

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

***Orchis sancta* L. TÜRÜNÜN IN VITRODA ÇOĞALTILMASI ÜZERİNE FARKLI
KONSANTRASYONLARDAKİ KARBON FORMLARININ ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hamiyet BOZDEMİR
(133106006)**

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr Arzu ÇİĞ
Ortak Danışman: Doç. Dr. Nalân TÜRKÖĞLU**

**Temmuz- 2016
SİİRT**

TEZ KABUL VE ONAYI

Hamiyet BOZDEMİR tarafından hazırlanan “*Orchis sancta* L. TÜRÜNÜN IN VİTRODA ÇOĞALTILMASI ÜZERİNE FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ KARBON FORMLARININ ETKİSİ” adlı tez çalışması 28/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Yrd. Doç. Dr. Sinan İŞLER

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÇİĞ

Üye

Yrd. Doç. Dr. Mine PAKYÜREK

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Koray ÖZRENK
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Koordinatörlüğü tarafından 2015-FEB-25 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖN SÖZ

Türkiye, orta kuşak orkideleri bakımından Avrupa ve Ortadoğu'nun en zengin ülkelerinden biridir ancak gelişen sanayileşme, hızlı kentleşme ve nüfus artışı toplumsal, ekonomik ve kültürel dengesizlikleri beraberinde getirmektedir. Dünyada nesli tükenmekte olan ve zarar gören bitki türleri arasında gösterilen salep orkidelerinin karşılaştığı en büyük sorun, bitkiden elde edilen drogün bilinen tıbbi önemi ile özellikle dondurma ve sıcak içecek sektöründeki ticari değerinden dolayı yapılan aşırı bitki sökümüdür. Kontrolsüz yapılan bu sökülme nedeniyle alternatif üretim ve çoğaltma metotlarının geliştirilmesi amaçlanmış olup tohumlarla laboratuvarlarda sürekli yeni teknikler geliştirilmektedir.

Orchis sancta L. türü de bu amaçlarla sökülme yapılan ve farklı metotlarla üretimi üzerinde çalışılan bir orkide türüdür. Yapılan bu çalışma ile bir salep orkidesi olan *Orchis sancta* L.'nin in vitro koşullarda asimbiyotik olarak çoğaltılması ve tür devamlılığının sağlanması amaçlanmıştır.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmalara katkılarından dolayı sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Arzu ÇIĞ'a; verilerin istatistik analizlerinin yapılmasında emeği geçen Yrd. Dr. Nazire MİKAIL'e; Tarla bitkileri Bölümü Laboratuvarının imkânlarını esirgemeyen hocalarıma ve Yrd. Doç. Dr. Fatih ÇIĞ'a; çalışmamıza maddi destek veren Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne; kullanılan orkide tohumlarının temininde yardımcı olan Dr. Mehmet TUTAR'a; Biyoloji Bölümü Laboratuvarının imkânlarını esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Emre EREZ'e sonsuz teşekkür ederim. Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hamiyet BOZDEMİR

SİİRT-2016



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ.....	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	5
3. MATERYAL VE METOT.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. <i>Orchis sancta</i> L.....	15
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Tohumlara canlılık testinin yapılması.....	16
3.2.2. Genel sterilizasyon işlemleri.....	17
3.2.3. Tohumlara yüzey sterilizasyonunun yapılması.....	17
3.2.4. Kültür ortamlarının hazırlanması.....	18
3.2.5. İncelenen özellikler.....	19
3.2.5.1. Tohumların çimlenme oranı (%).....	19
3.2.5.2. Protokorm oluşum oranı (%).....	20
3.2.5.3. Sürgün oluşum oranı (%).....	20
3.2.5.4. Çimlenme süresi (gün).....	20
3.2.5.5. Protokorm oluşum süresi (gün).....	20
3.2.5.6. Sürgün oluşum süresi (gün).....	20
3.2.6. İstatistiki değerlendirmeler.....	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	23
4.1. Tohumların Çimlenme Oranı (%).....	24
4.2. Protokorm Oranı (%)	29
4.3. Sürgün Oranı (%).....	32
4.4. Çimlenme Süresi (gün)	36
4.5. Protokorm Oluşum Süresi (gün)	39
4.6. Sürgün Oluşum Süresi (gün).....	42



5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	45
5.1. Sonuçlar	45
5.2. Öneriler	46
6. KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	55





TABLULAR LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. Van Waes ve Debergh kültür ortamında yer alan maddeler ve miktarları	19
Tablo 4.1. Karbonhidrat formlarının ve konsantrasyonlarının tohumların çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum oranlarına etkisi (%).....	23
Tablo 4.2. Karbonhidrat formlarının ve konsantrasyonlarının tohumların çimlenme protokorm ve sürgün oluşum sürelerine etkisi (gün).....	24
Tablo 4.3. Karbonhidrat formlarının tohumların çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum oranlarına etkisi (%).....	25
Tablo 4.4. Karbonhidrat konsantrasyonlarının tohumların çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum oranlarına etkisi (%).....	26
Tablo 4.5. Karbonhidrat formlarının tohumların çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum sürelerine etkisi (gün).....	36
Tablo 4.6. Karbonhidrat konsantrasyonlarının tohumların çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum sürelerine etkisi (gün).....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1. <i>Orchis sancta</i> L. bitkisinin genel görüntüsü.....	15
Şekil 3.2. <i>Orchis sancta</i> L. tohumlarına uygulanan canlılık testi.....	16
Şekil 3.3. Kültür ortamlarının hazırlanması.....	18
Şekil 3.4. Kültür ortamı içine tohum ekimi.....	19
Şekil 3.5. Çimlenen orkide tohumlarının mikroskop altında görüntüsü	20
Şekil 3.6. Protokorm oluşumunun mikroskop altında görüntüsü.....	20
Şekil 3.7. Protokorm oluşumu.....	21
Şekil 3.8. Sürgün oluşumu.....	21
Şekil 4.1. Karbonhidrat formlarının tohumların çimlenme oranına etkisi (%).....	26
Şekil 4.2. Karbonhidrat konsantrasyonlarının tohumların çimlenme oranına etkisi (%).....	27
Şekil 4.3. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının tohumların çimlenme oranına etkisi (%).....	27
Şekil 4.4. <i>O. sancta</i> tohumlarının kültür ortamında çimlenmesi.....	28
Şekil 4.5. Karbonhidrat formlarının protokorm oluşum oranına etkisi (%).....	30
Şekil 4.6. Karbonhidrat konsantrasyonlarının protokorm oluşum oranına etkisi (%).....	30
Şekil 4.7. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının protokorm oluşum oranına etkisi (%).....	31
Şekil 4.8. <i>O. sancta</i> tohumlarının kültür ortamında protokorm oluşturması.....	31
Şekil 4.9. Karbonhidrat formlarının sürgün oluşum oranına etkisi (%).....	33
Şekil 4.10. Karbonhidrat konsantrasyonlarının sürgün oluşum oranına etkisi (%).....	34
Şekil 4.11. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının sürgün oluşum oranına etkisi (%).....	35
Şekil 4.12. Kültür ortamında oluşan <i>O. sancta</i> sürgünleri).....	35
Şekil 4.13. Karbonhidrat formlarının tohumların çimlenme süresine etkisi (%).....	37
Şekil 4.14. Karbonhidrat konsantrasyonlarının çimlenme süresine etkisi (%).....	37
Şekil 4.15. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının çimlenme süresine etkisi (%).....	38
Şekil 4.16. Karbonhidrat formlarının protokorm oluşum süresine etkisi (%).....	40
Şekil 4.17. Karbonhidrat konsantrasyonlarının protokorm oluşum süresine etkisi (%).....	40
Şekil 4.18. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının protokorm oluşum süresine etkisi (%).....	41
Şekil 4.19. Karbonhidrat formlarının sürgün oluşum süresine etkisi (%).....	42
Şekil 4.20. Karbonhidrat konsantrasyonlarının sürgün oluşum süresine etkisi (%).....	43
Şekil 4.21. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının sürgün oluşum süresine etkisi (gün).....	44



