014, **5**, 747.

Lammers K., Infrared Spectral and Statistical Analysis of Leaf Litter Decomposition from the New Jersey Pine Barrens. Yüksek Lisans Tezi, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, ABD, 2008.

Li Y., Zhang D., Xing L., Zhang S., Zhao C., Han M., Effect of Exogenous 6-benzylaminopurine (6-BA) on Branch Type, Floral Induction and Initiation, and Related Gene Expression in 'Fuji' Apple (*Malus domestica* Borkh), *Plant Growth Regul.*, 2015, **79**(1), 65-70.

Lindemann E.G., Gunckel J.E., Davidson O.W., Meristem Culture of *Cattleya*, *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 1970, **39**, 1002-1004.

Lopez-Moya F., Escudero N., Zavala-Gonzalez E.A., Esteve-Bruna D., Blázquez M.A., Alabadí D., Lopez-Llorca L.V., Induction of Auxin Biosynthesis and WOX5 Repression Mediate Changes in Root Development in *Arabidopsis* Exposed to Chitosan, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 16813.

Luan L.Q., Ha V.T.T., Nagasawa N., Kume T., Yoshii F., Nakanishi T.M., Biological Effect of Irradiated Chitosan on Plants *In vitro*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2005, **41**(1), 49-57.

Malik S.K., Chaudhury R., Kalia R.K., Rapid *In vitro* Multiplication and Conservation of *Garcinia indica*: A Tropical Medicinal Tree Species, *Sci. Hortic.*, 2005, **106**, 539-553.

Mengatto L., Ferreyra M.G., Rubiolo A., Rintoul I., Luna J., Hydrophilic and Hydrophobic Interactions in Cross-linked Chitosan Membranes, *Mater. Chem. Phys.*, 2013, **139**(1), 181-186.

Mohanty P., Paul S., Das M.C., Kumaria S., Tandon P., A Simple and Efficient Protocol for the Mass Propagation of *Cymbidium mastersii*: An Ornamental Orchid of Northeast India, *AoB Plants*, DOI: 10.1093/aobpla/pls023.

Mondal M.M.A., Malek M.A., Puteh A.B., Ismail M.R., Ashrafuzzaman M., Naher L., Effect of Foliar Application of Chitosan on Growth and Yield in Okra, *Aust. J. Crop Sci.*, 2012, **6**(5), 918-921.

Moraes L., Faria R.T., Cuquel F.L., Activated Charcoal for *In vitro* Propagation of Brazilian Orchids, *Acta Hortic.*, 2005, **683**(3), 383-389.

Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I., Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2008, **43**, 134-179.

Murashige T., Skoog F., A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture, *Physiol. Plant*, 1962, **15**, 472-497.

Müller B., Sheen J., Cytokinin and Auxin Interaction in Root Stem-cell Specification during Early Embryogenesis, *Nature*, 2008, **453**(7198), 1094-1097.

Nge K.L., Nwe N., Chandkrachang S., Stevens W.F., Chitosan as A Growth Stimulator in Orchid Tissue Culture, *Plant Sci.*, 2006, **170**, 1185-1190.

Nongdam P., Tikendra L., Establishment of An Efficient *In vitro* Regeneration Protocol for Rapid and Mass Propagation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. Using Seed Culture, *ScientificWorldJournal*, DOI: 10.1155/2014/740150.

Ohta K., Taniguchi A., Konishi N., Hosoki T., Chitosan Treatment Affects Plant Growth and Flower Quality in *Eustoma grandiflorum*, *HortScience*, 1999, **34**(2), 233-234.

Ozek N.S., Tuna, S., Erson-Bensan A.E., Severcan F., Characterization of Micro RNA-125b Expression in MCF7 Breast Cancer Cells by ATR-FTIR Spectroscopy, *Analyst*, 2010, **135**(12), 3094-3102.

Özkoç I., Dalcı M., Germination of the Seeds of *Orchis laxiflora* Lam. (Orchidaceae) through Asymbiotic Culture Techniques, *Turk J. Bot.* 1994, **18**, 461-464.

