

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FINDIK ZÜRUFU VE GYTJA'DAN IN-VITRO
ÇOĞALTILMIŞ BİTKİLER İÇİN ALIŞTIRMA TOPRAĞI
GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve ÖZDEMİR

Enstitü Anabilim Dalı : ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Saim ÖZDEMİR

Nisan 2021

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FINDIK ZÜRUFU VE GYTJA'DAN IN-VITRO
ÇOĞALTILMIŞ BİTKİLER İÇİN ALIŞTIRMA TOPRAĞI
GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve ÖZDEMİR

Enstitü Anabilim Dalı : ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Merve ÖZDEMİR

15.02.2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Saim Özdemir'e teşekkürlerimi sunarım.

Bana laboratuvar çalışma prensibini öğreten, çalışmalarımı yürütmek için gerekli her türlü bilgi ve imkânı sunan Prof. Dr. Taki Demir, Öğr. Gör. Neslihan Babalı'ya ve laboratuvarda ve derslerde bana yardım eden bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Akademik kariyer sürecim boyunca bana inanan ve maddi manevi desteğini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tezin düzenlenmesi konusunda benden yardımını esirgemeyen değerli akademisyen arkadaşım Muhammed Has'a ayrıca teşekkürlerimi iletirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY	ix
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. In-Vitro Bitki Çoğaltımı.....	4
2.1.1. Dış ortama alıştırma.....	9
2.1.2. Destekleyici kimyasal kullanımı.....	13
2.1.3. Saksı toprağının etkisi.....	19
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Bitki ve toprak substrat malzemeleri.....	24
3.2. Yöntem.....	25

3.3. Yapılan Testler.....	26
3.3.1. Fitotoksisite testleri.....	26
3.4. Deneysel Tasarım	26
3.5. Dış Ortama Alıştırma Koşulları.....	27
3.6. Büyüme Parametreleri.....	27
3.7. İstatistiksel Analiz	28
BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI	29
4.1. Yetiştirme Ortamlarının Fitotoksisitesinin Değerlendirilmesi	33
4.2. Bitki Hayatta Kalma Oranı.....	34
4.3. Bitki Büyüme Parametreleri.....	37
4.4. Dickson Kalite İndeksi	39
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ	41
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABA	: Absisik asit
ACC	: 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit
AM	: Arbusküler mikoriza
AR	: Aktif radyasyon
BA	: 6-benzil adenin
BBD	: Bitki büyüme düzenleyici
ÇO	: Çimlenme oranı
ÇOK	: Çözünmüş oksijen konsantrasyonu
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
Eİ	: Elektriksel iletkenlik
EVB	: Ex vitro bitkiler
FMÇ	: Foto-ototrofik mikro çoğaltma
GÇ	: Gövde çapı
GM	: Glutamin
HB:	: Hemoglobin
İAA	: İndol-3-asetik asit
İBA	: İndol-3-bütirik asit
İP	: İzopentenil adenin
İVB	: İn vitro bitkiler
KH	: Kazein hidrolizat
Kin	: Kinetin
KKMA	: Kök kuru madde ağırlığı
NAA	: α -naftalen asetik asit
NKB	: Nispi kök büyümesi
NTÇ	: Nispi tohum çimlenmesi

OE	: Organik elisitör
ROT	: Reaktif oksijen
SKMA	: Sürgün kuru madde ağırlığı
SU	: Sürgün uzunluğu
TÇİ	: Tohum çimlenme indeksi
TDZ	: Tidiazuron
TKM	: Toplam kuru madde
TMA	: Taramalı elektron mikroskopik analizleri
TTB	: Tarlada transfer edilen bitki
UV	: Ultraviyole



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. Mevcut çalışma çerçevesinde gerçekleştirilene alıştırma koşulları.....	29
Şekil 4.2. Fındık zürufunun farklı büyüklüklerde TEM görüntüleri	30
Şekil 4.3. Seçilen Spektrumlar.....	31
Şekil 4.4. Spektrum 1	31
Şekil 4.5. Spektrum 2.....	32
Şekil 4.6. Spektrum 3.....	32
Şekil 4.7. Alıştırma aşamasından sonra farklı saksı toprağındaki farklı bitki türlerinin hayatta kalma yüzdesi.....	36

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Saksı yetiştirme ortamlarında istenen aralıktaki deneysel malzemelerin fizikokimyasal özellikleri.....	25
Tablo 4.1. Çimlenme testi sonuçları ve gösterge endeksleri	33
Tablo 4.2. Alıştırma döneminden sonra farklı saksı yetiştirme ortamlarında farklı bitki türlerinin hayatta kalma yüzdesi.....	35
Tablo 4.3. Hylocereusundatus, Aloavera, Rosa hybridae ve Loropetalumchinense bitkilerinin çeşitli saksı yetiştirme ortamlarına alıştırılmasının değerlendirilmesi.....	38

ÖZET

Anahtar kelimeler: In vitro bitki; saksı yetiştirme ortamı; odunsu türler; sukulent türler; hayatta kalma oranı

Atık kaynaklı yeni yetiştirme ortamı bileşenlerinin (findık zürufu+gyttja) dört süs bitkisi türünün (*Rosa hybridae*, *Loropetalum chinense*, *Aloa vera*, *Hylocereus undatus*) in vitro olarak çoğaltılmış bitkilerinin dış ortama alıştırılması aşamasındaki etkileri değerlendirilmiştir. Findık zürufu saksı toprağı ana bileşeni, gyttja bitki büyümesine etkili katkı maddesi olarak denenmiştir. Çalışılan tüm findık zürufu + gyttja saksı yetiştirme ortamı kombinasyonlarının fitotoksisite test sonuçları, kontrol olarak kullanılan standart cocopeat karışımı sonuçlarına istatistiki olarak benzer bulunmuştur. Findık zürufu+gyttja kombinasyonlarına dikimi yapılan bitkilerin mortalite oranları cocopeat kontrol uygulamasına benzer olarak *Rosa hybridae* ve *Loropetalum chinense* türlerinde, sukulent türler *Aloa vera* ve *Hylocereus undatus* 'a göre daha yüksek oranda gerçekleşmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgular gyttjanın findık zürufuna %2 ve %5 oranında karıştırılmasının; hayatta kalma oranı, bitki boyu, sürgün ve kök kuru biyokütlesi ile Dickson kalite indeksi üzerinde test edilen tüm bitki türleri için benzer etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre, findık zürufu ve gyttjanın, spesifik bitki türleri için önceden test edildikten sonra en uygun karışım dozları tespit edilerek ex vitro bitkilerin alıştırma aşamasında, saksı yetiştirme ortamı bileşeni olarak başarıyla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

EFFECTS OF ACCLIMATIZATION SOIL PREPARED FROM HAZELNUT HUSK AND GYTTJA ON IN VITRO PROPAGATED ORNAMENTAL PLANTS

SUMMARY

Keywords: In vitro plants; pot growing medium; woody species; succulent species; survival rate

The influence of a new waste resources pot growing medium(hazelnut husk + gyttja) on the acclimatization success of in vitro produced plants of four ornamental species (*Rosa hybridae*, *Loropetalum chinense*, *Aloa vera*, *Hylocereus undatus*) was assessed. Hazelnut husk was considered as a main substrate component and gyttja was plant growth promoter. Phytotoxicity test results for all the combination of hazelnut husk-gyttja pot growing medium studied was similar to the standard cocopeat mixture used as control. Mortality rate of transplanted plantlets on either hazelnut husk or gyttja substrates or standard cocopeat were higher for woody species *Rosa hybridae* and *Loropetalum chinense* compared to the succulent species *Aloa vera* and *Hylocereus undatus*. Findings of this study demonstrated that incorporation of gyttja into the hazelnut husk at a rate of 2% and 5% had similar effects on survival rate, plant height, shoot and root dry biomass, and Dickson Quality Index for all tested plant species, with to the cocopeat control plants. Therefore, hazelnut husk and gyttja could be successfully used as pot growing medium for ex vitro acclimatization, after pre-tested for the specific plant species.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

İn vitro bitki çoğaltım metodu yüksek kaliteli, değerli, nadir, ticari süs bitkilerinin laboratuvar koşullarında hızla ve kitlesel olarak çoğaltıldığı yaygın bir metottur [1, 2]. Bununla birlikte, in vitro bitkiler laboratuvar tüplerinden dış ortam ex vitro koşullarına çıkartıldığında septik ortam [3], düşük oransal rutubet [4], in vitro koşullara kıyasla daha yüksek fotosentetik aktif radyasyon (PAR), ultraviyole (UV) radyasyonu [1] sıcaklık dalgalanmaları, pseudo kökler nedeniyle yetersiz beslenme [5, 6] gibi pek çok nedenle hızla şoka girmekte, mortalite oranları artmakta ve bu yöntemin uygulama başarısı kısıtlanmaktadır [7]. İlave olarak, bu tez çalışmasının konusu olan saksı yetiştirme ortamı bileşenleri de alıştırma aşamasındaki bitkilerin hayatta kalma oranı üzerinde çok önemli etkiye sahip olmaktadır [4].

Saksı yetiştirme ortamlarının dezenfeksiyonu, biyolojik stabilitesi, hava-su dengesi gibi faktörler sadece bitki köklerine tutunma ortamı değil aynı zamanda alıştırmaya gerekli ortamı sağlayarak sağlıklı bitki yaşamını tesis etmek için de önemli yapısal özellikler olarak karşımıza çıkmaktadır [8, 9]. İlave olarak hümit maddeler, büyümeyi hızlandırıcı simbiyotik mikroorganizma veya bitkisel preparatların kullanımı dahil olmak üzere diğer ekolojik ve büyümeye teşvik edici önlemler; in vitro bitkilerin hayatta kalma oranının artırılması için tanımlanabilmektedir [10, 11]. Bu nedenle koruyucu mekanizma, kök gelişiminin teşvik edilmesi, bitkilerin ilk gelişimine fayda sağlayabilecek saksı yetiştirme ortamı bileşenlerinin kullanımı, in vitro bitkiler için düşünülmesi gereken özellikler olmaktadır [12, 13].

Alıştırma dönemi boyunca kademeli olarak değiştirilen çevresel koşullara ilave olarak saksı toprağı düzenleme teknikleri çeşitli çalışmalarda bitkilerin hayatta kalma oranlarını ve dayanıklılığını iyileştirmek için denenmiştir [14]. Saksı yetiştirme ortamlarında kullanılan malzemenin yapısal uygunluğu, hijyenizasyonu yanında bitki büyümesine teşvik eden, iyileştiren malzemeler de in vitro bitkilerin dış ortama

alıştırılmasında etkili olabilmektedir. Örneğin; yetiştirme ortamına hümik maddelerin eklenmesinin köklenmeyi [15], toprak üstü bitki yapılarının büyümesini ve gelişmesini, alıştırma döneminde bitkilerin görsel kalitesini desteklediği gözlenmiştir [16].

Saksı yetiştirme ortamlarının; bitki patojenlerinden arınmış olması, yeterli gaz değişimi ile su tutmayı ve bitkiye su sağlamayı garanti etmesi, biyolojik olarak kullanılabilir besin elementlerini tutması ve bitki kullanımına sunması gibi özellikleri taşıması gerekir [17]. İn vitro bitkilerin hayatta kalmasını optimize etmek, bitki büyüme ve gelişimini hızlandırmak için kullanılabilecek organik veya inorganik pek çok alternatif malzeme vardır. Yaygın ve kitlesel kullanımda tarımsal artık ve atıklar gibi biyolojik kaynaklar büyük bir potansiyel sunmaktadır [18]. Bu bağlamda, yenilenemeyen kaynak olan torf bazlı yetiştirme ortamlarının tamamen veya kısmen değiştirilmesi için farklı organik atık malzemeler, bitki artıkları araştırılmıştır ve araştırılmaya devam etmektedir. Örneğin; cocopeat, odunlu-selülozik kompost ve odun endüstrisi atıkları, olası saksı yetiştirme ortamı için halihazırda test edilmekte olan bazı organik malzemelerdir [2]. Ayrıca leonardit, biochar, kil granülleri ve vermikülit gibi büyümeyi uyarıcı hümik benzeri maddeler de turba ve diğer kombinasyonlarla karıştırılarak kullanılmaktadır [18]. Genel olarak bu çalışmaların temel amacı, bitkiler in vitro ortamdan ex vitro koşullara transfer edildiğinde aşırı terlemeyi sınırlandırmak için kökleri ve koruyucu kütiküler doku oluşumunu hızlandırarak in vitro bitkilerin ölüm oranını azaltmaktır [2, 19]. Çünkü köklerin su alımının azalması ve yapraklardan terlemenin artması, yeni ortamda sık sık kuraklık stresine yol açmakta [19] ve mortalite oranını yükseltmektedir.

Ülkemiz koşullarında saksı yetiştirme ortamı olarak kullanılabilecek önemli bitkisel atıklardan birisi fındık hasat artığı yani fındık zürufudur. Fındık zürufu bazlı saksı yetiştirme ortamı, süs bitkileri için saksı karışımı olarak yaygın bir şekilde kullanılmış olmasına rağmen ex vitro saksı yetiştirme ortamı olarak önerilen fındık zürufunun etkileri hakkında henüz özel bir çalışma yapılmamıştır [20]. Fındık zürufunun, saksı

toprağına karıştırıldığında biyo-stabil bir lif kaynağı sağladığı ayrıca önemli bir makro ve mikro bitki besin kaynağı olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle fındık zürufu içeren köklendirme substratı, küçük bitkilerin gelişimini hızlandırmak için besin sağlayabilir. Diğer yandan linyit madenciliğinin önemli kitlesel atıklarından birisi olan organik bazlı gyttja, potansiyeli olmasına rağmen bitki yetiştiriciliğinde kullanımı yetersiz kalmıştır. Hüyük madde kaynağı olarak gyttja [21]; fidelerde erken aşamada büyümeye teşvik edici özelliğinden dolayı ozmotik basıncı düzenleme, solmayı azaltma gibi nedenlerle dış ortama alışmayı kolaylaştırabilir. Bu nedenle fındık zürufu iyi bir saksı yetiştirme ortamı ve gyttja büyümeyi uyarıcı madde kaynağı olduğu için fındık zürufu ve gyttja kombinasyonları in vitro bitkilerin dış ortama alıştırılmasında denenebilir maddelerdir.

Planlanan bu çalışmada in vitro bitkilerin dış ortama alıştırılmasında gerçekleştirilen önceki çalışmalar ışığında, ana saksı yetiştirme ortamı bileşeni olarak fındık zürufu ve büyümeyi uyarıcı bir bileşen olarak gyttjanın in vitro bitkilerin hayatta kalma oranına etkisi iki odunsu (*Rosa hybridae* ve *Loropetalum chinense*) ve iki sukulent (*Aloa vera*, *Hylocereus undatus*) bitki türünde araştırılmıştır. Çalışmada test edilen hipotez; yerli, milli kaynaklar fındık zürufu ve gyttja atıklarının mikro çoğaltılmış bitkilerin saksı toprağına nakledildiklerinde hayatta kalma oranları ile bitki büyüme performanslarının tespit edilmesidir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. In-Vitro Bitki Çoğaltımı

In-vitro bitki; genel olarak laboratuvar ortamında, besi ortamı üzerinde, tüp içinde çoğaltılan bitki anlamına gelmektedir. Bu tarz bitkiler laboratuvar ortamında yetiştirildiğinden bakımı, uygun yetiştirilme ortamının oluşturulması özenle uygulanması gereken süreçlerdir. İn vitro çoğaltım, tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından hazırlanan ve steril tüp içinde besin ortamları üzerinde genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitkiyi hızlı çoğaltma amacıyla kullanılan bir doku kültürü tekniğidir [22]. Özellikle çoğaltımı zor bitkiler ve tek tip steril bitkiler elde etme amaçlı geniş çaplı kullanılmaktadır. Bu teknik genel olarak üç aşamadan meydana gelmektedir: Çoğaltılması istenen bitki bölümlerinin aseptik koşullarda izolasyonu ve steril hale getirilmesi, hazırlanan besi ortamı kültürü üzerinde büyütülmesi ve ardından dış ortama alıştırılmaları için toprağa ekimi.