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
IAA	: Indole asetik asit
NH₄NO₃	: Amonyum nitrat
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
N	: Azot (Nitrogen)
Ca	: Kalsiyum (Calcium)
VWD	: Van Waes Debergh
GA₃	: Giberillic acid
Ca(ClO)₂	: Kalsiyum hipoklorit
IBA	: Indole butirik asit
MS	: Murashige & Skoog

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
°C	: Derece santigrad
dm	: Desimetre
g	: Gram
l	: Litre
mm	: Milimetre
pH	: Asitlik derecesi
%	: Yüzde
mg	: miligram



ÖZET

YÜKSEK LİSANS

***Orchis sancta* L. TÜRÜNÜN IN VITRODA ÇOĞALTILMASI ÜZERİNE FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ KARBON FORMLARININ ETKİSİ**

Hamiyet BOZDEMİR

**Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Arzu ÇİĞ
Ortak Danışman: Doç. Dr. Nalân TÜRKOĞLU**

2016, 55 Sayfa

Bu çalışmada, kontrolsüz söküm nedeniyle kaybolma tehdidi altında bulunan ve salep elde etmede kullanılan *Orchis sancta* L. türünün in vitro koşullarda çimlendirilerek çoğaltılması amaçlanmıştır. Van Waes Debergh kültür ortamının içine 0, (kontrol grubu), 20, 40, 60, 80 ve 100 gr/l konsantrasyonlarındaki sukroz, glukoz, maltoz, galaktoz ve fruktoz formundaki karbonhidratların ilave edilmesiyle, şekerin *Orchis sancta* L. tohumlarının çimlenmesi ve gelişmesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Çalışmada çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum süreleri ile oranları incelenmiştir. Çimlenmeye ait en yüksek ortalama % 77,85 ile Maltoz40; en düşük ortalama ise % 44,36 ile Galaktoz100 ortamlarında elde edilmiştir. Protokorm oluşumunda en yüksek ortalama değer % 68,53 ile Sukroz100; en düşük ortalama değer ise % 25,33 ile Fruktoz100 ortamlarında belirlenmiştir. En yüksek sürgün oluşum oranı % 13,30 ile Sukroz40 ortamında elde edilmiştir. Çimlenme süresi 12,50-21,33 gün; protokorm oluşum süresi 22,50-50,83 gün ve sürgün oluşum süresi 50,66-105,33 gün aralıklarında belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Asimbiyotik,,in vitro, Karbonhidrat, Konsantrasyon, *Orchis sancta* L.



ABSTRACT

MASTER THESIS

EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF CARBON FORMS ON SPECIES OF *Orchis sancta* L. PROPAGATION IN VITRO

Hamiyet BOZDEMİR

The Graduate School of Natural and Applied Science of Siirt University
The Degree of Master of Science
Department of Horticulture

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Arzu ÇIĞ
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nalân TÜRKOĞLU

2016, 55 Pages

In this study, the goal was the germination and propagation of *Orchis sancta* L. which is endangered due to uncontrolled collection and used in obtaining salep, under *in vitro* conditions. By the addition 0 (control group), 20, 40, 60, 80 and 100 g / l concentrations of sucrose, glucose, maltose, galactose and fructose of carbohydrate forms into Van Waes Debergh culture medium, sugars of effects were determined on germination and development of *Orchis sancta* L. seeds. In the study, germination, formation of protocorm and shoot periods and ratios were examined. When the highest average germination ratio was obtained as % 77,85 in Maltose40, the lowest average as % 44,36 in Galaktose100 mediums. In protocorm formation, when the highest average ratio was detected as % 68,53 in Sucrose100, the lowest average as % 25,33 in Fruktose100 mediums. Germination period as 12,50-21,33 days, protocorm formation period as 22,50-50,83 days and shoot formation period as 50,66-105,33 days intervals were determined.

Keywords: Asymbiotic, Concentration, Carbohydrate, *in vitro*, *Orchis sancta* L.



1. GİRİŞ

Tür sayısı bakımından çiçekli bitkilerin en geniş familyalarından biri olan *Orchidaceae* familyasının dünya üzerinde yaklaşık 600-800 cins ve 30-35.000 kadar türü varken (Özkoç, 1991; Aytaş, 1994), son yapılan araştırmalara göre familyaya 9 cinse ait 46 türün daha katıldığı bildirilmiştir (Kreutz, 2000). Yurdumuzda ise % 13'ü endemik olmak üzere, toplam 150 adet orkide türü belirlenirken (Erdem, 2004); bu miktarın içinde kalan ve salep elde edilen 117 adet orkide türünün bulunduğu bildirilmektedir (Sezik, 2002). Orkide türleri arasında epifit olanlar şişkinleşmiş kökleri ile tropik ormanlarda ağaçlar üzerinde yaşamaktadır. Ilıman kuşak veya karasal orkideler olarak bilinen türlerin ise toprak altı organları yumru (tuber), kök ve rizom olarak farklılık göstermektedir. Yumrulu bitkilerin genellikle birbirine yapışık ve iki adet olarak bulunduğu, bitki geliştikçe yeni yumrunun da geliştiği ve yeni bitkinin çiçekli haldeyken kazılıp toplanarak salep elde edildiği belirtilmektedir (Sezik, 1984). Orkide türlerinde çimlenmeden sonra yaprak ve yumru oluşumunun uzun yıllar aldığı ve en kısa ortalamanın 2-4 yıl olduğu bildirilmiş olup; ilk yaprak oluşumunun *Orchis*, *Ophrys*, *Dactylorhiza* ve *Listera* türlerinde ortalama 4 yıl; *Epipactis* ve *Cephalanthera* türlerinde 2-3 yıl, ilk yumrunun *Spiranthes aestivalis* türünde 9 yıl, ilk çiçeğin *Neottia* türlerinde 9-12 yılda meydana geldiği ortaya koyulmuştur (Sezik, 1984).

Salep denilince ülkemizde sıcak olarak içilen alkolsüz bir içki akla gelmektedir. Hatipoğlu (1981), salebi, üretimi yapılmadan doğal bitki örtüsünden sökülen soğanlı-yumrulu ve rizomlu süs bitkileri başlığında göstermiş olup; artan fiyatı nedeniyle içinde insan sağlığına zarar verebilen muscarin maddesini taşıyan *Muscari* bitkisinin toz haline getirilmiş yumrularının ve daha başka bitki yumrularının da katkı maddesi olarak kullanıldığını bildirmiştir. Araştırmacı salebin artan fiyatının neden olduğu yoğun söküm sorununun bir narenciye ve bağcılık gibi uluslararası düzeyde olmayıp büyük ölçüde Türkiye'yi ilgilendirdiğini o yıllarda vurgulamıştır. Gelişmiş ülkelerde yeni yeni kullanılan salebin ülkemizdeki gibi kitle halinde tüketilmediği, yabancı ülkelerin bile floramızın tahrip olması ve gen kaynaklarımızın yok olmasına tepkisiz kalmadıkları ve bu sorunla ilgilendikleri belirtilmiştir.