Palacio S., Aitkenhead M., Escudero A., Montserrat-Martí G., Maestro M., Robertson A.H.J., Gypsophile Chemistry Unveiled: Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy Provides New Insight into Plant Adaptations to Gypsum Soils, *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0107285.

Pan M.J., Van Staden J., The Use of Charcoal in *In vitro* Culture—A Review, *Plant Growth Regul.*, 1998, **26**, 155-163.

Parthibhan S., Rao M.V., Kumar T.S., *In vitro* Regeneration from Protocorms in *Dendrobium aqueum* Lindley – An Imperiled Orchid, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2015, **13**, 227-233.

Peaucelle A., Braybrook S., Höfte H., Cell Wall Mechanics and Growth Control in Plants: The Role of Pectins Revisited, *Front. Plant Sci.*, 2012, **3**(121), 1-6.

Pedroza-Manrique J.A., Serrato-Muñoz L.C., Castaño-Robayo M., Efecto del Carbón Activado y Ácido Indol Acético en el Desarrollo de Protocormos de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. y *Maxillaria nutans* Lindl. *In vitro*, *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 2010, **12**: 86-102.

- Pekin E., *Enstrümental Analiz*, Paradigma Akademi Yayınları, Edirne, 2013.
- Pellegrino G., Bellusci F., Palermo A.M., Functional Differentiation in Pollination Processes among Floral Traits in *Serapias* Species (Orchidaceae), *Ecol. Evol.*, 2017, **7**, 7171-7177.
- Peterson M.A., McMaster S.A., Riechers D.A., Skelton J., Stahlman P.W., 2,4-D Past, Present, and Future: A Review, *Weed Technol.*, 2016, **30**, 303-345.
- Philip R.J., Kakati J.P., Sebestinraj J., Suriya K., *In vitro* Seed Germination of *Cymbidium aloifolium*(L.) Sw., A Potential Medicinal Orchid from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India, *J. Plant Biotechnol.*, 2017, **44**, 343-348.
- Pichyangkura R., Chadchawan S., Biostimulant Activity of Chitosan in Horticulture, *Sci. Hortic.*, 2015, **196**(30), 49-65.
- Ponert J., Vosolsobê S., Kmecová K., Lipavská H., European Orchid Cultivation – from Seed to Mature Plant, *Eur. J. Environ. Sci.*, 2011, **1**(2), 95-107.
- Porat R., Borochoy A., Halevy A.H., Is Jasmonic Acid Involved in the Endogenous Regulation of *Dendrobium* Orchid Flower Senescence?, *Acta Hortic.*, 1995, **405**, 314-319.
- Pornpienpakdee P., Pichyangkura R., Chadchawan S., Limpanavech P., Chitosan Effects on *Dendrobium* ‘Eiskul’ Protocorm-like Body Production. *31st Congress on Science and Technology of Thailand*, Tayland, 18-20 Ekim, 2006.
- Pornpienpakdee P., Singhasurasak R., Chaiyasap P., Pichyangkura R., Bunjongrat R., Chadchawan S., Limpanavech P., Improving the Micropropagation Efficiency of Hybrid *Dendrobium* Orchids with Chitosan, *Sci. Hortic.*, 2010, **124**(4), 490-499.
- Prasertsongsun S., Chaipakdee W., Effect of Chitosan on Growth and Development of *Phalaenopsis cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f., *KU. Sci. J.*, 2011, **39**(1), 113-119.
- Prizão E.C., Gonçalves L.M., Gutierrez M.A.M., Mangolin C.A., Machado M.F.P.S., Activated Charcoal and Graphite for the Micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and A Orchid Double-hybrid 'BLC Pastoral Innocence', *Acta Sci. Agron.*, 2012, **34**(2), 157-161.
- Pruski A., Astatkie T., Duplessis P., Lewis T., Nowak J., Struik P.J., Use of Jasmonate for Conditioning of Potato Plantlets and Microtubers in Greenhouse Production of Minutubers, *Am. J. Pot. Res.*, 2003, **80**(3), 183-193.
- Quambusch M., Groß S., Pscherer T., Winkelmann T., Bartsch M., Improved *In vitro* Rooting of *Prunus avium* Microshoots Using A Dark Treatment and An Auxin Pulse, *Sci. Hortic.*, 2017, **220**, 52-56.
- Rademacher W., Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production, *J. Plant Growth Regul.*, 2015, **34**, 845-872.