Dış ortama alıştırma (ex vitro) başarı oranı en düşük olan aşamadır. Ex vitro koşullara alışma zorluğu ve bu aşamada yüksek oranda gerçekleşen mortaliteden dolayı in vitro bitkilerin kullanımı sıkıntı yaratmaktadır[23]. Bitki kaybına neden olan başlıca faktörler; in vitro bitkilerin yapraklarında koruyucu tabakalarının olmaması, ikincil kök gelişimlerinin zayıf olması veya hiç olmaması ve bunun sonucunda da yapraklardaki aşırı su kaybını kök sisteminin karşılayamaması olarak gösterilmektedir[23]. Ex vitro koşullara çıkarılan bu bitkilerin aşırı su kaybını telafi etmek için bitkiler, bir iki hafta yüksek oransal rutubet ortamlarında tutulmaktadır. Bu koşullar da tam aseptik ortam

sağlayamadığından mikrobiyal bulaşıklıklara neden olmakta ve yine ölüm oranını artırmaktadır.

Mikro çoğaltımın son aşaması, toprağa dikim aşaması ve dış ortam koşullarına alıştırma olarak bilinir. Tüp içinde steril koşullarda büyütülen in vitro bitkiler, septik koşullara aktarılınca dış ortama alışma güçlüğü çeker[1]. İn vitro koşullarda bir nevi heterotrof olarak beslenen bitkiler, alıştırma ortamında tekrar ototrof yeteneklere geri döndürülmeye çalışılır. Dış ortam koşullarında ve özellikle de tarlada, tüp içindeki ortama göre daha düşük hava nemi mevcuttur. Bitkinin ex vitro koşullarda yetiştiği ortamın su alabilme potansiyeli daha düşük olduğundan ve bitkiler yapraklarından su kaybını engelleyemediklerinden hızlı bir şekilde solmaktadırlar. Buna ek olarak, köklerin ve kök ile sap arasındaki bağlantıların düşük hidrolik kondüktivitesinden dolayı su ilavesi de sınırlı kalmaktadır [24]. Çünkü ex vitro koşullarda; bitki büyümesinde anormallikler, kuraklığa karşı hassasiyet ve fotosentezde bozukluklar görülür. Kütikula tabakası üzerindeki mumsu tabaka iyi gelişemediği için bitkilerde su kaybı etkili olarak önlenemez. Kaybedilen suyun yerine hemen su gelemez, kökler yeterince su alamaz, nemlenme, yapraklarda ekrozlar, yaşlanma veya ölüm görülür [25]. Alıştırma, in vitro ile ex vitro koşullar arasında bir geçiş aşamasıdır ve in vitro koşullardaki anormalliklerin alıştırma aşamasında düzeltilerek normal bitki büyümesinin sağlanması gerekir.

Ex vitroda bitki kayıplarının en büyük sebebi, yapraklardaki su kaybı sonucu görülen kurumalar ve köklerden su alımının engellenmesidir. Bu nedenle yetiştirme ortamı olarak kullanılan saksı toprağı ve çevresel koşullar, yaşama oranı ile bitki büyümesi ve gelişiminde büyük rol oynar.

Kök ve yaprak arasındaki su dengesini optimize eden saksı yetiştirme ortamı, bitkilerin hayatta kalmasına yardımcı olur [9]. Ek olarak hümik maddeler ve büyümeyi artıran mikroorganizma veya yan ürünlerin kullanımı dahil olmak üzere diğer ekolojik ve

büyümeye teşvik edici önlemler, bitkilerin hayatta kalması için tamamlayıcı etki göstermektedir [10, 11]. Bitkilerde koruyucu mekanizma, kök gelişiminin iyileştirilmesi, diğer çeşitli faktörlerle bitkilerin ilk gelişimine fayda sağlayabilecek büyümeyi destekleyen teknikler ve saksı yetiştirme ortamı bileşenlerinin kullanımı, in vitro çoğaltılmış bitkiler için denenen başarılı tekniklerdir[12, 13]. Bu çevresel düzenlemelerin yanısıra yetiştirme ortamı veya saksı toprağı özellikleri ve bunların bitki üretimi açısından performansları da önemlidir. Önceki çalışmalar, saksı topraklarına hümik maddelerin eklenmesinin köklenmeyi [15], bitki büyüme ve gelişimini ayrıca alıştırma dönemi boyunca bitkilerin görsel kalitesini desteklediğini göstermiştir [16].

Saksı yetiştirme ortamı; başlangıçta patojenlerden arındırılmış, yeterli gaz değişimine izin veren, su teminini garanti eden ve biyolojik olarak kullanılabilir besinleri koruyan bir kök ortamı sağlar [17]. Fidelerin hayatta kalmasını optimize etmek ve bitkilerin sertleşmesini sağlamak için biyolojik kaynaklar (örneğin; zirai atıklar veya bitki artıkları), saksı toprağı bileşenleri olarak kullanım amacıyla büyük potansiyele sahiptir [18]. Bu bağlamda yenilenemeyen inorganik, turba bazlı saksı topraklarının tamamen veya kısmen değiştirilmesi için farklı organik atık malzemeler, artık maddeler araştırılmıştır. Örneğin; hindistan cevizi kabuğı, selülozik kompost ve ağaç endüstrisi atıkları, olası süs yetiştirme ortamları için halihazırda test edilmekte olan bazı organik malzemelerdir [2]. Ayrıca leonardit, biochar, kil granülleri ve vermikülit gibi büyümeyi uyarıcı hümik benzeri maddeler de turba ve diğer kombinasyonlarla karıştırılarak kullanılmıştır [18]. Genel olarak, bu çalışmaların temel amacı, bitkilerin in vitro ortamdan ex vitro koşullara transfer edildiğinde aşırı terlemeyi sınırlamak için ya kök gelişimini ya da koruyucu kütiküler doku oluşumunu hızlandırarak yeni dikilen in vitro bitkilerin ölüm oranını azaltmaktır [2, 19]. Çünkü su alımının azalması ve terlemenin artması yeni ortamda sık sık kuraklık stresine yol açmaktaydı [19].

Pospisilova ve ark. [26]; Invitro olarak çoğaltılan bitkilerin, ex vitro koşullara transferden sonra çevresel koşullardaki ani değişikliklerden kolaylıkla zarar görebildiğini belirtip yeni koşullara alışmak ve bu süreçte anatomi ve fizyolojilerindeki anormallikleri düzeltmek için birkaç hafta gölgede bekletilmesi ve kademeli olarak oransal rutubetin düşürülmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Bitkilerin hayatta kalmasını belirleyen bitki su dengesinin sağlanması için en önemli değişiklikler olan kütikula tabakasının gelişimi, epikütiküler mumsu tabaka ve transpirasyonu kontrol eden stoma dengesinin oluşturulması gerekliliğini vurgulamışlardır. Bitki büyümesi için fotosentetik parametrelerdeki değişiklikler (klorofil içeriği, kloroplast yapısı, fotosistem 2'nin etkinliği, net fotosentetik oran), tam ototrofik büyüme sağlayan değişiklikler gerçekleşene kadar özel ilgi gerektirmektedir.

İn vitro çoğaltılmış bitkilerin alıştırılması sırasındaki şokları azaltmak için transplantasyon sonrasında absisik asit içeren antitranspiranlar ile terleme oranını düşürme veya CO₂ konsantrasyonu ile fotosentez oranını artırma gibi yöntemlerin uygulanabileceği bildirilmiştir.

Chandra ve ark. [2]; Ticari ölçekte mikro çoğaltmanın nihai başarısının; bitkileri kültür dışına büyük ölçekte, düşük maliyetle ve yüksek hayatta kalma oranları ile transfer etme yeteneğine bağlı olduğunu bildirmiştir. Çünkü, dış ortam koşullarına transfer sırasında in vitro olarak yetiştirilen bitkiler toprak mikroorganizmaları ile rekabet edememekte ve çevre koşullarıyla baş edememektedirler.

İn vitro kültür koşulları; bitkilerin morfolojisini, anatomisini ve fizyolojisini büyük oranda değiştirmektedir. Alıştırma aşamasında; bitkilerde büyümeyi artırmak ve ölüm oranını azaltmak için yapılması gereken çalışmalarda hem fiziksel hem de kimyasal ortamın kontrolü ve mikro çoğaltılmış bitkilerin biyolojik olarak mukavemet kazanması üzerinde durulmuştur. Araştırmacılar in vitro bitkilerin yüksek ölüm oranlarının bir diğer önemli nedeni olarak kök sisteminin toprak mikroflorasına karşı yeterli dirence

sahip olmadığından toprakta bulunan mikrobiyal topluluklara ani şekilde maruz kalmasını göstermişler ve alıştırma toprağının önemini vurgulamışlardır.

Da Silva ve ark. [27]; Literatür taraması çalışmalarında, mikro çoğaltımla üretilmiş *Dendrobium* bitkilerinin ex vitro koşullara alıştırılmasındaki başarısının son ürünün kalitesini belirlediğini vurgulamışlardır. Özellikle hassas bitkilerin in vitro koşullardan dış ortama alındıklarında alıştırma aşaması için önemli önlemler alınmadıkça hızla dehidre olduklarında solabileceklerini ve ortamdaki değişikliklerin bir sonucu olarak ölebileceklerini vurgulamışlardır. İn vitro olarak yetiştirilen *Dendrobium* bitkilerinin ex vitro ortamdaki bağıl neme ve ışık seviyelerine kademeli olarak alıştırılmasının, genç ve fizyolojik olarak hassas bitkilerin hayatta kalmasını kolaylaştırdığını belirtmişlerdir.

İN vitro bitkilerin, anatomik anormallikleri düzeltmek ve ex vitro koşullar altında hayatta kalmayı sağlamak için fizyolojik performanslarını artıracak bir iklime alışma veya geçiş sürecine ihtiyaçları vardır. Alıştırma koşulları altında bitkiler, heterotrofik veya fotomiksotrofik durumdan hızlı bir şekilde ototrofik büyümeye alıştırılır, tamamen fonksiyonel bir kök sistemi geliştirir, stomatal ve kütiküler terlemeyi daha iyi kontrol ederler. Araştırmacılar; dış ortama alıştırmada sisleme odaları kullanılarak bağıl nemin, gölgeleme teknikleri kullanılarak ışık yoğunluğunun ayarlanması ile kademeli bir alıştırma gerçekleştirilmesi gerektiğini ve bu tekniklerin bütün bitkilerde etkili sonuçlar verebileceğini söylemişlerdir.

Aloe vera, ekonomik açıdan önemli bir etli bitkidir ve yüzyıllardır tıbbi özellikleriyle tanınmaktadır. *Aloe vera* için uygulanan in vitro çoğaltma, kısa sürede üreticilerin ilgisini çekip onları üretime teşvik etmiştir. Bununla birlikte mikro çoğaltılmış bitkilerin morfolojisi, anatomisi, fitokimyası ve fizyolojisinde in vitro indüklenen bozuklukların kanıtları bulunmaktadır. Bu anormallikler çalışmada, alıştırma sürecini ciddi şekilde etkileyip tarlada yetiştirilen bitkilerin doku kültürü kaybına neden olmuştur.

Bu nedenle Manokari M. ve arkadaşlarının çalışması [28]; Aloe vera'nın in vitro bitki rejenerasyonunun çeşitli aşamaları sırasında yapraktaki mikro-morfo-anatomik ve histokimyasal değişiklikleri değerlendirmeyi amaçlamıştır. Bu varyasyonlar, bitkilerin laboratuvarından karaya olmak üzere [in vitro (İVB), ex vitro (EVB) ve tarlada transfer edilen (TTB) bitkiler] üç farklı büyüme ve gelişme aşamasında analiz edilmiştir. Transfer edilen bitkiler; polisakkarit (nişasta ve müsilaj) ve fenolik bileşik (taninler, polifenol ve lignin), kütin ve suberin açısından gelişmiş fenotip, yaprak mikro yapıları, yaprak pigmentasyonu (klorofiller ve karotenoidler) ve histokimyasal birikimler göstermişlerdir. Çalışma, dokularda ikincil metabolit birikiminin uygun aşamasını ve bitkilerin toprakta başarılı bir şekilde uyum sağlamasını anlamamızı sağlamıştır. Mevcut bulgular, ticari yetiştirme uygulamalarında aloe veranın kitlesel yayılma (in vitro) potansiyelini değerlendirmek için uzun vadeli çabayı özetlemiştir.

2.1.1. Dış ortama alıştırma

Mikro çoğaltılmış bitkilerin başarılı bir şekilde dış ortama alıştırılması ve daha sonra sahaya aktarılması, in vitro teknolojinin ticari kullanımı için çok önemli bir adımdır. Çünkü mikro çoğaltılmış bitkilerin hızlı su kaybetmesi, kuruması veya uygulanan yüksek oransal rutubetten dolayı hastalıklara karşı hassas olmaları nedeniyle dış ortama alıştırmanın zor bir süreç olduğu bildirilmiştir [29]. Özellikle ilk dönemlerde su kaybının önlenmesi, yeni kök gelişime teşvik edilmesi veya su alımının kolaylaştırılması için pek çok yöntem denenmiştir. Bu çalışmalar halen devam etmektedir.

Davies [30]; Kültüre bağlı olarak kaba perlit, turba ve balçık (2: 2: 1) karışımında % 15–85 oranında köklenme elde etmiştir. Campos, Salomé ve Pais (1990), cüce gül çeşidi Rosamini bitkiciklerinin yaklaşık %83-100'ünün transferden sonraki 45 gün içinde toprakta iyice yerleştiğini bildirmişlerdir. Hayatta kalma oranı, diğer birçok gül türünde belirlenenden daha yüksek olmuştur [32–34].

Kadleček ve ark. [8]; 35 günlük in vitro tütün bitkilerini, tabanı 1 cm kalınlığında kum tabakası ve üzeri toprak+perlit karışımı (3:1) ile doldurulmuş saksılara (10 cm çapında) dikerek dış ortama alıştırma çalışması yapmışlardır. Su kaybını azaltmak için saksı bitkilerini, seradaki şeffaf plastik bir "çadır" altına yerleştirilmiştir. Alıştırmanın ilk günlerinde ışımayı azaltmak için gölgelendirmeler kullanılmıştır. Seraya transferin 10. günü itibarıyla "çadır" adım adım açılıp gölgeleme azaltılmıştır. Tüm bitkiler için seradaki ışık şiddeti $30-90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ve sıcaklık $18-26^\circ\text{C}$ arasında değişmiştir. Bu çalışmada bitkiler, % 100 oranında hayatta kalıp yeni yapraklar üretmişlerdir.