Salebin etkili maddesi olan glikomannan süt ya da su ile şişerek akıcı bir çözelti meydana getirir. Bu sayede salep soğuk kış günlerinin vazgeçilmez içeceği olmuştur. Bunun yanında salep, meşhur Maraş dondurmasının içine katılarak geç erime ve sertlik özelliklerini kazandırmaktadır. Salebin bu türlü kullanımlarının yanında tıbbi önemi de

vardır. İbn-i Sina'nın salebin balgam sökücü ve iştah açıcı, felç giderici ve afrodisyak olarak kullanılmasını tavsiye ettiği bildirilmektedir (Sezik, 1984). Ancak, günümüzde esas olarak bu amaçlarla kullanılmayan salep, içecek olarak tüketilmekte ve dondurmanın yapısına girerek ekonomik değer kazanmaktadır. Bu kadar faydalı ve ticari önemi olan salebi elde etmek için önüne geçilemeyen müthiş bir söküm vardır. Salep yumrulu orkidelerden, daha çok *Anacamptis*, *Orchis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Himantoglossum*, *Barlia* gibi ovoit yumrulu olanlarla *Dactylorhiza* gibi parçalı yumruluların bazı türlerinden elde edilmektedir. Toplanan her yumru ile bir sonraki yıl meydana gelecek bitki ve bu bitkinin üreteceği çok sayıdaki tohumun meydana gelmesi engellenmiş olmaktadır. Sezik'e (1984) göre yumrular taze iken 2-7 gram ağırlığındadır. Ortalama 4 gram olarak düşünülürse 1 kg taze yumru için 250 kadar orkidenin sökülmesi gerekmektedir. Bir salep toplayıcısı normalde günde 1 kg kadar taze yumru toplayabilmektedir. 1 kg salep üretmek için yaklaşık 1000-4000 yumruya gerek vardır. İşler (2005), sökümü Van'da yapılan kurutulmuş dağ salebinin kilosunun 100 TL, ayır salebinin ise 25 TL'den satıldığını; bu sökümün ayır salebi elde edilen orkide türlerine nazaran özellikle dağlık bölgelerde toplanan yumrulu orkideleri tehlikeye soktuğunu bildirmektedir. Bu acımasız kazancın durdurulmasıyla ilgili ülkemizde yasalar olmasına rağmen uygulanmamaktadır. Tekinşen'e (2006) göre Türkiye'de üretilen 35-65 ton miktarındaki salebin 15-20 ton kadarı çoğunlukla toz şeklinde yurtdışına çıkarılmakta, yaklaşık 50 ton kadar salep tane ya da toz halinde yurtdışından Türkiye'ye getirtilmektedir. 2004'te doğadan sökülmelerini sınırlayan "Doğal iek Soğanlarının Sökümü, Üretimi ve Ticaretine İlişkin Yönetmelik" yürürlüğe girmiştir. Bu yönetmelik Nesilleri Tehlikede Olan Doğal Bitki ve Hayvan Türlerinin Uluslararası Ticaretinin Düzenlenmesine Dair Anlaşma (The Convention on International Trade In Endangered Species of Wild Fauna and Flora- CITES) hükümlerine uyarlanmış olup, yine Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın, Doğal iek Soğanlarının 2006 yılı İhracat Listesi Hakkındaki 2005/44 No'lu tebliğinde numaraları belirtilen *Orchidaceae* (salep) türlerinin yumru ve droğlarında (toz, tablet) ve her türlü formdaki yasak olduğunu belirten hükmü bulunmaktadır (Url-1). Buna rağmen salep elde etmek amacıyla her yıl milyonlarca orkide tahrip edilmektedir.

Türkiye'deki bu nadir bitkiler büyük tehlike altında, hatta soyu tükenme tehlikesi ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu tehlikenin nedenlerinden biri hızlı büyüyen yapılaşma ve doğa alanlarının tahribidir. Düzensiz şehirleşme, tarla alanlarını kazanmak için ormanlık ve sulak alanların bozulması ve aşırı otlatma orkidelerin varlığını tehdit

etmektedir. Bütün dünyada orkideler tehlike altında olan ve korunması gereken bitkiler olarak kabul edilmektedir. Salep elde edilen orkidelerin ise durumları daha vahimdir. Yumruları sürekli sökülen orkideler bir türlü tohum oluşturamamaktadır. Oluşan tohumların ise çimlenebilmeleri ise oldukça zordur. Sezik'e (1984) göre yüksek rakıma sahip bölgelerde yetişen orkideler bazen düşük ışıdan dolayı gelişmesini tamamlayıp tohum bağlayamamaktadır. Ya da sık orman altındaki orkidelerde ışık eksikliğinden dolayı hayat olayları çok yavaş ilerlemekte ve bitkiler istenen gelişmişlik düzeyine ulaşamamaktadır. Orkide tohumlarının en önemli özellikleri oldukça küçük olmaları, tohumda endospermin bulunmayışı ve embriyonun gelişmemiş durumda olmasıdır. Embriyolar farklılaşmamış 80-100 hücreden meydana gelmiştir.

Bu tohumlar 0,25-1,2 mm uzunluğunda ve 0,09-0,27 mm genişliğinde olup; 0,3-1,4 mg ağırlığındadır (Arditti, 1967). Mitchell'e (1989) göre orkideler tüm iekli bitkiler içinde tohumları en küçük olan türlerdir. Smreciu ve Currah (1989) ise küçük olan bu tohumların testalarının ince olduğunu; gevşek ve şeffaf bir hücre tabakasından oluştuğunu ve çok küçük embriyolara sahip olduğunu bildirmiştir. Son derece küçük olan ve endosperm taşımayan orkide tohumlarının çimlenebilmesi için düştüğü yerin mikro klimasının uygun ışı, ışık, oksijen, nem ve toprak şartlarına sahip olması gerekmektedir. Çoğalma kapasiteleri son derece sınırlı olan ve endosperm taşımayan salep orkide tohumlarının çimlenebilmesi için uygun sıcaklık, ışık, nem ve oksijenin yanı sıra, ortamda uygun bir mikorizal fungus ile mikorizal bir ilişki oluşturabilme gereği bulunmaktadır (Sezik, 1984).