Rahman M.H., Islam R., Hossain M., Islam M.S., Role of Sucrose, Glucose and Maltose on Conventional Potato Micropropagation, *J. Agric. Tech.*, 2010, **6**(4), 733-739.

Renuka B., Sanjeev B., Ranganathan D., Evaluation of Phytoconstituents of *Caralluma nilagirina* by FTIR and UV-Vis Spectroscopic Analysis, *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 2016, **5**(2), 105-108.

Rubio-Diaz D.E., Effect of Plant Genotype and Processing Techniques on Stability and Content of Tomato Carotenoids by Infrared Spectroscopy, Doctoral Dissertation, The Ohio State University, 2010.

Schatz C., Viton C., Delair T., Pichot C., Domard A., Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution, *Biomacromolecules*, 2003, **4**, 641-648.

Severcan F., Bozkurt O., Gurbanov, R., Gorgulu G., FT-IR Spectroscopy in Diagnosis of Diabetes in Rat Animal Model, *J. Biophoton.*, 2010, **3**(8-9), 621-631.

Sezik E., *Orkidelerimiz*, Sandoz Kültür Yayınları, İstanbul, 1984.

Sharma U., Kataria V., Shekhawat N.S., *In vitro* Propagation, *Ex vitro* Rooting and Leaf Micromorphology of *Bauhinia racemosa* Lam.: A Leguminous Tree with Medicinal Values, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, DOI: 10.1007/s12298-017-0459-2.

Shekarriz P., Kafi M., Deilamy S.D., Mirmasoumi M., Coconut Water and Peptone Improve Seed Germination and Protocorm Like Body Formation of Hybrid *Phalaenopsis*, *Agric. Sci. Dev.*, 2014, **3**(10), 317-322.

Shih M., Hsieh T., Lin T., Hsing Y.C., Hoekstra F.A., Characterization of Two Soybean (*Glycine max* L.) LEA IV Proteins by Circular Dichroism and Fourier Transform Infrared Spectrometry, *Plant Cell Physiol.*, 2010, **51**(3): 395-407.

Skoog D.A., Holler F.J., Crouch R.S., *Principles of Instrumental Analysis*, 7th ed., Cengage Learning Press, ABD, 2014.

Sood N., Baker L.W., Coleman C.I., Effect of Glucomannan on Plasma Lipid and Glucose Concentrations, Body Weight, and Blood Pressure: Systematic Review and Meta-analysis, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, **88**, 1167-1175.

Sotiropoulos T., Molassiotis A.N., Mouhtaridou G.I., Papadakis I., Dimassi K.N., Therios I.N., Diamantidis G., Sucrose and Sorbitol Effects on Shoot Growth and Proliferation *In vitro*, Nutritional Status and Peroxidase and Catalase Isoenzymes of M 9 and MM 106 Apple (*Malus domestica* Borkh.) Rootstocks, *Eur. J. Hort. Sci.*, 2006, **71**(3), 114-119.

Suresh S., Karthikeyan S., Jayamoorthy K., FTIR and Multivariate Analysis to Study the Effect of Bulk and Nano Copper Oxide on Peanut Plant Leaves, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices.*, 2016, **1**, 343-357.

Swamy M.K., Mohanty S.K., Anuradha M., The Effect of Plant Growth Regulators and Natural Supplements on *In vitro* Propagation of *Pogostemon cablin* Benth., *J. Crop Sci. Biotechnol.*, 2014, **17**(2), 71-78.