Wafaa ve Wahdan [35]; İn vitro koşullarda köklendirme için 0.1 mg^{-1} IBA içeren Agar kültürde iki farklı çilek çeşidinin bitkilerini çoğaltmışlar ve 4 hafta sonra köklenen bitkileri dış ortama alıştırmak için saksı yetiştirme ortamlarına dikim yapmışlardır. Yaklaşık 4.5 cm uzunluğundaki köklü bitkileri; torf, vermikülit, torf + vermikülit (1:1v/v) ve torf + vermikülit + kum (1:1:1v/v/v) doldurulmuş saksılara dikmişlerdir. Dikim yapılan saksılar yüksek bir bağıl nem oluşturmak için şeffaf polietilen naylonla kapatılıp her gün spreylenecek ve bu işlem 10 gün devam ettirilmiştir. Torf + vermikülit + kum (1:1: 1v/v/v) karışımında dış ortama alıştırılan çilek çeşitlerinde hayatta kalma yüzdesi % 96 ve %93 şeklinde olmuştur. Bunu % 86 ile torf, % 84 ile 1:1 torf + vermikülit ve % 73 ile vermikülit takip etmiştir. Diğer yandan her iki çeşitte de en yüksek yaprak sayısı yine turba yosunu + vermikülit + kum (1:1:1 v/v/v) ve takiben torfta saptanmıştır. En yüksek kök uzunluğu yine (1:1:1 v/v/v) üçlü karışımında belirlenmiştir.

Clapa ve ark. [36]; Böğürtlen bitkisinin yan sürgünlerinden aldıkları meristemleri doku kültürü yöntemleri ile çoğalttıktan sonra yüzen hidrokültür, yüzen perlit, turba + perlit karışımı, ticari yetiştirme ortamları (Florasol, Sol Vit G, Florimo), jiffypeletleri, plastik süngerler ayrıca taş yünü üzerinde alıştırma ortamına almışlardır. Dış ortama alıştırılan bitkilerde bazı özelliklerin yanı sıra köklenme ve hayatta kalma yüzdeleri belirlenmiştir.

Düşük maliyet ve düşük iş gücü gereksiniminin yanısıra birim alanda daha fazla bitkinin köklendirilebilmesi nedeniyle ex vitro köklendirme ve alıştırma için en uygun yöntem olan yüzer hidrokültür yöntemi önerilmiştir. Önerilen bu yöntemlerde bitkiler 10 gün sonra yeni kök üretmeye başlayıp 30 gün içinde tamamı köklenmiştir. Yine bu yöntemde diğer yöntemlerden daha yüksek olan %90'ın üzerinde canlı bitki elde edilmiştir. Jiffy peletleri yönteminde hayatta kalma oranı % 50'ye kadar düşmüştür.

Gruda [18]; Azalan ekilebilir arazi, hızla artan kentleşme, su kıtlığı ve iklim değişikliğinin tarımsal ürünler üzerinde baskı oluşturduğunu, bunu önlemek için topraklı kültürden topraksız kültüre doğru bir geçiş olduğunu ve saksı toprağına büyük talep olduğunu belirtmiştir. Topraksız kültürde en çok kullanılan torf kazılarının çevre tahribatı oluşturduğunu ve alternatif malzemeler kullanımını gerektirdiğini söylemiştir.

Araştırmacı, bitki üretimi açısından saksı toprağı ortam özellikleri ve performanslarının yanı sıra ekonomik ve çevresel faktörlere de dikkat çekmiştir. Geleceğin büyüyen saksı toprağı ihtiyacının bulunabilir, uygun fiyata temin edilebilir, sürdürülebilir olması ve çevresel gereksinimleri karşılayabilmesi gerektiği sonucuna varmıştır.

Araştırmacı; iklim değişikliği, CO₂ emisyonları ve diğer ekolojik sorunların yakın gelecekte topraksız kültür sistemlerinin gelişimini ve saksı toprağı seçimini belirleyip yönlendireceğini, biyo-kaynaklar; örneğin işlenmiş ve işlenmemiş atıkların yanı sıra yenilenebilir hammaddeler ve büyüme ortamı bileşenlerinin tek başına yetiştirme ortamı olarak kullanılmak için büyük bir potansiyel sunduğunu belirtmiştir. Topraksız kültür sistemlerinde azaltmayı, yeniden kullanmayı ve geri dönüşümü amaçlayan bir atık yönetimi stratejisinin daha fazla ve daha güçlü uygulanması gerektiğini vurgulamıştır.

Petropoulos ve ark. [17]; Fide, fidan yetiştiriciliğinin yoğunlaşması nedeniyle torf ve kaya yünü gibi yenilenemeyen ve/veya sentetik yetiştirme ortamlarının yerini

alabilecek alternatif yetiştirme ortamlarının araştırılıp sisteme ilave edilmesini önermiştir. Çalışmalarında saksı yetiştirme ortamı olarak Akdeniz havzasında yaygın olarak yetiştirilen iki endüstriyel bitki kardon ve pamuğun yan ürünlerinin potansiyel kullanımını değerlendirip toprak iyileştirici olarak da zeolit ilavesini test etmiştir. Düzenlenen saksı deneylerinde bitki büyümesi, altı yetiştirme ortamı toprağında değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, pamuk yan ürünleri ve zeolit bitki büyüme ortamındaki torf kullanımını kısmen ikame edebileceğini ve torf ile karşılaştırıldığında yüksek verimler elde edilebileceğini göstermiştir. Yaprak ekstraktlarındaki fenolik bileşik içeriği ve antioksidan aktivitesi bahçe toprağında yetiştirilen bitkilerde diğer test edilen saksı yetiştirme ortamlarına kıyasla daha ciddi stres semptomları göstermiştir. Sonuç olarak saksı yetiştirme ortamlarında torf yerine pamuk endüstrisi yan ürünleri ve zeolit kullanılabileceği bu sayede üretim maliyetinin düşürülebileceği ve yüksek hacimlerde kullanılan torfun yerine yenilenebilir kaynakların kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Sıralanan bu çalışmalarda görüldüğü gibi in vitro koşullarda üretilen bitkilerin dış ortama alıştırılmasında bitki sağlığının ve güçlü oluşunun yanı sıra başlangıçta uygulanan oransal rutubet ve bitki dikiminin yapıldığı köklendirme topraklarının da etkisi bulunmaktadır. Köklenme ve hayatta kalma oranı, bitki tür ve çeşidine göre de farklı olabilmektedir. Bu nedenle her bitki için ayrı köklendirme toprağı denenmesi ve başarı performansının ortaya koyulması gerekliliği anlaşılmaktadır. Bitki büyüme ve hayatta kalma oranını yükseltmek için su dengesi ile gaz değişim dengesinin sağlanmasının büyük rolü vardır.

Bu çalışmada da köklenme oranı ve hayatta kalma başarısı ile bitki büyüme performansları için yenilenebilir yerel kaynaklardan uygun saksı yetiştirme topraklarının geliştirilmesi amaçlandı.

In vitro bitkilerde köklendirmenin hızlandırılması da gerekmektedir. Bu konuda farklı çalışmalar yapılmış ve halen yapılmaya devam etmektedir.

In vitro yetiştirilen bitkilerin çoğu, yeterli sayıda bitkinin hayatta kalmasını ve toprağa aktarıldığında kuvvetli bir şekilde büyümesini sağlamak için bir alıştırma sürecine ihtiyaç duymaktadır.

J.E. Preece ve E.G. Sutter [3]; Önemli sayıda mikro çoğaltılmış bitkinin in vitro koşullardan sera veya tarla ortamlarına transferde hayatta kalamayacağını, sera ve tarlaların mikro çoğaltılmış bitkiler için in vitro koşullara kıyasla stresli olup önemli ölçüde daha düşük bağıl nemlere, daha yüksek ışık seviyelerine ve septik ortamlara sahip olduğunu söylemişlerdir.

2.1.2. Destekleyici kimyasal kullanımı

İbrahim ve Debergh [37]; minyatür güllerde (*Rosahybrida L.*) düzenledikleri in vitro çalışmalarda bitki çoğaltım protokollerini inceleyip etkin çoğaltım yöntemlerini araştırmışlardır. Köklendirme deneyleri için boyları 1.5 ile 3.0 cm arasında değişen bitkiler, bitki büyüme düzenleyici (IBA) dozları içeren ortamlara dikilmişlerdir ve bitkilerde kök oluşumu gözlenmiştir. Köklü sürgün başına ortalama kök sayısı 2.4 ile 5.5 cm ve kümülatif kök uzunluğu 0.5 ile 3.5 cm arasında değişmiştir. Bazı uygulamalarda kökler 10-15 gün sonra görünmüştür fakat 30 güne kadar gözlemler devam etmiştir. Düşük IBA konsantrasyonu (0,49 μM), yüksek konsantrasyonlardan (2,46–9,84 μM) önemli ölçüde daha etkili bulunmuştur. Yüksek IBA konsantrasyonları (4,92–9,84 μM), birçok kök üretmesine rağmen sürgün büyümesini inhibe edip daha koyu kök ve sürgünlerin tabanında önemli miktarda kallus dokusu üretimine neden olmuştur.

Siddique ve Anis [6]; *Ocimumbasilicum*'un olgun bitkilerinin koltuk altı tomurcukları ile nodal segmentlerinden in vitro kültürü yoluyla yüksek verimli, hızlı ve büyük ölçekli üretim gerçekleştirmek için bir deneme gerçekleştirip agar ortamına büyüme düzenleyicileri 6-benziladenin (BA), tidiazuron (TDZ), kinetin (Kin) ve 2-izopentenil adenin (2-iP), 5.0 μ M BA ilavesinin köklenme ve bitki büyümesine etkisini incelemişlerdir. En yüksek sürgün çoğaltma oranı; 2,5 μ M BA ve 0,5 μ M indol-3-asetik asit (IAA) kombinasyonu ile desteklenen MS ortamında elde edilmiştir. Köklendirme için 1.0 μ M indol-3-butirik asit (IBA) ile desteklenen MS ortamının, IAA veya α -naftalen asetik asit (NAA) ile desteklenenden daha iyi olduğu belirtilmiştir. İn vitro olarak yetiştirilen, iyi gelişmiş filiz ve köklere sahip bitkiler; bahçe toprağı içeren saksı topraklarına dikilip % 90 yaşama oranı ile sera ortamına alıştırılmıştır. Klorofil a, klorofil b, karotenoid ve net fotosentez oranı; 0, 7, 14, 21 ve 28. günlerde ex vitro alıştırma aşamasında ölçülmüştür. Ölçümlerin ilk aşamalarında bu parametreler düşüş eğilimi gösterip ortama alıştıktan sonra artmaya başlamıştır. Araştırmacılar bu bulgulara dayanarak mikro çoğaltılmış bitkilerin ex vitro koşullara alıştırılmasının genel olarak kabul edilenden daha uzun sürdüğünü ileri sürmüşlerdir.

Hui ve ark [38]; *Lonicerajaponica* Thunb'un mikro çoğaltma ve alıştırma için düzenledikleri çalışmadaki dormant tomurcuklarından sürgünler alıp çoğaltmışlardır. Meristem kültürleri, sürgün uçlarından %95 oranında yeni bitkiler üretmişlerdir. Aynı zamanda köklendirme oranını artırmak için kullandıkları altı farklı bitki büyüme düzenleyicisinin köklenme yüzdeleri, yüksek oranlar olan %83 ile %95 arasında değişmiştir. Araştırmacılar, dış ortama alıştırma için önceden köklenmiş in vitro bitkilerin veya sürgünlerin doğrudan alıştırma ortamına alınmasını araştırmışlardır. Beş hafta sonra, in vitro bitkilerin % 95'i başarılı bir şekilde alıştırılmıştır. Sadece GA3 çözeltisine daldırılmış sürgünlerin doğrudan alıştırılmasında % 88.7 oranında başarı elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar, önceki in vitro köklendirme aşamasına gerek olmadığını ve doğrudan alıştırmanın zamanı ve maliyetleri etkili bir şekilde azaltabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak *L. japonica*'nın mikro çoğaltımı ve alıştırma

aşamasını iki aşamaya bölüp odunsu bitkiler için geliştirilmiş ortamda çoğaltım gerçekleştirip sürgünlerin steril bir toprak karışımı içerisinde doğrudan alıştırılması gerektiği söylenmiştir.

Huh ve ark. [39]; In vitro kültürden sonra ex vitro olarak transfer edilen dut bitkilerinin dış ortama alıştırma yöntemini araştırdıkları çalışmalarında son alt kültür ortamına absisik asit (ABA) ilavesinin, sonraki ex vitro aktarıma ve bunun bitki büyümesine etkisini ortaya koymuşlardır. Alıştırma sırasında; ABA ile önceden muamele edilmiş bitkilerin stoma iletkenliği ve terleme hızı, muamele edilmemiş bitkilere göre önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. ABA ile ön işleme tabi tutulmuş bitkilerin net fotosentetik oranı ex vitro transferden sonra azalıp 14 gün sonra artmaya başlamıştır ve genel olarak işlem görmemiş bitkilerden daha yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca su içeriği, klorofil içeriği ve oranı da ABA uygulanmış bitkilerde daha yüksek bulunmuştur. Bir aylık ex vitro transferden sonra; ABA ile ön işlemden geçirilmiş bitkilerin hayatta kalma oranı % 85.6, kontrol ile karşılaştırıldığında % 29.1 daha yüksek bulunmuştur (% 56.5). ABA verilmiş bitkiler daha kuvvetli büyüme göstermişlerdir. Bu sonuçlardan; ABA'nın son alt kültür ortamına uygulanmasının alıştırmayı iyileştirdiği ve ex vitro aktarımdan sonra dut bitkilerinin hayatta kalmasını artırabildiği, su stresi toleransını iyileştirdiği ve abiyotik stres faktörlerini hafiflettiği vurgulanmıştır.

Oakes ve ark [40]; Amerikan kestanesi ağaçlarının genetik mühendisliği uygulaması ile kestaneye küfüne direnç sağlayan buğday oksalat oksidaz genini aktarmışlardır ancak ağaçların mikro çoğaltma yoluyla kök üretme zorluğu nedeniyle üretim darboğazı yaşamışlardır. Doku kültürü ile üretilen kestaneye bitkilerinde sağlıklı köklerin ve canlı sürgün uçlarının varlığının, başarılı bir alıştırma süreci için ön şart olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle kestaneye çoğaltma protokolünün köklenme sonrası aşamasını inceleyerek hazırladıkları çalışmada; saksı tipini, hormon ve aktif kömür konsantrasyonlarını vermikülit yetiştirme ortamı kullanarak değerlendirmişlerdir. En iyi kök kombinasyonu ve canlı sürgün uçlarına sahip bitkiler için tek kullanımlık hazır gıda paket kapları, 2

g/L aktif kömür ve 500 mg hümkik asit içeren yarı katı köklenme sonrası besiyeri kullanılması önerilmiştir. Vermikülit, saksı yetiştirme ortamı olarak kullanıldığında köklenme sonrası ortama jelleştirici bir madde olmadan 2.0 g/L aktif kömür eklenmesi tavsiye edilmiştir.