Çünkü orkide tohumlarının besin rezervleri içermemelerinden dolayı, glikoz gibi dışarıdan bir karbonhidrat kaynağı sağlanmadıkça başarılı bir çimlenme gerçekleşmediği belirtilmektedir (Ingold ve Hudson, 1993). Ancak *in vitro* üretim yöntemlerinin kullanılmasıyla mikorizal funguslara gereksinim duymadan da çoğalabilirler

Birçok yazarın orkidelerin *in vitro* imlendirilmesinin avantajları hakkındaki görüş ve düşüncelerini bir çatı altında toplayan Pierik (1987)'e göre; orkide tohumları, çok küçük az veya hiç besin deposuna sahip olmamasından dolayı, *in vivo* ekimlerde çoğu kaybolmaktadır. Bu yüzden *in vitro* koşullarda çimlenme çok daha başarılı olmaktadır. Çimlenme ve fidenin sonraki gelişme aşamalarında fungus ile birlikte sürdürülen simbiyotik yaşamın olumlu etkileri görülmektedir. Fakat besin ortamı kullanılmasıyla birlikte fungusa ihtiyaç duyulmamaktadır, buna da asimbiyotik yaşam denmektedir. *In vitro* koşullarda çimlenme ve büyüme daha hızlı gerçekleşmektedir,

çünkü koşullar kontrollüdür, ayrıca tohum bakterilerle ve funguslarla rekabet halinde olmamaktadır. Chang ve ark. (2005), genel olarak, laboratuvar koşullarında ve uygun besi ortamlarında epifit orkide tohumlarının kısmen kolay, ılıman bölgelerden elde edilen karasal orkide tohumlarının ise oldukça güç çimlendiğine dikkat çekmiştir.

Ülkemizde yok olma tehlikesi ile karşı karşıya bulunan orkideler üzerinde, laboratuvar koşullarında in vitroda, simbiyotik (mikorizal fungus ile) ve asimbiyotik (mikorizal fungus olmaksızın) kültür ortamlarında çimlenme ve fide durumuna getirerek araziye aktarma konusunda yapılan çalışmalar halen sürdürülmektedir. Bu çalışmada, kontrolsüz söküm nedeniyle kaybolma tehdidi altında bulunan ve bir salep orkidesi olan *Orchis sancta* L. türünün tohumlarının çimlendirilerek çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu amaçla nesilleri her geçen gün daha da çok tehlike altına giren salep orkidesi kontrollü koşullarda in vitro ortamlarda asimbiyotik olarak çimlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Arditti (1967), orkide köklerinde bazı fungusları tespit etse de, orkide tohumlarının simbiyotik olarak çimlendirilmesinin yanısıra, *Cattleya*, *Epidendrum* ve *Laelia* cinsleri içinde yer alan türlerin tohumlarının çimlenebilmeleri için herhangi bir fungusa gerek duymadığını; şeker ve mineral madde içeren agar ortamının da yeterli olabileceğini ve böylece asimbiyotik kültür yöntemlerini geliştirildiğini bildirmiştir. Araştırmacı, tohumların çimlenmesi için belirli ışık şiddeti ve fotoperiyoda ihtiyaç duyan orkide türlerinin yanı sıra bazı orkide türlerinin karanlıkta daha iyi çimlendiğini, bazı türlerin hem ışıktaki hem de karanlıkta çimlendiğini bildirirken; orkide tohumlarının çimlenme ve gelişmesinde en uygun pH'ın orkide türlerine göre farklılık gösterdiğini görmüş ve değişik türlerdeki en uygun pH değerinin 3.6-7.6 arasında değiştiğini belirtmiştir.

Hadley ve Harvais'e (1968) göre kullanılan büyüme düzenleyicilerin karışımı, simbiyotik fungus ya da patates ekstraktı ve hindistan cevizi sütü gibi maddelerin varlığı söz konusuysa yararlı bir etki sağlamaktadır. Araştırmacıların *Orchis purplella*'nın asimbiyotik kültür ortamında çimlendirilmesini amaçlayan çalışmasında, ortama katılan hormonların etkileri araştırılmış; gibberellic asitin protokorm ömrünü arttırdığı fakat sayısını ve büyüklüğünü etkilemediği; IAA'nın çimlenmeyi engellediği ve protokormları uzattığı; kinetinin hem yalnız hem de IAA ile birlikte kullanıldığında büyüme ve gelişme üzerinde kesin bir etki yaptığı; adeninin çok az bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Harvais'e (1973) göre asimbiyotik kültür ortamı olarak kullanılan ortam, doğada epifit orkideleri (başka bir bitki üzerine sarılmış olarak havai yetişen) besleyen ağaçların gövde süzüntülerinin bileşiminden çok daha yoğun olmakta ve genel olarak epifit orkideler konsantre; karasal orkideler ise seyreltik ortamlarda daha iyi çimlenmektedir. Ancak asimbiyotik ortamda çimlenmenin gerçekleşebilmesi için ortama bazı organik maddelerin eklenmesi gerektiği ve bazı orkide türlerinin tohumlarının çimlenmesi için ise sukroz, glukoz ve başka şekerlerin de çok yararlı olabileceği bildirilmektedir. Araştırmacı aynı zamanda in vitro çimlendirme çalışmalarında, çoğu araştırmacı tarafından farklı orkide tohumları için karbon kaynağı olarak kabul edilen dekstroz ve sakkarozun kullanıldığını bildirmiştir. Yetiştirme ortamına eklenen şekerin belirli oranlarda artırılmasıyla büyümenin de arttığı, artan şeker konsantrasyonu ile ise çimlenme ve büyümenin engellendiği belirtilmiştir.

Arditti ve Harrison (1977), kullanılan kimyasal maddelerden olumlu sonuç alınamadığı bazı durumlarda besin ortamına pepton, hindistan cevizi sütü, muz ve patates ekstraktı gibi bazı doğal bileşiklerin eklendiğini ve çimlenme üzerinde olumlu etki yaptıklarını belirtmiştir. Araştırmacılar, karasal orkide tohumlarının çimlenmesi üzerinde en olumlu etkiye sahip hormonların sitokininler olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen, bitki hormonlarının çimlenme üzerindeki etkilerinin oldukça farklı olabileceğini belirlemiş olup, aynı bitki hormonunun bir orkide türünde olumlu etki yaparken, diğerlerinde olumsuz etkiye neden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların çalışmasında vitaminlerin orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi; kültür ortamına ilave edilen pyridoksine ve thiamin gibi vitaminlerin özellikle sürgün gelişimini ve yaprak büyümesini olumlu yönde etkilemesi şeklinde bildirilmiş, fakat vitaminlerin bazı tohumların çimlenmesi üzerine olumsuz etki yapabileceği de belirtilmiştir.

Arditti'ye (1979) göre orkide fide kültürlerine ilave edilen potasyum ve manganez büyüme ve gelişmeyi arttırmakta, ancak yüksek konsantrasyonlarının kullanımı ile olumsuz sonuçlara neden olunabilmektedir. Araştırmacı sodyumun orkide çimlenmesi üzerinde önemli bir etki yapmadığı kanısına varmıştır. Orkide tohumlarının çimlendirilmesinde, en etkilisinin NH_4NO_3 olmak suretiyle inorganik azotun gerekli olduğu görüşü savunulmuştur.

Warren'e göre (1981) orkide tohumlarının çimlendirilmesi sırasında kullanılan yüzey sterilizasyon solüsyonları değişiklik göstermektedir. Kullanılan sterilizasyon solüsyonları arasında kalsiyum hipoklorit de bulunmaktadır.

Harvais'e (1982) göre amino asitler kültür ortamına azot kaynağı ve katkı maddesi olarak ilave edildiğinde, bunlar farklı orkide türlerinde değişik etkiler gösterebilmiştir.

Oliva ve Arditti (1984), Kuzey ılıman kuşakta bulunan karasal orkidelerin çimlendirilmesinde özel olarak hazırlanmış bazı ortamların kullanılmasının gerektiği ve bu ortamlarda yapılan çimlenme çalışmalarından değişik sonuçlar alındığı; özellikle *Cypripedium* ve *Spiranthes* gibi bazı orkide türlerine ait tohumların asimbiyotik ortamda daha iyi çimlenebildiği düşüncesini savunmaktadır.