Szymanska-Chargot M., Zdunek A., Use of FT-IR Spectra and PCA to the Bulk Characterization of Cell Wall Residues of Fruits and Vegetables Along A Fraction Process, *Food Biophys.*, 2013, **8**(1), 29-42.

Teixeira da Silva J.A., Jasmonic Acid, but not Salicylic Acid, Improves PLB Formation of Hybrid *Cymbidium*, *Plant Tissue Cult. Biotechnol.*, 2012, **22**(2), 187-192.

Teixeira da Silva J.A., Chan M.T., Sanjaya Chai M.L., Tanaka M., Priming Abiotic Factors for Optimal Hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) PLB and Callus Induction, Plantlet Formation, and Their Subsequent Cytogenetic Stability Analysis, *Sci. Hortic.*, 2006, **109**, 368-378.

Thomas T.D., The Role of Activated Charcoal in Plant Tissue Culture, *Biotechnol. Adv.*, 2008, **26**, 618-631.

Tsai W-T., Chu C-Y., Static Liquid Culture of *Doritaenopsis* Seedlings, *HortScience*, 2008, **43**(1), 206-210.

Türker-Kaya S., Mutlu O., Celikyurt I., Akar F., Ulak G., Tianeptine, Olanzapine and Fluoxetine Show Similar Restoring Effects on Stress Induced molecular Changes in Mice Brain: An FT-IR Study, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2016, **161**, 178-185.

Türker S., Dogan M., Severcan F., The Characterization and Differentiation of Higher Plants by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 2007, **61**, 300-308.

Türker-Kaya S., Huck C.W., A Review of Mid-Infrared and Near-Infrared Imaging: Principles, Concepts and Applications in Plant Tissue Analysis, *Molecules*, DOI: 10.3390/molecules22010168.

URL-1: http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=9560, (Ziyaret tarihi: 21.05.2018).

URL-2: <https://www.cites.org/eng/app/appendices.php>, (Ziyaret tarihi: 21.05.2018).

Utami E.S.W., Hariyanto S., Manuhara Y.S.W., *In vitro* Propagation of the Endangered Medicinal Orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through Mature Seed Culture, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2017, **7**(5), 406-410.

Vacin E., Went F.W., Some pH Changes in Nutrient Solutions, *Bot. Gaz.*, 1949, **110**, 605-613.

Van Staden S., Stewart J., Cytokinins in Banana Fruit, *Z. Pflanzenphysiol.*, 1975, **76**(3), 280-283.

Vårum K.M., Anthonson M.W., Grasdalen H., Smidsrød O., Determination of Degree of *N*-acetylation and the Distribution of *N*-acetyl Groups in Partially *N*-Deacetylated Chitins (Chitosans) by High Field NMR Spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, 1991, **211**(1), 17-23.

Vasconsuelo A., Giulietti A.M., Boland R., Signal Transduction Events Mediating Chitosan Stimulation of Anthraquinone Synthesis in *Rubia tinctorum*, *Plant Sci.*, 2004, **166**, 405-413.

Vujanovic V., St-Arnaud M., Barabé D., Thibeault G., Viability Testing of Orchid Seed and the Promotion of Colouration and Germination, *Ann. Bot.*, 2000, **86**, 79-86.

Vyas S., Guha S., Bhattacharya M., Usha Rao I., Rapid Regeneration of Plants of *Dendrobium lituiflorum* Lindl. (Orchidaceae) by using Banana Extract, *Sci. Hortic.*, 2009, **121**, 32-37.

Wall M.M., Ascorbic Acid, Vitamin A, and Mineral Composition of Banana (*Musa* sp.) and Papaya (*Carica papaya*) Cultivars Grown in Hawaii, *J. Food Compos. Anal.*, 2006, **19**, 434-445.

Wang Y., Application of Fourier Transform Infrared Microspectroscopy (FTIR) and Thermogravimetric Analysis (TGA) for Quick Identification of Chinese Herb *Solanum lyratum*, *Plant Omics*, 2012, **5**(6), 508-513.