Elmongy ve ark. [16]; Azalya bitkisi mikro sürgünlerinin köklenmesine auxin hormonu ve hümkik asit uygulamasının etkisini araştırdıkları çalışmada, hem auxin hormonlarının hem de hümkik asit uygulamasının köklenme uyarıcı bileşik oluşumunu arttırdığını gözlemlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar; oksinlerin ve HA'nın azelya bitkilerinde reaktif oksijen türleri, karbonhidrat içerikleri, fenolik bileşik seviyeleri ve kök gelişimi ile ilgili farklı genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri yoluyla kök indüksiyonunu teşvik ettiğini göstermiştir.

Baldotta ve ark. [41]; Mikro üretimden sonra uzun bir alıştırma dönemi isteyen ananas bitkisini ex vitro koşullarda incelemişlerdir.

Ananas bitkilerinde, ex vitro ortama daha hızlı alıştırma ve fidanların büyümesi için daha kuvvetli köklü materyalin üretilmesi ön şartlardır. Hümkik asitler ve endofitik bakterilerin kombinasyonunu, alıştırma süresini kısaltmak için denedikleri çalışmada; doku kültürü ile üretilmiş ananas bitkisi üzerindeki etkiyi gözlemlemişlerdir. Bazal yaprak aksillerine hümkik asitlerle muamele edilirken kökler, bakteri ortamına daldırılmıştır. Hümkik asitler ve bakteri uygulaması; kontrole kıyasla sürgün büyümesini (sırasıyla% 14 ve% 102) iyileştirmiştir ve kombine uygulama etkisi daha belirgin şekilde gözlenmiştir (% 147). Benzer şekilde hümkik asitler kök büyümesini % 50, bakterileri % 81 ve kombine muameleyi % 105 artırmıştır. Uygulamanın ananas yapraklarında N (% 115), P (% 112) ve K (% 69) birikimini önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur. Ananas büyümesi; Burkholderiaspp. ile aşılama etkilenmiş ve hümkik asitlerle kombinasyon halinde daha da hızlandırılmıştır. Çalışma; aşılama bitkilere göre daha yüksek sürgün ve kök biyokütlesi, besin içeriği (N% 132, P% 131, K% 80)

ile sonuçlanmıştır. Hümik maddelerin mevcudiyetinde bakteri uygulamasının, ananas fidelerinin büyümesi ve ex vitro ortama alıştırılmasını iyileştirmek için umut verici bir biyoteknolojik araç olduğu ifade edilmiştir.

İn vitro koşullarda çoğaltılmış bitkilerin dış ortama alışmaları zordur ve zaman almaktadır. Bu aşamada özellikle mortalite oranını düşürücü, köklenmeyi artırıcı ve ardından bitki büyümesini destekleyici pek çok bitki gelişim düzenleyici hormon ve hümik asit gibi doğal bileşikler kullanılmıştır ve bunlar üzerindeki araştırmalar halen devam etmektedir. Rapor edilen çalışmalarda çoğunlukla bu kimyasalların, kontrol uygulamalarına kıyasla daha iyi performans sergilediği bildirilmiştir.

Hümik asitler; oksin benzeri aktiviteleri, şelatlama yetenekleri ve kök kompozisyonu üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle bitki doku kültürü çalışmalarında katkı maddesi olarak araştırılmaktadır [40]. Gidyahümik, asit bakımından zengin bir malzemedir. Gidyahümiğin saksı toprağına eklenmesinin genç fidelerde yaprak ve sürgün büyümesini artırdığı [21], hücre büyümesini ve gelişimini uyardığı [42] gösterilmiştir.

Nhung Ngoc Hoang ve ark. [43]; Şekersiz bir ortamda foto-ototrofik mikro çoğaltmanın (FMÇ), ortama alıştırmayı kolaylaştırabileceğini ve doku kültürü yapılmış bitkileri açık tarlalara naklederken başarı oranlarını arttırabileceğini söylemişlerdir. Wasabi bitkilerinde alıştırma aşamasında üretim maliyetlerindeki (zaman ve enerji) tasarrufları belirlemek için dört çeşit destek malzemesi (agar, perlit, taşıyünü ve vermikülit) ile in vitro FMÇ kullanılıp bunların sonraki ex vitro büyüme (vermikülitte) üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Çalışma tüm yönleriyle en yüksek büyüme performansını agar ve vermikülitte bulunan bitkilerin, en kötü büyüme performansını ise taşıyünü bitkilerinin gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. İn vitro büyüme performansı, destekleyici materyalin hacimsel su içeriği ile ilişkili görünmüştür. Agar ve vermikülit; kök sayısında, kök uzunluğunda ve taze kök ağırlığındaki artışlarla birlikte kök büyümesini ve gelişimini

desteklemiş ve bu tedavilerdeki kök sistemleri de ex vitro aşamada en iyi büyümeyi sergilemişlerdir. Bitki kültür kaplarında, agardaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu (ÇOK), 0. günden 7. güne kadar aniden azalmış ancak 28. güne kadar düzelmiştir. ÇO; kültür periyodu boyunca perlit, vermikülit ve taşıyıcı ile sırasıyla çok hafif, hafif ve istikrarlı bir şekilde azalmıştır. İn vitro muamelelerden elde edilen tüm wasabi bitkileri, ex vitro koşullara nakledildikten sonra hayatta kalmıştır ve sonraki büyüme, in vitro büyüme performansından güçlü bir şekilde etkilenmiştir. Agar ve vermikülit tedavilerindeki bitkilerin büyüme parametreleri en yüksek, taşıyıcının ise en düşük olmuştur.

Laisyn Posada Pérez ve ark.'nın [44] uyguladığı papayanın organogenez ve somatik embriyogenez yoluyla bitki rejenerasyonu başarılı olmuş ancak bu türün in vitro kültürünün en büyük sorunu, bitkilerin %70'den fazlasının tarlaya ekilmeden önce kaybolduğu rejenere bitkilerin alıştırılması aşaması olmuştur. Kültür kabı içindeki bağıl nemin azaltılması ve dolayısıyla havalandırmanın artırılması, papaya bitkilerinin alıştırılması üzerinde daha büyük bir etkiye sahip gibi görünmekte, stomaların işlevini güçlendirmekte ve bu sebepten yapraklardan su kaybının daha iyi kontrol edilmesine imkan vermektedir. Bu çalışmanın amacı; farklı sükroz ve indol-butirik asit (IBA) konsantrasyonlarının destek olarak steril zeolit kullanan bitkilerin köklenme, in vitro alıştırma ve artan havalandırma ile kültür kapları üzerindeki etkilerini belirlemektir. Oksinli, oksin olmadan üç sükroz konsantrasyonu (0, 10 ve 20 g L⁻¹) ve kontrol işlemi olarak 17, 27 ve 37 kültür günleri boyunca agarlı köklendirme kültürü üzerinde çalışılmıştır. En yüksek köklenme yüzdesi; sükroz ve % 80 ile IBA, destek olarak zeolit içermeyen muamelede 37 kültür gününde kaydedilmiştir. Bitkiler, 17 günlük kültürde IBA ve sükroz olmadan muamelede yüksek başarı elde etseler de oksin ve farklı sükroz konsantrasyonları içeren kültür ortamında yetiştirildiğinde en iyi fotosentetik değerlere ulaşılmıştır. Kültür ortamında; sükroz içermeyen zeolit, oksin ve artırılmış havalandırma birleşik etkisi, ex vitro iklimlendirme koşulları altında artan bitki hayatta kalma etkisine sahip olan foto-ototrofik kültür koşullarına izin vermiştir.

P. Baskaran ve ark. [45]; Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD'ler) ve organik elisitörlerin (OE'ler), *Coleonema pulchellum*'un in vitro mikro çoğaltımı, ikincil ürün üretimi ve farmakolojik aktiviteler üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. *C. pulchellum*'un in vitro, ex vitro ve ebeveyn bitkileri; fenolik ve farmakolojik bileşikler üretme potansiyeli açısından değerlendirilmiştir. Sürgünlerin farklı morfojenik özellikleri, BBD'ler ve OE'ler içeren ortamlarla elde edilmiştir. Düşük konsantrasyonda tidiazuron (TDZ: 4.5 μ M) ile daha fazla sayıda normal sürgün elde edilmiştir. TGB (13.6 μ M) + indol-3-asetik asit (IAA: 2.9 μ M) kombinasyonlarında hemogloblin (HB: 300 mg l⁻¹) veya glutamin (GM: 40 μ M) + benziladenin (BA: 8.8 μ M) gibi daha düşük sonuçlar bulunmuştur. Sürgünler in vitro olarak köklendirilmiş ve başarılı bir şekilde ortama alıştırılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri ve OE'ler, fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin sentezi ve birikimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuştur. Özellikle kazein hidrolizat (KH) ve GM-BA kombinasyonu, in vitro kültür sırasında yüksek seviyelerde toplam fenolik ve flavonoid indüklemiştir. Sitokininler ve OE'ler, *C. pulchellum* ekstraktlarının DPPH radikal süpürme ve antibakteriyel aktiviteleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olmuştur. Sonuç olarak; adapte edilmiş *C. pulchellum* bitkilerinin, doğal popülasyonlara alternatif olarak kullanılabileceği bulgusuna varılmıştır.

2.1.3. Saksı toprağının etkisi

İn vitro koşullarda çoğaltılmış mikro bitkilerin dış ortama alıştırılmasında ayarlanabilir çevre faktörlerinden birisi de kullanılan saksı toprağıdır. Saksı toprağında kullanılabilecek, denenmiş çok farklı organik ve inorganik saksı yetiştirme ortamı bileşenleri vardır. Saksı toprağından istenilen özellikler sistematik olarak ortaya konulduktan sonra alıştırma toprağı amaçlı saksı toprağı karışımı ayarlanabilir ve başarıyla kullanılabilir. Yalnız farklı bitki tür ve çeşitlerinden farklı tepkiler görülebileceğinden her zaman ön çalışma yapmakta fayda görülmektedir.

Fernandes ve ark. [46]; İn vitro ortamda çoğaltılan ve köklenen bitkilerin, (1:1:1) oranında torf:perlit:vermikülit içeren saksı toprağına dikimlerini yapmışlar, kontrollü bir kabın içinde 25 ± 1 °C'de, 16 saat ışık altında ($20-50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), % 50 bağıl nem koşullarında iki hafta ön alıştırmaya tabi tutmuşlardır. Ardından sera koşullarına transfer ettikleri ve yaklaşık üç ay sonra, alıştırma ortamlarında sağ kalma oranlarını raporladıkları çalışmalarında, üç aylık alıştırmadan sonra bitkilerin % 40 ile % 85 oranında köklendiğini gözlemlemişlerdir.

Iliev ve ark. [4]; Alıştırma aşamasında bitkileri 9 farklı saksı toprağı kombinasyonunda denemişlerdir: a) kum, b) zeolit, c) toprak, d) 1:1 toprak, kum, e) 1:2 toprak, kum, f) 1:1 toprak, zeolit, g) 1:2 toprak, zeolit, h) 1:1:1 toprak, kum zeolit, i) 1:2:1 toprak, kum zeolit ve j) torf. Toprak olarak Chromicluvisol kullanılmıştır. Alıştırma aşamasında bitki hayatta kalma oranını en fazla etkileyen faktör oransal rutubet olmuş, en azından 14 gün yüksek rutubet koşullarında tutulmaları önerilmiştir. C, f ve g uygulamalarında hayatta kalma oranı % $35 \pm 2,9$ bulunmuş ve düşük hayatta kalma oranının toprak ortamının sıkışık olma durumuna bağılı olduğu bildirilmiştir. En yüksek yaşama oranı % $86,7 \pm 2,9$ ile yumuşak, havadar kök gelişim ortamı sağlayan torf uygulamasından elde edilmiştir.

Mengesha ve ark [11]; İki farklı alıştırma toprağını, mikro üretim yöntemiyle çoğaltıp ananas bitkilerinin dış ortama alıştırmasında denemişlerdir. Birinci formülde; bölgeden temin edilen 1:2:1 oranında toprak, kahve kavuzu, kum karışımı kullanılmış ve kullanımdan 72 saat önce % 3'lük formaldehit ile dezenfekte edilmiştir. İkinci saksı toprağı formülü olarak Danimarka'dan temin edilen Jiffy-7 torf peletleri kullanılmıştır. Her bir uygulamaya 10 bitki dikilmiş ve ardından alıştırma ortamına alınıp 2.5 ay büyütülmüştür. Bu aşamada oransal rutubet % 70-80 arasında mist uygulaması ile sağlanmıştır. İki farklı ortamda hayatta kalma oranı torf uygulamasında % 98, toprak

karışımı uygulamasında % 90 olarak tespit edilmiştir. Köklenme oranı ile bitki büyüme ve gelişmesi, torf içeren ortamda istatistiki olarak daha yüksek oranda gerçekleşmiştir.

Akshit Puri ve ark. [47]; Doğal ekosistemlerde bitkilerin bozulmuş ve besin açısından fakir topraklarda büyümelerini, sağlıklarını sürdürmede önemli rol oynayan çok sayıda mikropla ilişkilendirmişlerdir. Kanada, British Columbia'daki West Chilcotin; son derece sınırlı miktarda bitki tarafından temin edilebilen besin içeren az gelişmiş ve kaba dokulu topraklara sahip تنها bir bölgedir. Bununla birlikte hibrit beyaz ladin doğal orman meşcereleri, bu bölgede bu tür sınırlı besinli edafik koşullardan etkilenmeden gelişmektedir. Akshit Puri ve ark. [47]; bu bölgede ladin ağaçlarının büyümesini desteklemede rol oynayabilecek bitki büyümesini destekleyen bakteriler ararken birkaç potansiyel endofitik diazotrofik bakterileri, ladin dokularından izole etmişlerdir. Enzim tahlillerini (kalitatif ve kantitatif testler) ve 18 aylık sera büyümesi denemelerini kullanarak in vitro olarak seçilen altı bakteri suşunun bitki büyümesini teşvik etme potansiyeli analiz edilmiştir. Laboratuvar tabanlı enzim analizlerinde bu bakteri suşlarının; inorganik ve organik fosfatı çözme ve sideroforlar, indol-3-asetik asit, 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) deaminaz enzimi ve hücre duvarı bozucu enzimler - selüloz üretme konusunda önemli bir yetenek gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bakteriler ayrıca kanola ve domatesin (etilene duyarlı bitkiler) kök büyümesini (% 84-479) artırarak önemli in situ ACC deaminaz aktivitesi göstermiştir. Ek olarak her bakteri suşu, sera büyümesi denemelerinde yalnızca orijinal konağının (hibrit beyaz ladin) değil, aynı zamanda yabancı bir konağın (lodgepole çamı) uzunluğunu (>% 40) ve biyokütlesini (>% 90) önemli ölçüde artırmıştır. Bu bitki büyümesi artışı, her iki ağaç türünde bu bakteri türleri için gözlemlenen rizosferik ve endofitik kolonizasyona bağlanabilmektedir. Özellikle bir bakteri suşu olan *Caballeronia sordidicola* LS-S2r, ladin ve çam fidelerinde en yüksek kolonizasyon kabiliyetini (105-108 koloni oluşturan birim/g doku) gösterip biyokütlelerini sırasıyla 7 kat ve 4,25 kat artırmıştır. Tüm enzim deneylerinde bu suş için gözlemlenen, oldukça önemli in vitro bitki büyümesini destekleme yeteneği ile ilgili olabilmektedir. Özetle; bu bakterilerin büyümelerini

desteklemek için birden fazla ağaç konakçı ile anahtar ekolojik ilişkiler kurma potansiyeli, ağaçların besin açısından fakir topraklarda doğal olarak yenilenme kabiliyetini açıklayabilmektedir. Dahası bu bakteriler özellikle *C. sordidicola* LS-S2r, yüksek derecede rahatsız edici ve besin açısından zayıf edafik koşullar altında kuzeydeki orman ağaçları için kapsamlı biyogübreleyici olarak potansiyel şekilde kullanılabilir.