Snow (1985), orkide tohumlarının in vitro çalışmalarında tabii tutulduğu yüzey sterilizasyonu çalışmalarında tohumların 24 saat süreyle şekerli suda bekletildikten sonra 30 dakikalık süre ile % 3'lük hidrojen peroksitin (H_2O_2) kullanıldığını bildirmiştir.

Clements ve ark. (1986), tohumların yüzey sterilizasyonunda kullanılan sodyum hipoklorit konsantrasyonunun ve uygulama süresinin orkide tohumlarının çimlenmesi üzerinde farklı etkiler yapabileceğinden dolayı, çimlenme için en etkili konsantrasyon ve uygulama süresinin belirlenmesi gerektiğini bildirmiştir.

Van Waes ve Debergh (1986), *Epipactis helleborine* (L.) Crantz. tohumlarının sadece inorganik azot içermeyen ortamda çimlenebileceğini, bu çimlenen tohumların daha ileriki aşamalara gelmesi için inorganik azotun gerekli olduğunu belirlemiştir. Kültür ortamına ilave edilen bazı amino asitlerin, embriyonun büyümesi için gerekli olan azotu sağladığı açıklanmış ve bunların NH_4NO_3 'ün yerini alabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte orkide tohumlarının çimlenmesinin ilk safhalarında inorganik azotun gerekli olmadığı hatta yüksek azot konsantrasyonunun çimlenmeyi engellediği belirtilmiştir.

Araştırmacılar in vitro koşullarda çimlenme denemelerinin yapıldığı 23 adet Batı Avrupa orkidesinde sterilizasyonun öneminden bahsetmiş ve sert kabuklu türlerin tohum kabuğunun aşındırılıp çimlenmenin sağlanmasında sterilizasyon çözeltisinin doz ve uygulanma süresinin etkili olduğunu söylemişlerdir. Tohum ekiminde kullanılacak sterilizasyon yöntemleri arasında, bazı Avrupa orkide türlerinin asimbiyotik çimlenmesinde değişik sürelerde % 5'lik kalsiyum hipoklorit solüsyonunun yeterli geleceğini ifade etmişlerdir. Sıcaklık faktörü ile ilgili olarak ise; orkide tohumlarının çimlenmesi için gerekli en uygun sıcaklığın 20-25°C olduğu, bununla birlikte 6°C ve 40°C'de bile çimlenen bazı orkide türlerinin bulunduğu bildirilmekte ve araştırmalarda çimlenme için kullanılacak sıcaklığın 23°C olarak kabul edildiği belirtilmektedir. Araştırmacılara göre en iyi çimlenme ve gelişme 4.8-5.2 pH aralığında meydana gelmektedir. Asimbiyotik çimlenmede kullanılan kimyasal maddelerden olumlu sonuç alınmadığı fakat gıda ortamlarına hindistan cevizi sütü, pepton, muz, patates ekstraktı ve kazeinhidrolizat gibi bazı doğal bileşiklerin eklenmesi, orkide tohumlarının çimlenmesi üzerinde olumlu etki yaptığı tespit edilmiştir. Çimlenme esnasında bazı şekerlerin yüksek konsantrasyonunun çimlenmeyi engellediği belirlenmiş, sakkarozun diğer şekerlere oranla çimlenme ve gelişme için daha etkili olduğu, fakat galaktoz ve mannitolün çimlenmeyi olumsuz şekilde etkiledikleri bildirilmiştir. Orkide tohumlarının asimbiyotik olarak çimlenebilmesi için hazırlanan ortamlar arasında en uygun olanının Van Waes-Debergh kültür ortamının olduğu bildirilmiştir. Çimlenme ve gelişme için kullanılan şekerler arasında en etkili olan şekerin sakkaroz olduğu, galaktoz ve

mannitolün ise olumsuz etkide bulunduğu; ayrıca bazı yüksek konsantrasyonlu şekerlerin ise çimlenmeyi engelleyici olarak görüldüğü belirtilmektedir.

Süberoğlu (1987), bazı salep orkidelerinde yaptığı çalışmada tohumları farklı sürelerde sodyum hipokloritli solüsyonlarda tutma uygulamasının gelişim üzerinde farklı etkiler yarattığı yönünde bulguya rastlamamıştır. Tohumlar kültüre alınmalarından 3 ay sonra, Bürobet ve Knudson C ortamına 2 mg/l IAA katılmasıyla elde edilen Knudson 6 ortamına aktarılmış olup; çok düşük beyaz renkte protokorm oluşumunun başladığı görülmüştür. Bu tarihten 15 gün sonra da yeşil sürgün gelişimi gözlenmiştir.

Ernst ve Arditti'ye (1990) göre in vitro çalışmalarda elde edilen fideler için glukoz, mannoz, maltotrioz, maltopentoz kullanılabilir.

Özkoç'a (1991) göre simbiyotik kültür yönteminde fungusların kullanılmasının yanısıra oldukça kompleks kültürler olan asimbiyotik kültür ortamları da kullanılmakta; buna rağmen her çeşit orkide tohumu bu kültür ortamlarında çimlenememektedir. Bu bağlamda karasal orkideleri çimlendirmenin kısmen başarılı olduğu ve bir çimlendirme yönteminin bir tür için olumlu etki gösterirken başka bir türün tohumlarını çimlendirmede aynı etkiyi gösteremediği; hatta bir bölgeden toplanan orkide türü tohumlarının çimlendirilmesine ilişkin metotların aynı türün farklı bölgelerden toplanan tohumlarında uygulanamadığı belirtilmiştir.

Özkoç ve Dalcı'ya (1991) göre orkide tohumlarının yüzeysel sterilizasyonunda tohumların küme oluşturmasını önleyen bir kimyasal yapıya sahip olmasından dolayı sodyum hipoklorit daha çok tercih edilmektedir.

Endosperme sahip olmayan ve çok küçük tohumları olan orkidelerin çimlenme zorluğuna karşılık, doğada çimlenebilmeleri için funguslarla simbiyotik yaşam içinde oldukları (Ingold ve Hudson, 1993); ancak in vitro üretim yöntemlerinin kullanılmasıyla mikorizal funguslara gerek kalmadan da çoğalabilecekleri belirtilmiştir (Ruglup ve ark., 1989). Ancak orkide bitkilerinde oluşan protokormdaki büyümenin, çimlenmeyi sağlayacak yedek besini taşınamamasından dolayı çok yavaş gerçekleştiği bildirilmiştir (Güler, 1997).

Harvais ve Hadley (1967), *Orchis purpurella* bitkisine ait tohumların asimbiyotik ve inokule kültürlerdeki gelişimini incelerken, asimbiyotik koşullarda, ortam olarak deiyonize su, agar, tanımlı ve tanımsız ortamlar kullanmıştır. Çimlenme, sterilizasyon süresinin uzatılması ve yüksek sıcaklık uygulaması ile artarken; ışık ile engellenmiştir.