Widjanarko S.B., Nugroho A., Estiasih T., Functional Interaction Components of Protein Isolates and Glucomannan in Food Bars by FTIR and SEM Studies, *Afr. J. Food Sci.*, 2011, **5**(1), 12-21.

Wilson R.H., Smith A.C., Kačuráková M., Saunders P.K., Wellner N., Waldron K.W., The Mechanical Properties and Molecular Dynamics of Plant Cell Wall Polysaccharides Studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, *Plant Physiol.*, 2000, **124**, 397-405.

Wu K., Zeng S., Lin D., Teixeira da Silva J.A., Bu Z., Zhang J., Duan J., *In vitro* Propagation and Reintroduction of the Endangered *Renanthera imschootiana* Rolfe., *PLoS One*, DOI:10.1371/journal.pone.0110033.

Yam T.Y., Ernst R., Arditti J., Nair H., Weatherhead M.A., Charcoal in Orchid Seed Germination and Tissue Culture Media: A Review, *Lindleyana*, 1990, **5**, 256-265.

Yamazaki J., Miyoshi K., *In vitro* Asymbiotic Germination of Immature Seed and Formation of Protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae), *Ann. Bot.*, 2006, **98**, 1197-1206.

Yaseen M., Ahmad T., Sablok G., Standardi A., Hafiz I.A., Review: Role of Carbon Sources for *In vitro* Plant Growth and Development, *Mol. Biol. Rep.*, 2013, **40**, 2837-2849.

Yoder J.A., Zettler L.W., Stewart S.L., Water Requirements of Terrestrial and Epiphytic Orchid Seeds and Seedlings, and Evidence for Water Uptake by Means of Mycotrophy, *Plant Sci*, 2000, **156**, 145-150.

Hua Y., Zhang M., Fu C., Chen Z., Chan G.Y.S., Structural Characterization of A 2-O-acetylglucosaminan from *Dendrobium officinale* Stem, *Carbohydr. Res.*, 2004, **339**(13), 2219-2224.

Zahara M., Datta A., Boonkorkaew P., Mishra A., The Effects of Different Media, Sucrose Concentrations and Natural Additives on Plantlet Growth of *Phalaenopsis* Hybrid 'Pink', *Braz. Arch. Biol. Technol.*, DOI: 10.1590/1678-4324-2017160149.

Zhang H., Yamamoto Y., Ishikawa Y., Carpentier R., Characterization of the Secondary Structure and Thermostability of the Extrinsic 16 Kilodalton Protein of Spinach Photosystem II by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *J. Mol. Struct.*, 1999, **513**, 127-132.



KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

- [1] **Acemi A.**, Bayrak B., Çakır M., Demiryürek E., Gün E., El Gueddari N.E., Özen F., Comparative Analysis of the Effects of Chitosan and Common Plant Growth Regulators on *In vitro* Propagation of *Ipomoea purpurea* (L.) Roth from Nodal Explants, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, DOI: 10.1007/s11627-018-9915-0.
- [2] **Acemi A.**, Duman Y., Karakus Y.Y., Özen F., Developmental and Biochemical Analysis of *In vitro* Drought Stress Response in Ornamental European Bluestar (*Amsonia orientalis* Decne.), *Folia Hortic.*, 2018. (Kabul edildi)
- [3] Karakus Y.Y., **Acemi A.**, Işık S., Duman Y., Purification of Peroxidase from *Amsonia orientalis* by Three Phase Partitioning and Its Biochemical Characterization, *Sep. Sci. Technol.*, 2018, **53**(5), 756-766.
- [4] **Acemi A.**, Duman Y., Karakuş Y.Y., Özdener Kömpe Y., Özen F., Analysis of Plant Growth and Biochemical Parameters in *Amsonia orientalis* After *In vitro* Salt Stress, *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 2017, **58**, 231-239.
- [5] Duman Y., **Acemi A.**, Yuzugullu.Y., Özen F., Separation of Catalase from *Amsonia orientalis* with Single Step by Aqueous Two-Phase Partitioning System (ATPS), *Sep. Sci. Technol.*, 2017, **52**(4), 691-699.
- [6] **Acemi A.**, Duruksu G., Özen F., Cytostatic Effects of Methanolic Extracts of *Amsonia orientalis* Decne. on MCF-7 and DU145 Cancer Cell Lines, *Not. Bot. Hort. Agrobot.*, 2017, **45**(1), 36-42.
- [7] **Acemi A.**, Türker-Kaya S., Özen F., FT-IR Spectroscopy Based Evaluation of Changes in Primary Metabolites of *Amsonia orientalis* After *In vitro* 6-benzylaminopurine Treatment, *Not. Bot. Hort. Agrobot.*, 2016, **44**(1), 209-214.
- [8] Gürkanlı C.T., Özkoç İ., Aydın E.B., **Acemi A.**, Özen F., Genetic Diversity of *Amsonia orientalis*, *Biologia*, 2014, **69**(5), 742-749.
- [9] **Acemi A.**, Özen F., Kiran R., *In vitro* Propagation of *Amsonia orientalis* Decne. from Nodal Segments of Adult Plants, *Propag. Orn. Plants*, 2013, **13**(1), 25-32.
- [10] Karakus Y.Y., Toygar H.İ., **Acemi A.**, Duman Y., Özen F., UV-C Stresinin 6-Benzilaminopürin Varlığında Çoğaltılmış *Amsonia orientalis*'in *In vitro* Sürgün Gelişimi ve Antioksidan Enzimleri Üzerine Etkileri, *AKU FeMüBiD.*, 2018, **18**, 44-52.

- [11] **Acemi A.**, Duman Y., Karakus Y.Y., Özen F., Preliminary Investigation on Developmental and Biochemical Responses of *Amsonia orientalis* to Ultraviolet-C Irradiation. *Adv. Hortic. Sci.*, 2018. (Kabul edildi)
- [12] Özen F., **Acemi A.**, Pelin E.G., Ergül H.A., Assessment of Macrophyte Plant Distribution and PAH Contamination in Selected Aquatic Habitats from an Industrialized City; Kocaeli, Turkey, *Biomonitoring*, 2017, **4**, 27-33.
- [13] Terzi M., **Acemi A.**, Ergül H.A., Özen F., PAH and PCB Levels in *Malva sylvestris* L. Specimens Collected from Kocaeli, Turkey, 2016, *Biomonitoring*, **2**, 42-46.
- [14] Duman Y., **Acemi A.**, Toygar H., Yuzugullu Y., Özen F., Tuz Stresi ve BAP Varlığında *Amsonia orientalis*'in Antioksidan Enzimlerinin İncelenmesi, *CBU FBD*, 2016, **12**(3), 543-551.
- [15] **Acemi A.**, Kıran R., Özen F., Balcı S., Baydemir S., İlmaz Ç., Influence of Medium Composition on *In vitro* Propagation of *Amsonia orientalis* Decne., *J. Anatolia Nat. Sci.*, 2013, **4**(2), 1-6.
- [16] **Acemi A.**, Özen F., Kıran R., Development of an Efficient Callus Production Protocol for *Amsonia orientalis*: A Critically Endangered Medicinal Plant. *Eurasia J. Biosci.*, 2012, **6**, 105-112.
- [17] Özen F., **Acemi A.**, Kocaeli'de Yayılış Gösteren Bitkilerin Endemikler ve Tehlike Sınıfları Yönünden Değerlendirilmesi. *Ot Sist. Bot. Dergisi*, 2011, **8**(1), 147-190.
- [18] Özen F., Aksoy Ö., **Acemi A.**, *Bitki Biyoçeşitliliği Laboratuvarı I*, Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, 2014.
- [19] Özen F., Aksoy Ö., **Acemi A.**, *Bitki Biyoçeşitliliği Laboratuvarı II*, Umuttepe Yayınları, Kocaeli, 2017
- [20] Kıran R., **Acemi A.**, Özen F., Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed Production in *Amsonia orientalis* Decne., *International Symposium on Biology of Rare and Endemic Plant Species*, Antalya, Türkiye, 19-23 Nisan 2014.
- [21] **Acemi A.**, Kıran R., Özen F., Kinetin ve 6-benzilaminopürinin *Orchis sancta*'nın *In vitro* Gelişimine Etkileri, 22. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Eskişehir, Türkiye, 23-27 Haziran 2014.
- [22] Terzi M., **Acemi A.**, Ergül H.A., Özen F., PAH/PCB Levels in *Malva sylvestris* from Different Spots of Kocaeli, Turkey, *International Conference on Environmental Science and Technology*, Nevşehir, Turkey, 18-21 June 2013.
- [23] **Acemi A.**, Kıran R., Özen F., Balcı S., Baydemir S., İlmaz Ç., Besi Ortamı Bileşiminin *Amsonia orientalis* Decne.'nin *In vitro* Çoğaltımına Etkisi, *Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi*, Samsun, Türkiye, 01-04 Ekim 2013.