Daniela Dutra ve ark. [48]; Tehdit altındaki bir Kuzey Amerika yerli karasal orkidesi olan *Bletia purpurea* için asimbiyotik tohum çimlenmesi ve fide alıştırılması amacıyla prosedürler geliştirmişlerdir. *B. purpurea*'nın tohum çimlenmesini ve protocorm gelişimini 0/24 saat veya 16/8 saat L/D fotoperiyodunda teşvik etmek için altı asimbiyotik orkide tohumu çimlendirme ortamı (Knudson C, PhytoTechnology Orkide Tohumu Ekim Ortamı, Malmgren Modifiye Karasal Orkide Besiyeri, Vacin & Went Modifiye Orkide Besiyeri, ½-strength Murashige & Skoog ve BM-1 Terrestrial Orchid Medium) denenmiştir. Ortam veya fotoperiyod muamelesinden bağımsız olarak çimlenme meydana gelmiş, bununla birlikte gelişmiş fide gelişimi (Aşama 6) yalnızca 16/8 h L / D foto periyodunda Vacin & Went Modifiye Orkide Ortamı'nda meydana gelmiştir. Fotoperiyodun in vitro fide gelişimi üzerindeki diğer etkileri de incelenmiş, 16/8 saat L / D foto periyodunda sürgün uzunluğu, yaprak genişliği, kök sayısı ve uzunluğu, taze ve kuru ağırlık; 8/16 saat ve 12/12 L / D fotoperiyodları ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde farklı bulunmuştur. İn vitro fideler, tüm saksı ortamlarında sera koşullarında yüksek hayatta kalma eğilimi göstermişlerdir. Fafard Mix 4 saksı ortamına alıştırılan fideler, önemli ölçüde daha uzun kökler geliştirmişler ve Corm oluşumu, kullanılan saksı ortamından bağımsız olarak meydana gelmiştir.

C.Azcon Aguilar ve ark. [49]; Manyok (*Manihot esculenta* Crantz) bitkilerinin hayatta kalması ve gelişimini doku kültürü protokollerini değiştirerek ve mikorizal aşılama ile artırmışlardır. Bitkilerin yaklaşık % 90'ı başarılı bir şekilde in vitro köklendirilmiş ve alıştırma aşamasından sonra %75'i hayatta kalmıştır. Post vitro evresinin başlarında

Glomus deserticola ile aşılama, hayatta kalma yüzdesini artırmış ve nakil stresine karşı toleransı iyileştirmiştir. Mikro çoğaltılmış bitkilerin sürgün, kök ve yumru gelişimi; farklı arbusküler mikorizal (AM) mantarlarla aşılamanın ardından artmıştır. Büyüme tepkileri hem çeşit (klon) hem de ilgili AM mantarlarına bağlı bulunmuştur. *G. deserticola*, her iki klonun büyümesini geliştirmede çok etkili olmuştur. *G. clarum* ve *G. fasciculatum*'un etkinliği, bitki çeşidine bağlı olarak değişmiştir. Sonuçlar, uygun bitki klon/AM mantar kombinasyonları önerilmeden önce seçim denemelerine olan ihtiyacı vurgulamıştır.

İn vitro çoğaltılmış bitkiler narindir ve sık sık görülen büyük kayıplarla ex vitro ortama alışma şokundan kurtulmak için güçten yoksundurlar. Rita M. Moraes ve ark. [50]; *Podophyllum peltatum* bitkilerinin hayatta kalmasının steril olmayan bir toprakta (NS) –kum (2: 1 v/v) yetiştirme ortamında Miracle – Gro potting mix®-kumuna (2:1 v/v) arbusküler mikoriza (AM) aşısı olan veya olmayan şeklinde saksı yetiştirme ortamlarının karşılaştırılmasına bağlı olduğunu söylemişlerdir. Steril olmayan saksı yetiştirme ortamı, Mississippi Üniversitesi Kampüsü'nde bulunan doğada yetiştirilen *P. peltatum* kolonileri alanlarından toplanmıştır. Miracle–Gro çömlekçilik karışımı®-kum yetiştirme ortamında yetiştirilen bitkiler grubunda hayatta kalma oranı, AM mantarları ile aşılansmış bitkilerde önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. *Entrophospora colombiana* ile aşılansan bitkiler; *Glomus mosseae*, *Gigaspora ramisporophora* veya *Scutellospora fulgida* (% 57) ile aşılansmış bitkilerden daha üstün bir hayatta kalma oranına (% 73) sahip olmuştur. Ex vitro *G. ramisporophora* ile aşılansmış bitkiler, kontrol aşılansmamış bitkilerden daha fazla podofilotoksin ve lignan vermemiştir.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki ve toprak substrat malzemeleri

Test materyali olarak kullanılan in vitro çoğaltılmış odunsu süs türleri; *Rosa hybridae*, *Loropetalum chinense* ve sukulent türler; *Aloe vera*, *Hylocereus undatus* Sakarya Üniversitesi/Doku Kültürü Laboratuvarı'ndan temin edildi. Fındık zürufu; üreticiden fındık, kabuğundan ayrıldıktan sonra alındı. Parçacık boyutu değirmenle öğütülerek 0-4 mm arasına düşürüldü ve kullanılmadan önce kompostlandı. Gytija numunesi, ticari ürün olarak satın alındı. Gytija madeninin menşei Kahramanmaraş ilindeki Afşin-Elbistan linyit maden yatağıdır. Linyit yataklarında organomineral bir atık madde olan gytija, esas olarak bitki büyümesini ve gelişimini destekleyen hümik ve fulvik maddeler içermektedir [15]. Çalışmada kullanılan saksı yetiştirme ortamı malzemelerinin temel özellikleri Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1. Yetiştirme ortamında kullanılan deneysel malzemelerin fizikokimyasal özellikleri ve istenen aralık değerleri ile karşılaştırılması (Standart sapma $\pm$, n = 3)

Parametreler	Cocopeat	Fındık Zürufu	Gyttja	İstenen Aralık
Toplam Porozite (%)	94.3 $\pm$ 2.3	90.2 $\pm$ 1.6	62.4 $\pm$ 2.3	>85
Hava Kapasitesi (%)	32.2 $\pm$ 0.9	28.2 $\pm$ 1.7	10.6 $\pm$ 0.9	20-30
Su Tutma Kapasitesi (ml/L)	634.4 $\pm$ 3.8	656.3 $\pm$ 4.8	347.4 $\pm$ 5.0	600-1000
Organik Madde (%)	92.4 $\pm$ 0.6	86.2 $\pm$ 1.3	67.3 $\pm$ 1.8	>80
Kül (%)	7.7 $\pm$ 0.1	13.8 $\pm$ 0.6	32.8 $\pm$ 2.5	<20
pH	6.6 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 0.1	5.3-6.5
EC (mS/cm)	0.9 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	<0.5
N (%)	0.4 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	-
P (%)	0.4 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.1	-
K (%)	3.0 $\pm$ 0.1	5.7 $\pm$ 0.7	0.1 $\pm$ 0.1	-
Hümkik Maddeler (%)	-	-	58.4 $\pm$ 1.0	-

3.2. Yöntem

Yetiştirme ortamında kullanılan fındık zürufunun TEM taramalı elektron mikroskopik analizleri, Kastamonu Üniversitesi Araştırma Laboratuvarında FEI Quanta model FEG 250 cihazları (FEI, Hollanda) kullanılarak gerçekleştirildi. Fındık zürufunun seçilmiş noktalarındaki mineral kompozisyon analizi (EDS) yine Kastamonu Üniversitesi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.3. Yapılan Testler

3.3.1. Fitotoksisite testleri

Toksisite testleri, findık zürufu ve gyttja kombinasyonlarından elde edilen su eluatları kullanılarak petri kaplarında çimlenen *Lepidium sativum* tohumları ile üç tekerrürde gerçekleştirildi. Yüz gram kuru numune 1 L'lik bir şişeye konuldu ve numunelerin su eluatını hazırlamak için 900 mL ultra saf su ilave edildi (1:10 w/v seyreltme). Süspansiyon 20°C'de 24 saat çalkalandı. Katı partiküller çöktükten sonra, numunelerin süpernatantı 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve vakum uygulaması altında 0,45 mm teflon naylon filtreden süzüldü. 25 tere tohumu kullanılarak 9 cm'lik petri kaplarında, üç tekerrürde 10 ml ekstrakte edilmiş çözeltiyle fitotoksisite deneyleri yapıldı. Çimlenme kabininde 25°C'de 3 günlük inkübasyondan sonra, gösterge hesaplamaları için sağlıklı 20 fidenin kök uzunluğu ölçüldü. Kontrol olarak ultra saf su ile referans testleri gerçekleştirildi. Çimlenme oranı (ÇO), nispi tohum çimlenmesi (NTÇ), nispi kök büyümesi (NKB) ve tohum çimlenme indeksi (TÇİ), Luo ve ark [51] tarafından açıklanan test prosedürü ile hesaplandı:

$$\text{ÇO} = \left(\frac{\text{çimlendirilen tohum sayısı (n)}}{\text{toplam tohum sayısı}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{NTÇ} = \left(\frac{\text{örnekte çimlenen tohum sayısı}}{\text{kontrolde çimlenen tohum sayısı}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{NKB} = \left(\frac{\text{örnekte ortalama kök uzunluğu}}{\text{kontrolde ortalama kök uzunluğu}} \right) \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{TÇİ} = (\text{NTÇ} \times \text{NKB}) / 100 \quad (3.4)$$

3.4. Deneysel Tasarım

Çalışma, in vitro bitkiler için alıştırma döneminde saksı yetiştirme ortamı olarak findık zürufu ve gyttja kombinasyonunun uygunluğunu test etmek amacıyla dört bitki türü ile tek yönlü varyans analizine (ANOVA) dayalı olarak hazırlandı. Deneylerde kullanılan findık zürufu+gyttja kombinasyonları: T0 =%100 findık zürufu, T1 =%99 findık zürufu +%1 gyttja, T2 =%98 findık zürufu +%2 gyttja, T3 =%95 findık zürufu +%5 gyttja, T4

=%90 findık zürufu +%10 gyttja ve T5 =%100 cocopeat (kontrol muamelesi) şeklindedir. Tüm muameleler, her bitki türü için üç tekerrür halinde gerçekleştirildi ve her bir tekerrür için 10 sağlıklı bitki kullanıldı.

İn vitro çoğaltılmış 8 haftalık bitkiler dikkatlice deney tüplerinden çıkartılıp toprak ortamına dikilmeden önce köklerin üzerine yapışık agar büyüme kültürünü çıkarmak için musluk suyu ile yıkandı. Daha sonra sukulent türlerin bitkileri, doğrudan yetiştirme ortamına yerleştirildi. Dikim şokunu azaltmak için, odunsu bitki türleri başlangıçta 2 hafta boyunca su yüzeyine yerleştirilen yüzen hidro-kültür tepsisine aktarılıp bekletildi. Yeni beyaz kök oluşumuna sahip fideler, ardından alıştırma aşaması için ekim saksılarına aktarıldı. Saksılar (60 mL), yukarıda tarif edildiği gibi buharla sterilize edilmiş saksı yetiştirme ortamları ile dolduruldu.

3.5. Dış Ortama Alıştırma Koşulları

Saksılara dikimi yapılan bitkiler koruyucu fungusit ile spreyleneip alıştırma ortamına yerleştirildi (Şekil 4.1). Alıştırma ortamı koşulları; fotoperiyot 14 h ışık/10 h karanlık, fotosentetik foton yoğunluğu $43,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sıcaklık $20 \pm 1^\circ\text{C}$ şeklindeydi. Oransal rutubet deney sonuna doğru yavaş bir şekilde %90'dan %70'e düşürüldü. Bitkiler alıştırma ortamı kabininde 4 hafta tutuldu. Ön alıştırma fazından sonra bitkiler saksıları ile fide tepsilerine yerleştirildi ve gölgelendirilmiş dış ortama çıkarıldı. Dış ortam koşulları; $16-26^\circ\text{C}$ sıcaklık, %53-92 oransal rutubet, $164,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosentetik foton yoğunluğu şeklindeydi. Rutubet, bitki yüzeylerine su püskürtülerek sağlandı.

3.6. Büyüme Parametreleri

Alıştırma dönemindeki bitki yaşama oranı (%), bitki uzunluğu (cm), gövde kalınlığı (mm) sürgün kuru ağırlığı (g), kök kuru ağırlığı (g) ve bu parametrelerden elde edilen

Dickson kalite indeksi (DQI) tespit edildi. Bitki yaşama oranı, denemelerin sonunda (3.5) formülü kullanılarak tahmin edildi.

$$\text{Bitki yaşama oranı} = \left(\frac{\text{Canlı bitki sayısı}}{\text{Dikimi yapılan bitki sayısı}} \times 100 \right) \quad (3.5)$$

DQI; yaşayan bitkilerin morfolojik, fizyolojik özelliklerini ve sağlık durumlarını vermektedir. Alıştırma sürecinden sonra, denenen saksı toprağı yetiştirme ortamlarının bitki yetiştirmeye uygunluğu denklem (3.6) kullanılarak hesaplandı [52].

$$QI = \frac{TDM}{\frac{SH}{SBD} + \frac{SDM}{RDM}} \times 100 \quad (3.6)$$

TKM (g), SU (cm), GÇ (mm), SKMA (g), KKMA (g) parametreleri beş bitkide tespit edildi. Kök ve gövdelerine ayrılan bitkiler yıkanıp ardından 78 ± 2 °C de sabit ağırlığa gelene kadar 2 gün kurutma dolabında (Nuve FN-055, Türkiye) kurutuldu.

3.7. İstatistiksel Analiz

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre dört farklı bitkide ayrı ayrı gerçekleştirildi. İstatistiki analizler Statgraphic Centurion versiyon XVI (Statpoint technologies Inc., Warrenton, VA, USA) programı kullanılarak yapıldı. Ortalamaların karşılaştırılmasında LSD testi kullanıldı. Yüzde (%) olarak ifade edilen parametreler normalizasyon için varyans analizinden önce açış transformasyonuna ($\sqrt{P}$) tabi tutuldu [53].