Mead ve Bulard (1975), *Orchis laxiflora* ve *Ophrys sphegodes* bitkilerinin asimbiyotik olarak çimlenmeleri üzerine yaptıkları çalışmada vitamin ve azot kaynaklarının etkilerini incelemiştir. İki tür arasında küçük farklılıklar meydana gelmiş olmasına rağmen, amonyum nitrat içeren temel bir mineral ortama sakkaroz, organik azot ve vitaminlerin eklenmesiyle her iki türde de iyi gelişimler tespit edilmiştir. Çalışmalarında yüksek oranda çimlenme ve bitkicik gelişimi elde etmiş olmalarının yanında bitkide kararma ve ölümlere de rastlamışlardır. Her iki türün de en iyi gelişimleri karanlıkta gerçekleşmiş ve tohum ekiminden sekiz ay kadar sonra bazı beyaz protokormlar kararıp bitki ölümü ile sonlanmıştır.

Barroso ve ark.'na (1990) göre *Ophrys lutea* Cav. ve *Ophrys fusca* Link bitkilerinin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış tohumlarının modifiye Curtis ortamında çimlendirildiği çalışmada, tohum ekiminden 2 ay sonra protokormlar elde edilmiş olup, daha sonra bu protokormlar bir orkide kültür ortamına transfer edildiğinde 2 ay içinde bitkicikler oluşmuştur.

Rasmussen ve ark. (1990), sıcaklığın asimbiyotik ve simbiyotik şartlarda *Dactylorhiza majalis* tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkilerini araştırmış ve çalışma sonunda simbiyotik çimlenme oranının asimbiyotik ortamdaki çimlenmeye göre daha fazla olduğunu, asimbiyotik şartlarda 23 °C'de çimlenme oranının maksimum % 21 olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Serapias vomeracea subsp. *laxiflora* tohumlarında en iyi çimlenme oranı MS, Knudson ve VWD ortamlarının modifikasyonları arasında inorganik azot içermeyenlerden alınmıştır. Bu ortamlarda çimlenme iyiyken, protokormlarda epidermal tüy gelişmemiştir. En iyi sonuç MS-N ortamında % 53,8 çimlenme olarak tespit edilmiştir. *Orchis laxiflora* ile yapılan çalışmada ise % 30'luk sodyum hipokloritte 15 dakikalık sterilizasyon yapılmış ve VWD-N ortamında % 13,4 çimlenme elde edilmiştir. Sonuçta fungal izolatlarla yulaf ortamında yapılan çalışmada % 11,7, modifiye yulaf ortamında % 7,5, seyreltik kültür ortamında % 9,1 ve en iyi sonuç konsantre kültür ortamı olan KC-N ortamından % 25.1 çimlenme elde edilmiştir (Özkoç, 1991).

Pedroso ve Pais (1992), *Orchis papilionaceae* türünden olgunlaşmış ve olgunlaşmamış tohumları süspansiyon kültürüne almıştır. Olgun tohumların çimlenmesi ve protokorm oluşumu katı ve likit ortamlarda düşük olurken, olgunlaşmamış tohumların çimlenme oranı süspansiyon kültüründe artış göstermiştir. Çalışmanın sonucunda tüm kültür koşullarında testanın çimlenmeyi değiştirdiği; testadan ayrılmış

embriyoların % 100'e varan çimlenme gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada çimlenmeler aynı dönemlerde gerçekleşmemiş olup, belirli bir homojenlik sağlanamamıştır.

Aytaş'a (1994) göre, orkide tohumlarını % 0,5'lik sodyum hipokloritte 5 dakikadan fazla tutmak mikroorganizmalardan arınmaya yeterli gelmiş, 10 dakikada % 6,48'e çıkmış, 60 dakikada maksimum % 8 çimlenme olmuştur. % 1 NaOCl'de en çok 10 dakikada % 9 çimlenme, % 1,5'ta ise 15 dakikada en çok % 10,7 çimlenme gerçekleşmiştir. VWD-N ve VWD-N+Ca ortamlarda en iyi çimlenme sırasıyla % 24,7 ve % 20,8 olup, tohumların % 1,5'luk sodyum hipokloritte 15 dakika tutulması ile elde edilmesine karşın temel VWD ortamında % 10,7 olarak bulunmuştur. Denemelerde kullanılan 3 farklı kültür ortamı arasında en iyi çimlenme inorganik azot içermeyen VWD-N kültür ortamından elde edilmiştir. Fungal izolatlarla yapılan çimlendirmeden hiçbir şekilde başarı elde edilememiş, sadece tohum kabukları çatlamış ancak çimlenme olmamıştır.

Özdener (1994), farklı sodyum hipoklorit konsantrasyonlarının *Dactylorhiza iberica* tohumlarının çimlenmesine etkilerini araştırdığı çalışmasında en yüksek çimlenmeyi (% 17,7) % 20 NaOCl'in 20 dakika süre ile uygulanmasıyla elde etmiştir. *Dactylorhiza urvilliana* tohumlarında ise en yüksek çimlenme (% 70,4) yine % 20'lik sodyum hipoklorit konsantrasyonunun 10 dakika uygulanmasıyla elde edilmiştir. Çimlenmede kullanılan asimbiyotik kültür ortamı olarak VWD temel kültürü ortamı ve bu ortama makro element, mikro element, aminoasit, vitamin, şeker, kompleks katkı maddesi (patates ekstraktı) ve inorganik azotun eklenmesi ya da çıkarılmasıyla oluşturulan değiştirilmiş VWD kültür ortamları kullanılmıştır. Asimbiyotik çimlenmede seyreltik ve konsantre ortamlar kullanılırken, seyreltik kültür ortamına eklenen şekerin çimlenmeyi olumsuz etkilediği belirtilmiştir. Fide gelişimi için konsantre VWD kültür ortamı ve bu ortamın modifiye edilmesiyle hazırlanan ortamda şekerin ve inorganik azotun gerekli olduğu bildirilmiştir.

Lauzer ve ark. (1994), *Cypripedium acaule* orkidesinin olgunlaşmış tohumlarını kullanarak in vitroda asimbiyotik koşullarda çimlenmeyi hedeflemiştir. Bu çalışmada tohum canlılığını belirlemek için TTC (trifenil tetrazolium cloridin) ile boyama metodunu kullanmış ve tohumların canlılık oranlarında homojenlik bulamamıştır. Tohumların canlı olmasına rağmen çimlenmenin düşük çıktığı çalışmada çimlenmeyi teşvik etmek için GA₃ uygulaması, soğuk uygulaması ve tohumların suda bekletilmesi gibi muameleler yapılsa da çimlenme için yine yetersiz kalmış; en iyi uygulamanın NaOCl ve ultrason uygulamalarının olduğu belirlenmiştir.

Çağlayan ve ark. (1998), Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetişen bazı salep orkidelerinin embriyolarını in vitro koşullarda 14 farklı ortamda kültüre aldıklarını ve en yüksek çimlenme ve bitki oluşumunun *Orchis coriophora*'ya ait olduğunu ve sırası ile % 2,22 ve % 1,11 olarak bulunduğunu; kullanılan ortamlar açısından en yüksek çimlenme ve protokormdan oluşan bitkicik sayısının yine sırası ile 58 günde % 2,29 ve 156 günde % 1,86 ile VWD+domates ekstraktı+aktif karbon ortamından elde edildiğini belirtmişlerdir. VWD ortamının yanında Knudson ortamı ve bu ortamlara ilaveten % 10 oranlarında patates, domates ve salep yumrularından elde edilen ekstraktların, ayrıca kontroller hariç her ortamda 1 g/l oranında aktif kömürün kullanıldığı bildirilmiştir.