- [24] Özen F., **Acemi A.**, Orkidelerin *In vitro* Çoğaltımında Eksplant Seçiminin Önemi, 2. *Salep ve Orkide Çalıştayı*, İzmir, Türkiye, 25-26 Nisan 2012.
- [25] **Acemi A.**, Terzi M., Ergül H.A., Özen F., Dilovası (Gebze/KOCAELİ)'nden Toplanan Tıbbi ve Yenilebilir Özellikteki *Malva sylvestris* L. (Malvaceae) Örneklerinde Poliklorlu Bifenil (PCB) Birikiminin Araştırılması, *Ekoloji Sempozyumu*, Düzce, Türkiye, 5-7 Mayıs 2011.
- [26] Çökmez B., Özen F., **Acemi A.**, Effects of Cytokinin Type on *In vitro* Shoot Multiplication in Endemic *Lathyrus undulatus* Boiss., *International Congress for Applied Biological Sciences*, Eskişehir, Turkey, 3-5 May 2018.
- [27] Gün E., Bayrak B., Demiryürek E., Çakır M., **Acemi A.**, Özen F., Changes in Photosynthetic Pigment Quantities of *Ipomoea purpurea* Due to *In vitro* Chitosan Treatment, *International Congress for Applied Biological Sciences*, Eskişehir, Turkey, 3-5 May 2018.
- [28] Duman Y.A., Toygar H., Kına A., Balcı S., **Acemi A.**, Yüzügüllü Y., Responses of Biochemical Parameters to Drought Stress of Medicinal Important Plant: *Amsonia orientalis*, *International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*, Paris, France, 22-23 April 2015.
- [29] Duman Y.A., Toygar H., Kına A., Balcı S., **Acemi A.**, Yüzügüllü Y., Zn²⁺ Effect on Biological Properties of *Amsonia orientalis*, *International Conference on New Trends in Chemistry*, Dubai, United Arab Emirates, 24-28 March 2015.
- [30] Yılmaz M., Duman Y., Yüzügüllü Y., Özen F., **Acemi A.**, Purification of Peroxidase from Medicinally Important *Amsonia orientalis* (Blue star), *International Enzymes for Biocatalysis Workshop*, İstanbul, Turkey, 3-5 June 2014.
- [31] **Acemi A.**, Duman Y., Yüzügüllü Y., Yılmaz Y., Balcı S., Özen F., Effect of Salinity on *In vitro* Growth Parameters and Peroxidase Activity of *Amsonia orientalis*, *International Enzymes for Biocatalysis Workshop*, İstanbul, Turkey, 3-5 June 2014.
- [32] **Acemi A.**, Kıran R., Özen F., *In vitro* Germination and Protocorm Formation of a Naturally Growing Salep Orchid in Turkey: *Orchis sancta*, 5th *International Orchid Workshop*, Rende, İtalya, 17-19 June 2013,.
- [33] **Acemi A.**, Özen F., Kıran R., Effects of Media, Gibberellic Acid and Sonication Treatment on *In vitro* Germination of *Serapias vomeracea* Seeds, 5th *International Orchid Workshop*, Rende, İtalya, 17-19 June 2013,.
- [34] **Acemi A.**, Kıran R., Özen F., The Effects of Plant Growth Regulators on the Callus Induction of *Amsonia orientalis*, *Plant Biology Congress*, Freiburg, Germany, 29 July - 3 August 2012.