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

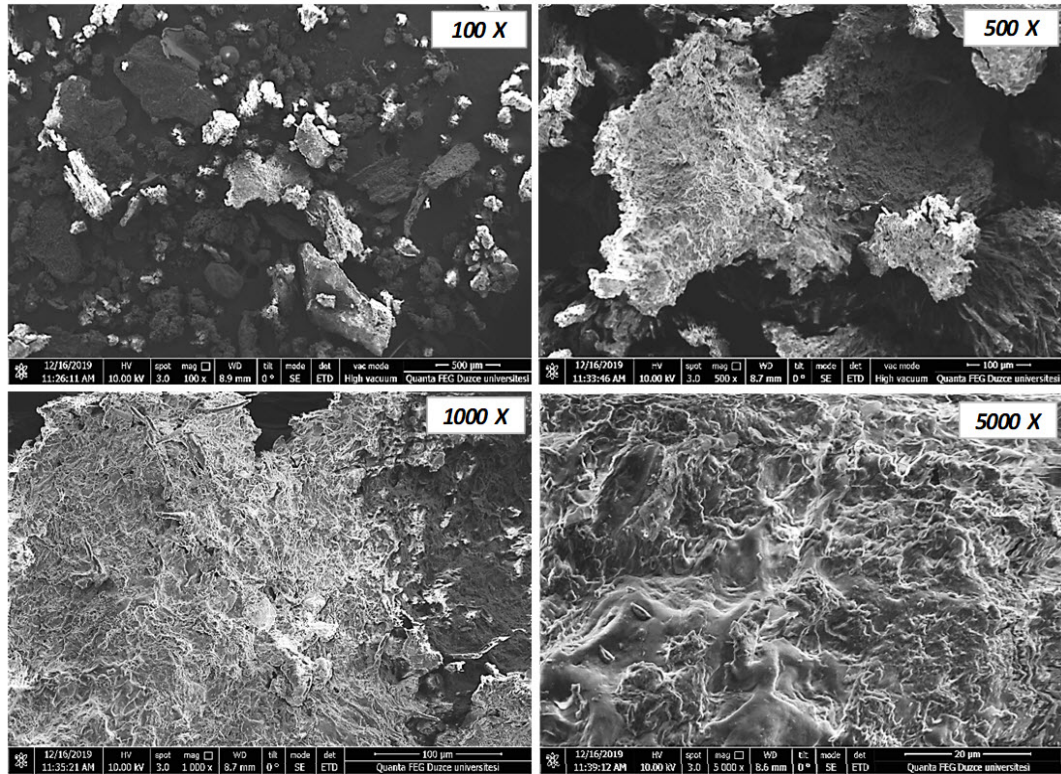
Saksı yetiştirme ortamı bileşenleri ve deneyin aşamaları Şekil 4.1’de adım adım gösterilmiştir:



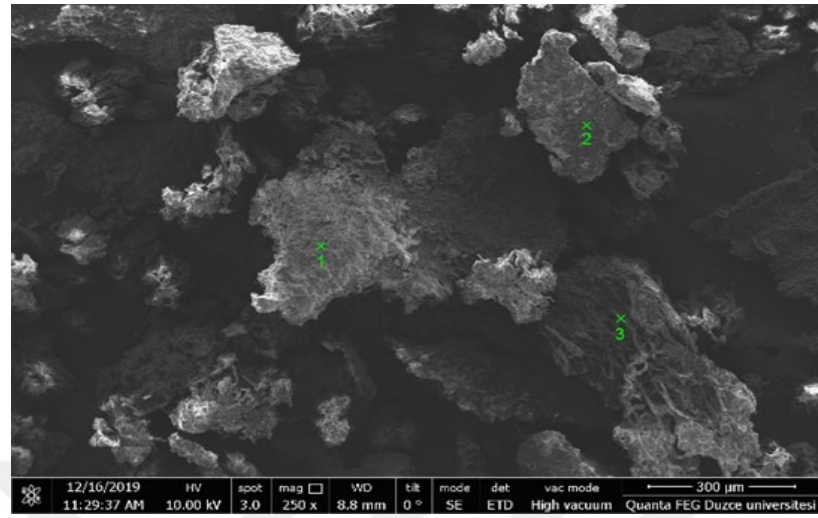
Şekil 4.1. In vitro çoğaltılmış bitkilere uygulanan iklimlendirme uygulamalarının akış şeması. A) Mikro çoğaltılmış bitkilerin yüzdürülmüş hidrokültürde köklenmesi, B) Doğrudan toprağa dikim, C) Büyüme kabininde ilk iklimlendirme, D) İlk iklimlendirmeden sonra bitkiler, E) Gölge ağı altında dış ortam koşullarına nihai iklimlendirme (bitki yaşı 12 hafta).

Saksı toprağının ana bileşeni olarak kullanılan fındık zürufunun SEM mikrografları (Şekil 4.2.), gözenekli ve nispeten pürüzsüz bir yüzey yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Yetiştirme ortamını bileşeninin yüzeysel yapısı ile mikro gözeneklilik

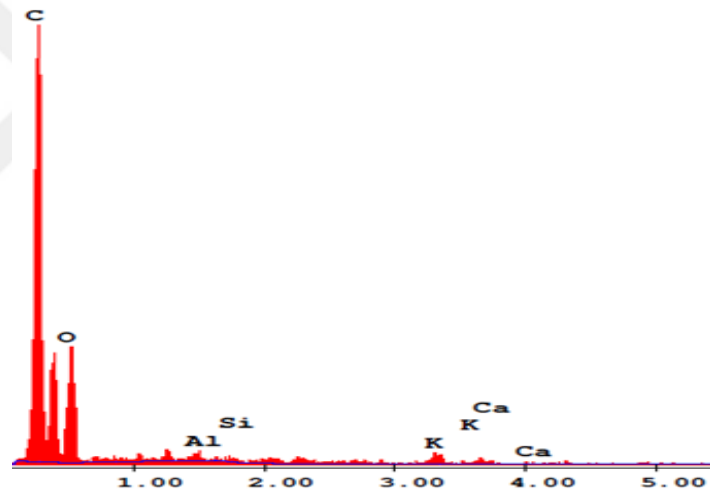
durumu köklenme ve bitki büyüme performansını etkilemektedir. Örneğin, pürüzsüz ve yumuşak karakterli torf alıştırma ortamında in vitro bitki köklenmesine iyi bir ortam sağlanırken doğal bahçe toprağı, kum veya zeolit içeren sert karakterli yetiştirme ortamları bitkilerin hayatta kalma performansını düşürmektedir [4]. Benzer şekilde önceki çalışmalarda [20] saksı toprağı için istenen aralıktaki organik madde, pH, EC ve besin elementi bileşimlerinin bitki yetiştirme performansı üzerinde önemli etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Tablo 3.1). Katkı maddesi olarak kullanılan gyttja fındık zürufuna benzer bir pH, elektriksel iletkenlik ve besin elementi özelliklerine sahiptir. Ancak alıştırma aşamasında in vitro bitkilerin köklenmesi ve sertleşmesi üzerinde uyarıcı etkiye sahip olabilecek hümitik maddeler (Tablo 3.1) gibi bitki büyüme stimulantı bileşenler içermektedir [11, 21]. Sayılan bu özelliklerin alıştırma toprağı üzerinde bitki köklenmesi, büyümesi ve gelişimi üzerinde olumlu etkisi olacağı düşünülmektedir.



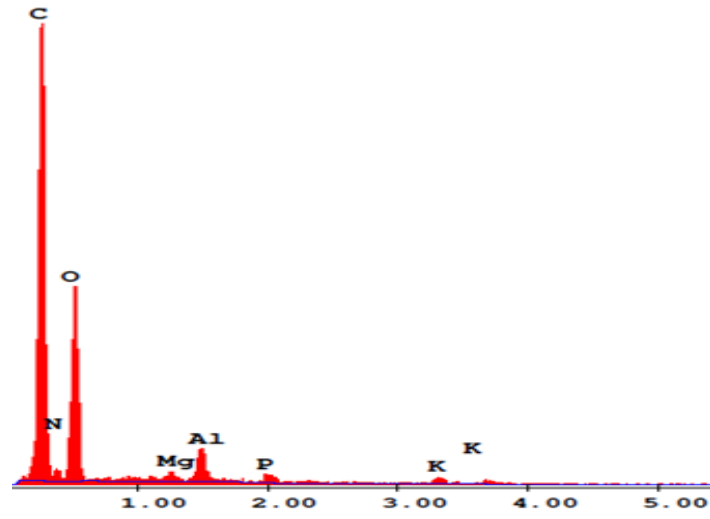
Şekil 4.2. Fındık zürufunun farklı büyüklüklerde TEM (Taramalı elektron mikroskobu) görüntüleri



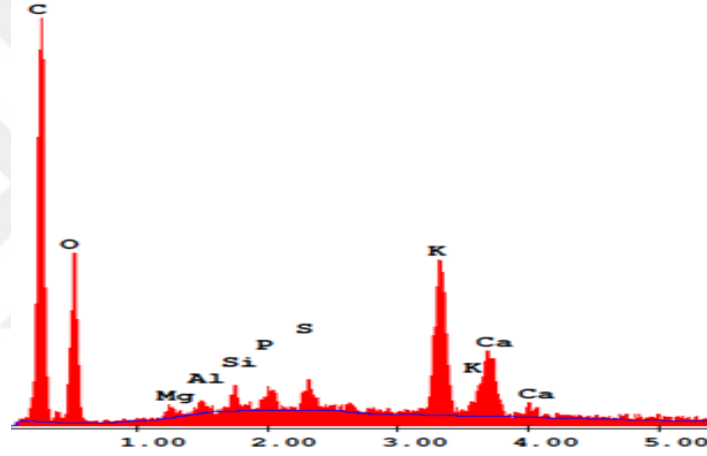
Şekil 4.3. Seçilen Spektrumlar



Şekil 4.4. Spektrum 1



Şekil 4.5. Spektrum 2



Şekil 4.6. Spektrum 3

TEM analizi spektrumlarından görüleceği gibi fındık zürufu organik madde bileşenleri karbon, hidrojen ve oksijen yanında bitki büyüme ve gelişimi için mutlak gerekli elementler olan azot, fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum, kükürt bileşenlerini de içermektedir (Şekil 4.4-4.6). Yetiştirme ortamında çok yavaş olarak mineralize olacak bu besin elementlerinin yine bitki büyüme performansında etkili olacağı düşünülmektedir [54].

4.1. Yetiştirme Ortamlarının Fitotoksitesinin Değerlendirilmesi

İn vitro bitkiler ex vitro alıştırmaya duyarlıdır ve alıştırma aşamasında hayatta kalma, bitki büyümesi ve gelişimi için güvenli saksı toprağı şart olmaktadır. Saksı toprağı göstergelerinden biri, saksı yetiştirme ortamının toksitesini değerlendirmek için kullanılan tohum çimlenme testidir [51]. Bu nedenle bu çalışmada saksı yetiştirme ortamının kalitesinin göstergesi olarak kullanılan fitotoksite testleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.1). Sonuçlar, fındık zürufu ve gytja kombinasyonundan hazırlanan saksı yetiştirme ortamlarında çimlenen bitkilerin tohum, kök ve sürgün uzunluğu gibi parametreleri yönünden anlamlı bir istatistiksel fark göstermemiştir ($p > \alpha = 0.05$). Kontrol uygulamalarına göre fındık zürufu ve gytja kullanılarak hazırlanan saksı yetiştirme ortamlarının çimlenme oranı (ÇO), sürgün ve kök uzunluğu benzer ve normal bulunmuştur. Ayrıca nispi tohum çimlenmesi (NTÇ) $\times$ nispi kök büyümesi (NKB) (%) sonuçları, sürgün ve kök uzunluğunun muameleler ve cocopeat kontrol substratları arasında önemli farklılıklar oluşturmadığını göstermiştir ($p > \alpha = 0.05$). Gytja'nın %5 ve %10 karışım uygulamalarından elde edilen solüsyonlar, çimlenme indeksi (Çİ) değerlerinde küçük bir artış göstermiş bu artışın da gytja'nın hem sürgün hem de kök büyümesi üzerindeki uyarıcı etkilerini doğrular nitelikte olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çimlenme testi sonuçları ve gösterge endeksleri (ÇO: çimlenme oranı, NTÇ: nispi tohum çimlenmesi, NKB: nispi kök büyümesi, Çİ: çimlenme indeksi ve FZ: Fındık zürufu)

Muamele	Toksiste göstergeleri			
	ÇO (%)	NTÇ (%)	NKB (%)	TÇİ (%)
Deiyonize Su	96.0 $\pm$ 1.7	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0	100.0 $\pm$ 0.0
Cocopeat (100%)	96.0 $\pm$ 2.0	100.0 $\pm$ 0.1	102.5 $\pm$ 1.3	102.5 $\pm$ 1.4
FZ (%100)	94.7 $\pm$ 1.5	97.3 $\pm$ 1.2	98.7 $\pm$ 2.4	95.9 $\pm$ 2.8
FZ + Gytja (99:1%)	97.3 $\pm$ 2.1	101.3 $\pm$ 1.2	102.4 $\pm$ 2.5	103.4 $\pm$ 1.6
FZ + Gytja (98:2%)	94.7 $\pm$ 2.1	97.3 $\pm$ 2.1	102.3 $\pm$ 1.5	97.2 $\pm$ 2.8

* p-değerleri $> \alpha = 0,05$

Önceki çalışmalar, % 80'in üzerindeki bir NTÇ × NKB değerinin fitotoksisitenin olmadığını gösterdiğini ileri sürmektedir [20]. Bu değerlendirmeye göre NTÇ × NKB değerleri 95,9-105,3 arasında değişmiş ve fitotoksisite göstermemiştir. Bu sonuçlar, önerilen yeni saksı yetiştirme ortamının (findık zürufu + gyttja) güvenle kullanılabileceğini kanıtlar niteliktedir.

4.2. Bitki Hayatta Kalma Oranı

Kontrollü çevre koşullandırılmalı kabin içinde ex vitro alıştırmanın ilk aşamasında test edilen bitki türlerinin çoğu hayatta kalmış ve saksı yetiştirme ortamlarının hayatta kalma oranları üzerindeki etkileri ilk 4 hafta boyunca istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Bununla birlikte primer alıştırma sürecinde hiçbir bitkide yeni yaprak oluşumu ve bitki boyunda artış gözlenmemiştir.