Miyoshi ve Mii (1998), *Cypripedium macranthos* türüyle yaptığı in vitroda çimlendirme çalışmasında tohumların % 70'ine % 0,5'lik NaOCl ile 60 dakika % 3,2'lik Ca(ClO)₂ ile 7 saat muamele etmiştir. Çimlenmeden 3 ay sonra farklı sıcaklık ve sitokinin uygulamaları yapılarak, soğuklama ve hormonun gelişmeye etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda hipokloritte bekletilen tohumlara, sitokinin uygulandığı ve 40 °C sıcaklıkta bekletildiği denemelerden başarı elde edilmiştir.

Önal (1999), Ege Bölgesi'nden toplanan 9 orkide türünün 3 tanesinden olumlu sonuç aldığı embriyo kültüründe; VWD ve Knudson ortamları ve bu ortamlara % 10-20 patates ekstraktı, % 10-20 muz ekstraktı, % 10 hindistan cevizi sütü, 0,2 mg/l GA₃, 1 mg/l BAP ilaveli 14 farklı ortam kullanıldığını; tohumun yüzey sterilizasyonunun ise 15-20 dakikada % 0,6'lık NaOCl'de yapıldığını bildirmiştir. Araştırmacıya göre *Orchis sancta* tüm ortamlarda en erken olarak bir ayda çimlenmiş olup, Knudson+% 10 patates ekstraktından % 100 başarı elde edilmiştir. Hormon uygulamalarının hemen hemen tüm türlerde ve ortam tiplerinde tatmin edici sonuç vermediği bildirilirken; en yüksek % 80 oranında protokormdan bitki oluşturan türün *Orchis laxiflora* türü olduğu ve bu sonucun yine Knudson+%10 patates ekstraktından elde edildiği belirtilmiştir.

Gezgin'e (2004) göre orkide tohumlarının çok küçük olması yüzünden dış koşullarda çimlenme ve toprakta filizlenmeyi bekleme sonuç vermeyebilir.

Sazak'a (2004) göre asimbiyotik ve simbiyotik koşullarda çimlenmeleri ve gelişmelerinin incelendiği *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* ve *Spiranthes spiralis* türlerine ait tohumlarda yüzey sterilizasyon için kullanılan çözeltilerin konsantrasyonu ve uygulanma zamanı türlere göre farklılık göstermiştir. Asimbiyotik şartlarda elde edilen çimlenmelerde inorganik azot, *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* türünde azaltıcı olarak belirlenirken, *Spiranthes spiralis* türünde arttırıcı etkiye sahip olmuştur.

Andronova ve Ivasko (2007), *Dactylorhiza maculata* türüne ait popülasyondan alınan 12 adet bitkiden tohum toplayarak çimlenme çalışmıştır. 12 adet genotipe ait tohumların çimlenmeleri ve bitki gelişimleri aynı seviyede ilerlememiş, dolayısıyla homojenlik görülmemiştir.

Wotavová-Novotná ve ark.'na (2007) göre in vitro koşullarda çimlendirilen *Dactylorhiza* türlerinin sürgün ve kök büyümesi, şeker ve büyüme düzenleyiciler tarafından önemli derecede etkilenmektedir. Çimlenmenin, glukoz ve sakkarozun 10 g/dm⁻³ konsantrasyonu ile uyarıldığı, sürgün büyüklüğü ve uzunluğunun N⁶-(2-isopentenyl) adenine ve N⁶-benzyladenin ile IBA'nın kombinasyonu ile arttığı bildirilmiştir.

Gümüş ve ark. (2008), Batı Karadeniz Bölgesi'nden toplanan ve salep elde edilen 6 tür orkidinin toplanıp, tohumlarının % 10'luk NaOCl+1-2 damla Tween-20+10 dakika sterilize edilmesi sonrasında MS, ½ MS, VWD ve Knudson C ortamlarında kültüre alındıklarını bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda en yüksek çimlenme oranının % 17,43 ile *Dactylorhiza neschalkiorum* bitkisinden; besin ortamları ele alındığında en yüksek çimlenmenin % 7,34 ile VWD ortamından; türlere göre besin ortamının etkisi incelendiğinde en yüksek çimlenmenin *D. neschalkiorum* türünden % 24,41 ile VWD ortamından elde edildiği görülmektedir. Protokorm oluşumunun ise sadece 3 türde meydana geldiği ve en yüksek oluşumun % 13,11 ile *D. neschalkiorum*'dan elde edildiği belirtilmiştir.

Valletta ve ark. (2008), in vitro koşullarda yaptıkları çalışmada *Orchis mascula* türünden elde edilen tohumlarda, farklı besin ortamları ve sterilizasyon yöntemleri kullanarak, tohum kabuğu geçirgenliğinin ve çimlendirme yeteneğinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Kullanılan 6 farklı besin ortamı arasından en çok çimlenmenin sağlandığı ortam olarak Orchimax (Duchefa) ticari ortam bileşimi dikkat çekmektedir. Tohum kabuğunun kırılması için değişik uygulamaların yapıldığı çalışmada H₂SO₄ (sülfirik asit) kimyasalının farklı doz ve sürelerde uygulanması ile tohumun su alıp şişmesinin yanında 2 ay süreyle 4-8 °C muamele edilmesi çimlenmeyi olumlu yönde etkileyen faktörler olmuştur. Devamlı karanlık koşullarda bırakılma çimlenmeyi engellemiş olup, 16/8 saat aydınlık/karanlık uygulaması sonucunda tohumlarda 1 ay içinde şişme, 3 ayda rhizoid (köksü yapı) oluşumu, 4-5 ayda sürgün ucu belirme ve 5-6 ayda ilk yaprak oluşumu görülmüştür.

Yararbaş (2008), salep orkideleri tohumunun in vitroda çimlenmesi için 1/10 MS ortamına % 20'lik şeker ilave edildiğini, bunun yanında zor çimlendikleri için ultrason

uygulamasını yaptığını; kullanılan tohumların % 1'lik sodyum hipokloritte 10 dakika sterilize edildiğini bildirmiştir. *Orchis italica*'da sodyum hipoklorit+ultrason uygulamasında 15 günde % 81, kontrol uygulamasında 90 günde % 89 çimlenme elde edilirken 2 ay sonunda ilk yaprakların oluşmaya başladığı belirtilmiştir. Başka bir deneme *Ophrys tenthredinifera*'da yapılmış ve ultrason+5 dakika şok uygulamasından 60 günde % 5,3 çimlenme elde edildiği belirtilmiştir.

Orkidelerin klorofilsiz türleri, tüm yaşantısı boyunca karbon ihtiyacını sağlamak için mantara bağımlılık gösterir. Klorofile sahip orkideler ise gelişen yaprakları ile ihtiyaç duyduğu karbondhidratı tedarik eder. Karbondhidratların kaynağı genelde toprak da bulunan organik madde ve saprofitlerin ayrıştıracağı organik bileşiklerdir (Ortaş, 2011). Araştırmacıya göre saf kültür çalışmalarında gereksinim duyulan şeker ve vitamin sağlandığında bitkiler çimlenmekte yavaş da olsa gelişmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada, Aydın ili civarında doğal olarak yetişen, ancak salep elde etmek için tahrip edilen ve bu sebepten dolayı özellikle toplanan *Orchis sancta* L. türüne ait olgunlaşmış tohumlar kullanılmıştır. Fotoğrafı (Url-2) ve bazı özellikleri aşağıda belirtilen bitki türüne ait tohumlar, İzmir/Menemen’de bulunan T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü’nden temin edilmiştir.