- [35] **Acemi A.**, Kıran R., Özen F., Micropropagation of *Amsonia orientalis* from Axillary Buds of Field-grown Adult Plants, *Plant Biology Congress*, Freiburg, Germany, 29 July - 3 August 2012.
- [36] Gürkanlı C.T., Aydın E.B., Özkoç İ., **Acemi A.**, Özen F., Determination of Genetic Diversity of *Amsonia orientalis* Endangered in Europe with Some Marker Genes, *Plant Biology Congress*, Freiburg, Germany, 29 July - 3 August 2012.
- [37] Kıran R., **Acemi A.**, Özen F., *Amsonia orientalis*'in (Apocynaceae) *In vitro* Çoğaltımında Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Sürgün gelişimi Üzerine Etkisi ve Bitkiciklerdeki Kalsiyum Miktarı Değişimleri, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.
- [38] **Acemi A.**, Kıran R., Özen F., Mavi Yıldız (*Amsonia orientalis*)'in *In vitro* Çoğaltımında Farklı IAA ve IBA Konsantrasyonlarının Kök Gelişimi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.
- [39] **Acemi A.**, Özen F., Kıran R., Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin *Amsonia orientalis* (Apocynaceae)'in *In vitro* Çoğaltımında Sürgün Gelişimi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.
- [40] Özen F., Kıran R., **Acemi A.**, Mavi Yıldız'ın *In vitro* Sürgünlerden Elde Edilen Yapraklar Kullanılarak Mikroçoğaltımı, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.
- [41] Özen F., Kıran R., **Acemi A.**, Tıbbi Önemi Olan ve Gıda Olarak Kullanılan *Arum italicum* (Yılan yastığı)'un Yaprak ve Yaprak Sapı Eksplantlarından İndirekt Sürgün Rejenerasyonu, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.
- [42] Kıran R., **Acemi A.**, Özen F., *Begonia semperflorens*'in *In vitro* Çoğaltımında Kullanılan Farklı Eksplantların Rejenerasyon Potansiyellerinin Değerlendirilmesi, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012.
- [43] **Acemi A.**, Özen F., Aksoy Ö., Dilovası ve Kocaeli Üniversitesi Umuttepe Yerleşkesi"nde Yetişen *Malva sylvestris* L. (Malvaceae)"in Karşılaştırmalı Morfolojisi ve Anatomisi, *20. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Denizli, Türkiye, 21-25 Haziran 2010.
- [44] Özen F., **Acemi A.**, Kocaeli"de Yayılış Gösteren Bitkiler ve Bunların Tehlike Sınıfları Yönünden Değerlendirilmesi, *20. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Denizli, Türkiye, 21-25 Haziran 2010.

ÖZGEÇMİŞ

1984 Uşak doğumludur. İlk ve orta öğrenimini bu ilde tamamladıktan sonra 2003 yılında Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, O. Ö. Biyoloji Öğretmenliği programını kazandı. 2008 yılında bu programdan mezun olduktan sonra 2009 yılında Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2010 yılında Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. Yüksek lisansını 2011 yılında tamamladı ve daha sonra aynı anabilim dalında doktora öğrenimine başladı. Ulusal ve Uluslararası dergilerde basılmış makaleleri ve ders kitaplarının yanı sıra sempozyum, kongre ve çalıştaylarda sunulmuş çok sayıda sözlü ve poster bildirileri bulunmaktadır. Beş araştırma projesinde araştırmacı olarak görev almış olup bunların biri halen devam etmektedir.