Bitkiler rimer alıştırma kabininden alınıp ex vitro koşullara uyum sağlamak için %50 gölgelendirilmiş ortama transfer edildiğinde yeni yapraklar üretmeye başlamış ve bitki büyümesi gözlenmeye başlamıştır. Deney sonunda; ejderha meyvesi *Hylocereus undatus*, *Aloa vera*, *Rosa hybridae* ve *Loropetalum chinense* bitkilerinin ortalama hayatta kalma oranları sırasıyla % 92,78±6.47, % 68.89±5.02, % 63.33±9.43 ve % 28.89±6.21 olarak tahmin edilmiştir (Tablo 4.2.). *Loropetalum chinense* en düşük hayatta kalma oranına sahip olan bitki türü olmuştur ve bunun nedeninin alıştırma sırasında yaprak desikasyonu ve kök çürümesi olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.2. Alıştırma döneminin sonunda farklı bitki türlerinin farklı saksı topraklarında hayatta kalma yüzdesi

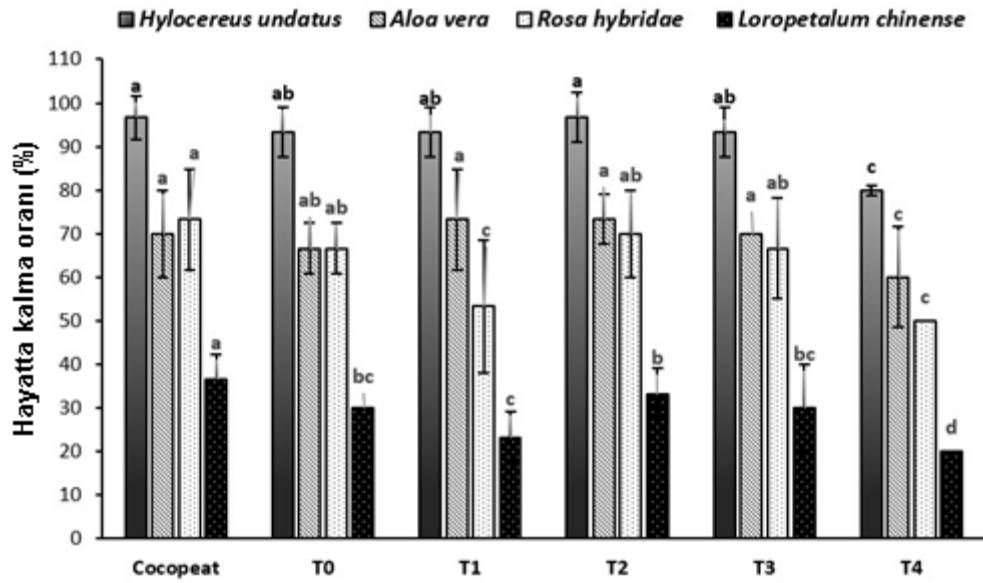
Muameleler	Bitki Türleri			
	Hylocereus undatus	Aloe vera	Rosa hybridae	Loropetalum chinense
Cocopeat (100%)	95.0±5.0	70.0±10.0	73.3±11.5	36.7±5.8
FZ (%100)	93.3±5.8	66.6±5.7	66.7±5.8	30.0±0.0
FZ + Gytija (99:1%)	90.0±0.0	73.3±11.5	66.7±11.5	23.3±5.8
FZ + Gytija (98:2%)	96.6±5.8	73.3±5.7	70.0±10.0	33.3±5.8
FZ + Gytija (95:5%)	90.0±0.0	70.0±0.0	63.3±5.8	30.0±10.0
FZ + Gytija (90:10%)	73.3±5.8	46.6±11.5	46.7±5.8	20.0±0.0
p-değeri	0.02	0.02	0.05	0.03

* p-değerleri < α = 0,05

Üç aylık alıştırma döneminin sonunda, araştırılan mikro çoğaltılmış bitki türlerinin hayatta kalma oranı, *Rosa hybridae* hariç test edilen saksı yetiştirme ortamlarından önemli ölçüde etkilenmiştir. Sukulent bitki türleri %80,8'in üzerinde daha yüksek hayatta kalma oranına sahip olmuştur. Bununla birlikte sırasıyla cocopeat kontrol, T1, T2 ve T3 muamelelerine dikimi yapılan bitkilerde her iki sukulent tür için daha yüksek bir hayatta kalma oranı gözlenmiştir (Tablo 4.2). Cocopeat kontrol uygulamasına benzer şekilde T1, T2 ve T3'te elde edilen benzer hayatta kalma yüzdeleri, alıştırma toprağı olarak formüle edilmiş saksı yetiştirme ortamlarının mikro çoğaltılmış bitkiler için alternatif olarak kullanılabileğini göstermiştir.

Sukulent türlerin tersine odunsu türlerin bitkileri; morfolojik, fizyolojik farklılıklar ve farklı saksı toprakları tarafından sağlanan köklenme ortamı özellikleri nedeniyle düşük hayatta kalma yüzdesi gösterebilmektedir. Cocopeat kontrolüne dikimi yapılan odunsu türlerin bitkileri %40 hayatta kalma oranı göstermiş ve bunu %30'un üzerinde bir hayatta kalma oranı ile T3, T1 ve T2 takip etmiştir (Tablo 4.2.). En düşük hayatta kalma oranı, gytijanın yüksek dozuna (%10) ekilen bitkilerde görülmüştür (Tablo 4.2.).

Önceki çalışmalarda; odunsu bitki ve ağaçların hayatta kalma oranlarının artırılması, kök büyümesini teşvik edici materyaller uygulayarak ve alıştırma boyunca gerçekleşen su stresini azaltmak amacıyla çeşitli iyileştirici çevre şartlarını sağlayarak denenmiştir. Örneğin; oran, mikoriza aşılması ile %90'a yükseltilmiştir [7]. Hassas bitki türleri için büyümeye teşvik eden maddelerin kombinasyonu, alıştırma süreci sırasında köklerin su içinde tutulması ve bitki su stresini azaltmak için uygun çevresel koşulların düzenlenmesi alıştırma oranını artırabilmektedir [55]. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, odunsu türlerin ex vitro ortama alıştırılması için saksı toprağının daha iyi hale getirilmesinin yanı sıra alıştırma koşullarını optimize etmeye hala ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir.



Şekil 4.7. Alıştırma aşamasından sonra farklı saksı toprağındaki farklı bitki türlerinin hayatta kalma yüzdesi. Her bitki türü için $\pm$ standart sapmalar ve LSD çoklu aralık testi $p < 0.05$. Aynı bitki türünde aynı harfi alan uygulamalar istatistiki olarak farklı değildir.

Saksı toprağında kullanılan malzemelerin tür ve çeşitlerinin, dış ortama alıştırma sırasında in vitro bitkilerin hayatta kalma oranını kontrollü çevresel koşullar altında veya yarı steril ex vitro ortamlarda [11] etkilediği bilinmektedir [4]. Gerçekleştirilen bu çalışmanın sonuçları, düşük doz gyttjanın saksı yetiştirme ortamının fiziko-kimyasal özelliklerini önemli ölçüde iyileştirdiğini ve bitki hayatta kalma oranlarının bu

koşullara olumlu yanıt verdiğini göstermiştir. Gytjtada bulunan hümit maddeler de hayatta kalma oranının iyileştirilmesinde etkili olmaktadır. Bununla birlikte gytjtanın küçük partikül boyutunun yüksek oranı ($T4 = \%10$) muhtemelen makro ve mikro gözenek boyutu düzenlemesini bu da bitki sağlığı için çok önemli bir faktör olan köklenme ortamındaki hava-su dengesini bozmuş bitkilerin hayatta kalma oranını düşürmüştür [20].

4.3. Bitki Büyüme Parametreleri

Mikro çoğaltılmış bitkilerde saksı yetiştirme ortamının ex vitro bitki gelişimi üzerindeki etkileri; bitki boyu, sürgün kuru ağırlığı, tüm bitki türleri için fidelerin sürgün-kök oranı ve sukulent türler için gövde tabanı çapı üzerinde istatistiki olarak önemli bir etki göstermiştir (Tablo 4.3.). Genel olarak besin elementi açısından zengin saksı yetiştirme ortamları üzerindeki bitkiler, bitki türlerine bakılmaksızın önemli ölçüde daha fazla bitki boyu, gövde tabanı çapı ve kuru biyokütleyle sahip olmuştur. *Hylocereus undatus* için daha yüksek ortalama bitki boyu, taban çapı ve kuru biyokütle; sırasıyla fındık zürufu, %2 ve %5 gytjtı içeren bileşenlerden elde edilmiştir (Tablo 4.3.). Hayatta kalma oranında gözlemlendiği gibi, %10 gytjtı içeren muamelenin bitki büyüme parametreleri üzerinde zararlı etkileri gözlenmiştir. Yüksek doz gytjtı uygulamasının, araştırılan tüm bitki türleri için düşük bitki büyüme performansından da sorumlu olabileceği sonucuna varılmıştır. Düşük gytjtı (%2, %5) kombinasyonlarına verilen pozitif yanıt, fındık zürufu ve gytjtı karışımının hem yeterli nem ve havalandırma hem de bitkilere yeterli besin ve büyümeyi uyarıcı maddeler sağlama kabiliyetinin sonucunda iyi bitki büyümesi sağlamasından kaynaklanıyor olabilir. Bitki büyüme parametreleri, düşük gözeneklilik ve yüksek su tutma kapasitesi nedeniyle yetiştirme ortamındaki daha yüksek gytjtı dozundan (%10) olumsuz etkilenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 4.3. *Hylocereus undatus*, *Aloe vera*, *Rosa hybridae* ve *Loropetalum chinense* Bitkilerinin Çeşitli Saksı Topraklarına Alıştırılmasının Değerlendirilmesi

Muamele	Hayatta kalma oranı (%)	Bitki uzunluğu (cm)	Gövde tabanı çapı (mm)	Sürgün kuru ağırlığı(g)	Sürgün/kök oranı	Dickson kalite indeksi
<i>Hylocereus undatus</i>						
Coco peat (100%)	96.6	17.0	11.0	0.6752	3.5606	0.1694
FZ (%100)	93.3	12.2	7.7	0.3649	3.1230	0.1023
FZ + Gytija (99:1%)	96.6	14.0	10.0	0.4528	3.0514	0.1351
FZ + Gytija (98:2%)	96.6	17.2	11.7	0.3047	2.8557	0.0951
FZ + Gytija (95:5%)	93.3	19.7	11.7	0.7338	3.6676	0.1745
FZ + Gytija (90:10%)	80.0	11.7	10.0	0.2224	2.6695	0.0796
p-değeri			0.04			
<i>Aloe vera</i>						
Coco peat (100%)	70.0	12.8	5.4	0.3082	3.9755	0.0608
FZ (%100)	66.7	10.4	4.9	0.2661	5.0239	0.0447
FZ + Gytija (99:1%)	73.3	10.9	5.4	0.2787	3.2647	0.0689
FZ + Gytija (98:2%)	73.3	12.9	4.3	0.44	6.4368	0.0539
FZ + Gytija (95:5%)	70.0	13.8	6.3	0.4663	5.4619	0.0721
FZ + Gytija (90:10%)	60.0	9.2	4.7	0.2619	6.1616	0.1555
p-değeri			0.04			
<i>Rosa hybridae</i>						
Coco peat (100%)	46.7	12.6667	3	0.1551	10.0909	0.0120
FZ (%100)	36.7	9.3333	2.3333	0.1334	13.8993	0.0080
FZ + Gytija (99:1%)	43.3	11.3333	3.3333	0.1301	13.9857	0.0080
FZ + Gytija (98:2%)	43.3	12.3333	3.6667	0.1857	9.0866	0.0166
FZ + Gytija (95:5%)	43.3	13	3.6667	0.1789	9.0965	0.0157
FZ + Gytija (90:10%)	36.7	8	2.6667	0.1227	8.8250	0.0116
p-değeri			0.04			
<i>Loropetalum chinense</i>						
Coco peat (100%)	33.3	17.3	6.3	0.3865	8.3184	0.0439
FZ (%100)	13.3	15.6	4.6	0.3643	8.6327	0.0338
FZ + Gytija (99:1%)	16.6	13.3	5.6	0.3188	7.1116	0.0383
FZ + Gytija (98:2%)	16.6	17.0	5.3	0.8319	16.4514	0.0450
FZ + Gytija (95:5%)	20.0	17.3	6.0	0.8861	11.6240	0.0663
FZ + Gytija (90:10%)	6.7	13.0	4.3	0.2729	7.8948	0.8030
p-değeri			0.04			

Saksı toprağındaki fındık zürufu ve %1, %2, %5 oranında gytjadan oluşan uygulamalarda sürgün kuru maddesi için benzer sonuçlar gözlenmiştir. Bitki türüne bakılmaksızın %2 ve %5 gytija içeren fındık zürufuna dikimi yapılan bitkilerde daha fazla kök ve sürgün kuru biyokütlesi ($p < 0.05$) saptanmıştır (Tablo 4.3). Bu sonuçlar, mikro çoğaltılmış süs bitkisi türlerinde ön alıştırma ve/veya alıştırma aşamalarında bitki boyu standardizasyonu ve büyümeyi destekleyici uygulamaların önemini göstermektedir.

Farklı saksı yetiştirme ortamına dikimi yapılan bitki türlerinin büyüme parametrelerindeki farklılıklar önceki çalışmalarda gösterilmiştir [4, 40]. Örneğin, saksı toprağına verilen cevap; alıştırma aşamasına, uygulanan yetiştirme koşullarına ve bitki türlerine bağı olarak değişebilmektedir (Mengesha vd., 2013). Bu çalışmada test edilen bitki türleri, araştırılan yetiştirme ortamı bileşenlerine hemen hemen benzer yanıtlar vermiştir. Benzer toksisite sonuçlarının yanı sıra T2 ve T3 saksı toprakları, alıştırma sürecinde daha iyi bitki büyüme performansı sergilemiş ve bu sonuçlar, cocopeat kontrolüne istatistiki olarak benzer bulunmuştur.

4.4. Dickson Kalite İndeksi

Dickson kalite indeksi; sürgün yüksekliği, sürgün tabanı çapı, kök-sürgün kuru kütlesi ve toplam kuru madde gibi bitki büyüme parametrelerini kullanarak bitki kalitesinin değerlendirmesi anlamına gelip kapsamlı bir değerlendirme alternatifi sunmaktadır. Daha büyük bir indeks değeri, daha çok arzu edilen bitki büyümesini ve bitki fidelerinin sağlamlığını göstermektedir [52].

Bu çalışmada; bitki boyu, sürgün tabanı çapı, sürgün ve kök biyokütlesindeki önemli farklılıklar, test edilen tüm süs türleri için Dickson kalite indeksi tahminini istatistiki olarak etkilemiştir (Tablo 4.3). Genel olarak, fındık zürufuna %10 oranında gyttja karıştırılması kalite indeksi değerinin en düşük olmasına neden olmuştur. T2, T3 ve cocopeat kontrol uygulamaları daha yüksek kalite indeksi değerleri vermiştir. DQI değerleri *Hylocereus undatus* için 0.026 ila 0.071, *Aloe vera* için 0.038 ila 0.072, *Rosa hybridae* için 0.011 ila 0.016 ve *Loropetalum chinense* için 0.055 ila 0.143 (Tablo 4.3.) olarak tahmin edilmiştir.

Bitkilerin kalite indeksi sonuçlarındaki farklılıklar; farklı saksı topraklarının fizikokimyasal özelliklerine, saksı yetiştirme ortamlarının besin sağlama kapasitesine

ve fidelerin yeteri kadar büyümesi için gyttjanın büyümeyi uyarıcı etkilerine bağlı olabilmektedir. Buna göre bitki boyu, kuru kök ve sürgün kütleleri birlikte düşünüldüğünde gyttja uygulamasının saksı toprağı muhteviyatında %2 ve %5 gibi küçük dozlarda hem sukulent hem de odunsu süs türleri için kuvvetli bitki büyümesine neden olduğu sonucuna varılabilir (Tablo 4.3.).

Önceki çalışmalarda turba peletinin, mikro çoğaltılmış ananas bitkilerinin alıştırılması için en iyi saksı toprağı olduğu, organik madde ve kum ile toprak karışımına kıyasla daha güçlü bitki gelişimine teşvik ettiği bildirilmiştir [11]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar; önceki bulgulara benzer şekilde [16, 21] alıştırma aşamasında gyttjanın findık zürufu ile kombine edildiğinde daha hızlı sürgün ve kök büyümesini desteklediği aynı zamanda daha sağlam bitkiler elde etmeye yardımcı olduğunu göstermiştir. Bitki büyüme performansı için %2 ve %5 findık zürufu + gyttja içeren karışımın alıştırma döneminde test edilen süs bitkileri için en iyi Dickson Kalite İndeksi'ni verdiği sonucuna varılmıştır.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikro çoğaltma, in vitro kültür tekniklerini kullanarak süs bitkisi üretiminde büyük ölçüde kullanılırken dış ortama alıştırma aşaması, saksı ortamındaki sınırlı kök oluşumu nedeniyle bir darboğaz olmaktadır. Bu çalışmada, saksı yetiştirme ortamı karışımı, bir in vitro çoğaltma programı çerçevesinde dört farklı süs bitkisi türüne ait fidelerin hızlı köklenme ve hayatta kalma oranını iyileştirmek için test edilmiştir. Test bitkisi olarak iki farklı sukulent bitki türü ve iki farklı odunsu bitki türünün in vitro köklendirilmiş bitkileri kullanılmıştır. Yetiştirme ortamı olarak organik atık malzemeler fındık zürufu ve gyttjadan hazırlanan karışımlar denenmiş ve bu karışımların bitkisel üretimde geridönüşüm olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen tüm bulgular birlikte düşünüldüğünde ulaşılan sonuçlar aşağıdaki gibidir:

Bitki büyüme parametresi ve kalite indeksine göre en iyi sonuçlar fındık zürufu ile % 2 ve % 5 gyttja içeren T2 ve T3'te yetiştirilen bitkilerden elde edilmiştir. Odunsu türler saksıya doğrudan transplantasyona duyarlı bulunmuş ve ekimden önce ilk kök oluşumuna ihtiyaç duymuşlardır. Hayatta kalma oranları ve bitki büyüme parametreleri, test edilen bitki türlerine bakılmaksızın %2 ila %5 gyttja ve fındık zürufu içeren ortamda daha yüksek gerçekleşmiştir.

Fizikokimyasal karakterizasyon, çimlenme testleri ve iklimlendirme deneylerine dayanarak fındık zürufu ve gyttja'nın ex-vitro alıştırma için saksı yetiştirme ortamı olarak başarıyla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, türler arasındaki farklılıklar nedeniyle bitki türlerinin saksı toprağı bileşenlerinin değerlendirilmesinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle, yeni

bitki türleri denendiğinde optimum kombinasyonun ve uygun iklimlendirme protokollerinin belirlenmesi için ön testlerin yapılması gerektiği önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] T. Kozai, "Acclimatization of micropropagated plants," in High-tech and micropropagation I, Springer, 1991, pp. 127–141.
- [2] S. Chandra, R. Bandopadhyay, V. Kumar, and R. Chandra, "Acclimatization of tissue cultured plantlets: From laboratory to land," Biotechnology Letters, vol. 32, no. 9, pp. 1199–1205, 2010.
- [3] J. E. Preece and E. G. Sutter, "Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field," in Micropropagation, Springer, 1991, pp. 71–93.
- [4] I. Iliev, P. Kitin, and R. Funada, "Morphological and anatomical study on in vitro root formation of silver birch (*Betula pendula* Roth.)," Propag. Ornam. Plants, vol. 1, pp. 10–19, 2001.
- [5] B. N. Hazarika, "Acclimatization of tissue-cultured plants," Curr. Sci., pp. 1704–1712, 2003.
- [6] I. Siddique and M. Anis, "An improved plant regeneration system and ex vitro acclimatization of *Ocimum basilicum* L.," Acta Physiol. Plant., vol. 30, no. 4, pp. 493–499, 2008.
- [7] R. Rohr, I. Iliev, A. Scaltsoyennes, and P. Tsoulpha, "Acclimatization of micropropagated forest trees," in I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants 616, 2001, pp. 59–69.
- [8] P. Kadlecěk, I. Tichá, D. Haisel, V. Čapková, and C. Schäfer, "Importance of in vitro pretreatment for ex vitro acclimatization and growth," Plant Sci., vol. 161, no. 4, pp. 695–701, 2001.
- [9] R. E. Spier, Encyclopedia of Cell Technology; 2 Volume Set. John Wiley & Sons, 2000.

- [10] J. Thomas, D. Ajay, R. R. Kumar, and A. K. A. Mandal, "Influence of beneficial microorganisms during in vivo acclimatization of in vitro-derived tea (*Camellia sinensis*) plants," *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, vol. 101, no. 3, pp. 365–370, 2010.
- [11] A. Mengesha, B. Ayenew, and T. Tadesse, "Acclimatization of in vitro propagated pineapple (*Ananas comosus* (L.), var. smooth cayenne) plantlets to ex vitro condition in Ethiopia," 2013.
- [12] M. S. Barreto and A. Nookaraju, "Effect of auxin types on in vitro and ex vitro rooting and acclimatization of grapevine as influenced by substrates," *Indian J. Hortic.*, vol. 64, no. 1, pp. 5–11, 2007.
- [13] A. H. Naing, S. H. Kim, M. Y. Chung, S. K. Park, and C. K. Kim, "In vitro propagation method for production of morphologically and genetically stable plants of different strawberry cultivars," *Plant Methods*, vol. 15, no. 1, pp. 1–10, 2019.
- [14] J. Pospíšilová, I. Tichá, P. Kadleček, D. Haisel, and Š. Plzáková, "Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions," *Biol. Plant.*, vol. 42, no. 4, pp. 481–497, 1999.
- [15] Y. Wu, Y. Xia, J. Zhang, F. Du, L. Zhang, and H. Zhou, "Low humic acids promote in vitro lily bulblet enlargement by enhancing roots growth and carbohydrate metabolism," *J. Zhejiang Univ. B*, vol. 17, no. 11, pp. 892–904, 2016.
- [16] M. S. Elmongy, X. Wang, H. Zhou, and Y. Xia, "Humic Acid and Auxins Induced Metabolic Changes and Differential Gene Expression during Adventitious Root Development in Azalea Microshoots," *HortScience*, vol. 55, no. 6, pp. 926–935, 2020.
- [17] S. Petropoulos et al., "Cotton and cardoon byproducts as potential growing media components for *Cichorium spinosum* L. commercial cultivation," *J. Clean. Prod.*, vol. 240, p. 118254, 2019.
- [18] N. S. Gruda, "Increasing sustainability of growing media constituents and stand-alone substrates in soilless culture systems," *Agronomy*, vol. 9, no. 6, p. 298, 2019.
- [19] D. E. Kester, Hartmann and Kester's Plant propagation principles and practices. 2002.

- [20] O. H. Dede, G. Dede, S. Ozdemir, and M. Abad, "Physicochemical characterization of hazelnut husk residues with different decomposition degrees for soilless growing media preparation," *J. Plant Nutr.*, vol. 34, no. 13, pp. 1973–1984, 2011.
- [21] F. Gülser, C. YILMAZ, and F. Sönmez, "Gıda ve kimyasal gübre uygulamalarının yetiştirme ortamı ile biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisinde meyvelerin pomolojik ve biyokimyasal özelliklerine etkileri," *Toprak Bilim. ve Bitki Besleme Derg.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–5, 2014.
- [22] E. ÖZKAYNAK and B. SAMANCI, "MİKROÇOĞALTIMDA ALIŞTIRMA," *Selcuk J. Agric. Food Sci.*, vol. 19, no. 36, pp. 28–36, 2005.
- [23] F. Afreen-Zobayed, S. M. A. Zobayed, C. Kubota, T. Kozai, and O. Hasegawa, "Supporting material affects the growth and development of in vitro sweet potato plantlets cultured photoautotrophically," *Vitr. Cell. Dev. Biol.*, vol. 35, no. 6, pp. 470–474, 1999.
- [24] G. Fila, J. Ghashghaie, J. Hoarau, and G. Cornic, "Photosynthesis, leaf conductance and water relations of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation," *Physiol. Plant.*, vol. 102, no. 3, pp. 411–418, 1998.
- [25] A. A. Estrada-Luna, F. T. Davies, and J. N. Egilla, "Physiological changes and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatization," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 66, no. 1, pp. 17–24, 2001.
- [26] J. Pospisilova, H. Synková, D. Haisel, and S. Semoradova, "Acclimation of plantlets to ex vitro conditions: Effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid (a Review)," *Acta Hortic.*, vol. 748, p. 29, 2007.
- [27] J. A. Teixeira da Silva, M. M. Hossain, M. Sharma, J. Dobránszki, J. C. Cardoso, and S. ZENG, "Acclimatization of in Vitro -derived *Dendrobium*," *Hortic. Plant J.*, vol. 3, no. 3, pp. 110–124, 2017.
- [28] M. Manokari, S. Priyadharshini, and M. S. Shekhawat, "Microstructural and histochemical variations during in vitro to in vivo plant developments in *Aloe vera* (L.) Burm. f (*Xanthorrhoeaceae*)," *Ind. Crops Prod.*, p. 113162, 2020.
- [29] J. Messeguer and E. Mele, "Acclimatization of in vitro micropropagated roses," in *Abstracts of the VI international congress of plant tissue and cell culture*, Univ Minnesota, MN, 1986, p. 236.
- [30] D. R. Davies, "Rapid propagation of roses in vitro," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 13, no. 4, pp. 385–389, 1980.

- [31] P. S. Campos, M. Salomé, and S. Pais, "Mass propagation of the dwarf rose cultivar 'Rosamini,'" *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 43, no. 3–4, pp. 321–330, 1990.
- [32] M. Khosh-Khui and K. C. Sink, "Rooting-enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 17, no. 4, pp. 371–376, 1982.
- [33] M. Khosh-Khui and K. C. Sink, "Micropropagation of new and old world rose species," *J. Hortic. Sci.*, vol. 57, no. 3, pp. 315–319, 1982.
- [34] L. A. M. Dubois, J. Roggemans, G. Soyeurt, and D. P. De Vries, "Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivars propagated in vitro and in vivo by softwood cuttings," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 35, no. 3–4, pp. 293–299, 1988.
- [35] A. F. Wafaa and H. M. Wahdan, "Influence of substrates on in vitro rooting and acclimatization of micropropagated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.)," *Middle East J*, vol. 6, no. 3, pp. 682–691, 2017.
- [36] D. Clapa, A. Fira, and M. Simu, "The role of rooting substrate in blackberry ex vitro rooting and acclimatization stage," *ProEnvironment Promediu*, vol. 8, no. 22, 2015.
- [37] R. Ibrahim and P. C. Debergh, "Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.)," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 88, no. 1, pp. 41–57, 2001.
- [38] J. X. Hui, S. C. Wen, Z. Y. Hua, and L. X. Ming, "Comparative study on different methods for *Lonicera japonica* Thunb. micropropagation and acclimatization," *J. Med. Plants Res.*, vol. 6, no. 27, pp. 4389–4393, 2012.
- [39] Y. S. Huh, J. K. Lee, and S. Y. Nam, "Improvement of ex vitro acclimatization of mulberry plantlets by supplement of abscisic acid to the last subculture medium," *J. Plant Biotechnol.*, vol. 44, no. 4, pp. 431–437, 2017.
- [40] A. D. Oakes, T. Desmarais, W. A. Powell, and C. A. Maynard, "Improving rooting and shoot tip survival of micropropagated transgenic american chestnut shoots," *HortScience*, vol. 51, no. 2, pp. 171–176, 2016.
- [41] L. E. B. Baldotto, M. A. Baldotto, L. P. Canellas, R. Bressan-Smith, and F. L. Olivares, "Growth promotion of pineapple 'Vitória' by humic acids and *Burkholderia* spp. during acclimatization," *Rev. Bras. Ciência do Solo*, vol. 34, no. 5, pp. 1593–1600, 2010.

- [42] S. Nardi, D. Pizzeghello, A. Muscolo, and A. Vianello, "Physiological effects of humic substances on higher plants," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 34, no. 11, pp. 1527–1536, 2002.
- [43] N. N. Hoang, Y. Kitaya, T. Shibuya, and R. Endo, "Effects of supporting materials in in vitro acclimatization stage on ex vitro growth of wasabi plants," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 261, p. 109042, 2020.
- [44] L. P. Pérez et al., "Effects of different culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin indole-butyric acid on the in vitro acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Red Maradol) plants using zeolite as support," *African J. Biotechnol.*, vol. 14, no. 35, pp. 2622–2635, 2015.
- [45] P. Baskaran, M. Moyo, and J. Van Staden, "In vitro plant regeneration, phenolic compound production and pharmacological activities of *Coleonema pulchellum*," *South African J. Bot.*, vol. 90, pp. 74–79, 2014.
- [46] P. Fernandes, S. Tedesco, I. Vieira da Silva, C. Santos, H. Machado, and R. Lourenço Costa, "A new clonal propagation protocol develops quality root systems in Chestnut," *Forests*, vol. 11, no. 8, p. 826, 2020.
- [47] A. Puri, K. P. Padda, and C. P. Chanway, "In vitro and in vivo analyses of plant-growth-promoting potential of bacteria naturally associated with spruce trees growing on nutrient-poor soils," *Appl. Soil Ecol.*, vol. 149, p. 103538, 2020.
- [48] D. Dutra, T. R. Johnson, P. J. Kauth, S. L. Stewart, M. E. Kane, and L. Richardson, "Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 94, no. 1, pp. 11–21, 2008.
- [49] C. Azcón-Aguilar, M. Cantos, A. Troncoso, and J. M. Barea, "Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets," *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 72, no. 1, pp. 63–71, 1997.
- [50] R. M. Moraes et al., "Arbuscular mycorrhiza improves acclimatization and increases lignan content of micropropagated mayapple (*Podophyllum peltatum* L.)," *Plant Sci.*, vol. 166, no. 1, pp. 23–29, 2004.
- [51] Y. Luo et al., "Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects," *Waste Manag.*, vol. 71, pp. 109–114, 2018.

- [52] S. Eskandari, A. Mohammadi, M. Sandberg, R. L. Eckstein, K. Hedberg, and K. Granström, "Hydrochar-amended substrates for production of containerized pine tree seedlings under different fertilization regimes," *Agronomy*, vol. 9, no. 7, p. 350, 2019.
- [53] M. E. Compton, "Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 37, no. 3, pp. 217–242, 1994.
- [54] S. Ozdemir, O. H. Dede, and M. Yaqub, "Assessment of long-term nutrient effective waste-derived growth media for ornamental nurseries," *Waste and Biomass Valorization*, vol. 8, no. 8, pp. 2663–2671, 2017.
- [55] J. C. A. Hiti-Bandaralage, A. Hayward, and N. Mitter, "Structural relation for acclimatization success for in vitro cultured avocado," in *XXX International Horticultural Congress IHC2018: II International Symposium on Micropropagation and In Vitro Techniques* 1285, 2018, pp. 269–280.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Merve Özdemir

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Sakarya Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Çevre Mühendisliği	Devam Ediyor
Lisans	Sakarya Üniversitesi / Mühendislik Fakültesi / Çevre Mühendisliği	2018
Lise	Şehit Üsteğmen Selçuk Esedoğlu Anadolu Lisesi	2014

YABANCI DİL

İngilizce

ESERLER (makale, bildiri, proje vb.)

1. Ozdemir, Saim, Merve Ozdemir, and Kaan Yetilmezsoy. "EFFECTS OF ACCLIMATIZATION SOIL PREPARED FROM HAZELNUT HUSK AND GYTTJA ON IN VITRO PROPAGATED ORNAMENTAL PLANTS." *Propagation of Ornamental Plants* 20.2 (2020): 63-71.
2. Ozdemir, Saim, and Merve Ozdemir. "Hazelnut Husk Based Acclimatization Soil for in vitro Propagated Ornamental Plants."