3.1.1. *Orchis sancta* L.

Orchis coriophora türüne benzemektedir. 6-12 arasındaki lineer yaprakları dip rozet içindedir. Çiçekler geniştir, sepal tepesi serbest, uzamış ve ileriye doğrudur. Labellum düz, 15 mm, pembeden uçuk kırmızıya kadar değişen renkte, beneksiz, tüysüz, orta lob ligulate, acuminate, yanal lobları eşkenar, 3-4-dişli; kıvrık spur apexe doğrudur. Çiçeklenme Nisan-Haziran ayları arasında olur. 450 metre yüksekliklerde, otsu ve güneşli yerlerde, kalkerli topraklarda yetişir (Davis, 1984).



Şekil 3.1. *Orchis sancta* L. bitkisinin genel görünümü (Url-2)

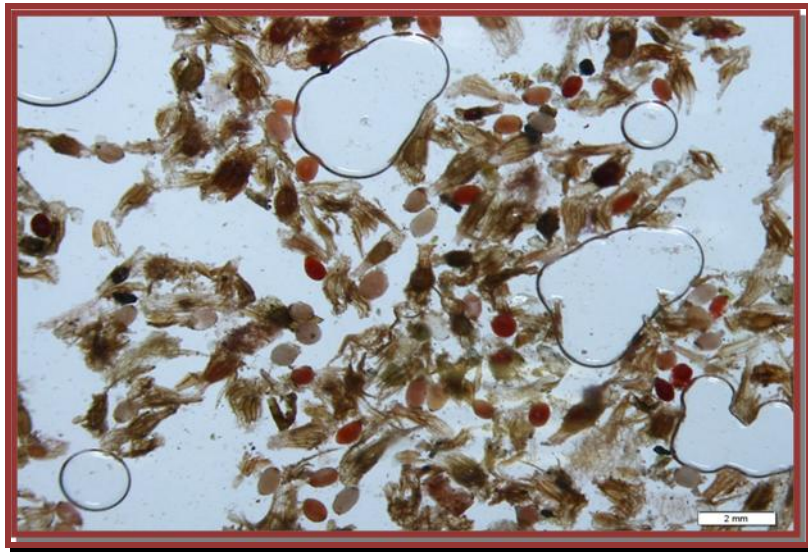
3.2 Yöntem

Olgunlaşmış tohumlar çalışma başlayana dek cam petri kutularının içinde buzdolabında +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

3.2.1. Tohumlara canlılık testinin yapılması

Tohumlar ekilmeden önce Tetrazolium Chlorid (TTC) canlılık testine tabi tutulmuştur (Şekil 3.2). Tetrazolium testi canlı tohumları, cansızlardan ayırmak için tohumlardaki solunum enzimlerine bağlı olarak çalışan biyokimyasal bir test olarak bilinmektedir. Dehidrogenaz enziminin aktivitesi sonucu, hidrojen iyonlarındaki artış renksiz kimyasal olan 2,3,5-Trifenil tetrazolium klorit (Sigma) bileşiğini kırmızı formazona dönüştürmektedir ve bu renk değişimi tohumun canlılığını belirlemektedir.

Çimlenme denemesine geçilmeden önce tohumların canlılık durumları belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm tohum örneklerinden rastgele seçilen 50 tohuma canlılık testi uygulanmıştır. Petri kaplarında distile su ile ıslatılan tohumlar 12 saat bekletilerek, embriyo kısımları % 1'lik tetrazolium klorit solüsyonuna bırakılmıştır. Oda sıcaklığında 12 saat bekletilen tohumlardan pembe-kırmızı renkte olanlar canlı, beyaz renkte olanlar cansız olarak değerlendirilmiştir (AOSA, 2002; Grabe ve Peters, 1998). Böylece çimlenme denemesine geçilmeden önce tüm tohumların canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır (Copeland ve McDonald, 2001). Testin sonuçlarına göre tohumların % 85 canlı olduğu ortaya çıkmıştır. Tohumların fotoğrafları, OLYMPUS SZ61 bin oküler mikroskop dp20 kamera, 10X x 1.2 yazılım program aracılığıyla görüntülenmiştir.



Şekil 3.2. *Orchis sancta* L. tohumlarına uygulanan canlılık testi (Orj.)

3.2.2. Genel sterilizasyon işlemleri

In vitro çalışmaları için kullanılan tüm ortam ve malzemeler aseptik koşullar altında hazırlanmıştır. Kullanılan tüm malzemeler otoklava girmeden önce, bulaşık deterjanı, sodyum hipoklorit ve saf su ile yıkanmıştır. Tohumların ekildiği petri kapları, pens, bistüri bıçağı ve kurutma kağıtları alüminyum folyo kağıtlarına sarılarak 121°C sıcaklıkta 1.2 atmosfer basınçta çalışan otoklavda 60 dakika süresince steril edilmiştir. Çalışma laminar akışlı steril kabinde gerçekleşmiş olup her çalışmadan önce ve sonra kabin içinde 30 dakika ultraviyole ışığı yakılmıştır. Çalışma esnasında her kullanılan pens ve bistüri bıçağı sterilizasyon maksadıyla alev ocağında birkaç dakika bekletilerek temizlenmiştir. Steril kabinin içi % 70'lik etil alkole batırılmış pamuk ile sıkça silinmiştir. Çalışma süresince enfeksiyon oluşmuş bulaşık petri kapları ve steril kabin içinde kullanılan pens, bistüri gibi diğer malzemeler her çalışmadan sonra başka işlerde kullanılmadan önce, 121°C sıcaklıkta 1,2 atmosfer basınçta çalışan otoklavda 120 dakika bırakıldıktan sonra deterjan, sodyum hipoklorit ve saf su ile yıkanarak steril edilmiştir.

3.2.3. Tohumların yüzey sterilizasyonunun yapılması

Orkide tohumları çok küçük ve toz gibi bir yapıya sahip oldukları için kaba filtre kâğıtlarından yapılmış küçük zarfların içine koyulduktan sonra zarfların kenarları toplu iğne ile iğnelenerek iplikle dikilmiştir. Tohumlar her petri kabı içine 100 adet ekilecek şekilde sayılmıştır. Steril edilen tohumlar, her tekrürde 5 adet olmak üzere 3 tekrürlü olarak toplam 15 adet kültür ortamı içeren cam petri kaplarına ekilmiştir.

Valletta ve ark.,'nın (2008) bildirdiğine göre, tohum kabuğunun H₂SO₄ (sülfirik asit) ile kırılması ve tohumun su almasının teşvik edilmesi mümkün olmaktadır. Orkide türleri tohumları önce % 2'lik H₂SO₄ ile 5 dakika çalkalandıktan sonra 1-2 damla Tween-20 ve % 10'luk NaOCl ile 12 dakika steril edilmiştir. Zarfların üzerinde kalıntı bırakmamak için son olarak 3 kez steril saf su ile birkaç dakika çalkalanarak durulanmıştır. Ekime başlamadan önce zarfların fazla suları steril bir kurutma kağıdı üzerinde alınarak ve iplikleri bistüri yardımıyla kesilmiştir. Steril edilen tohumlar içlerinde besi ortamı bulunan kültür kaplarına ekilmiştir.

3.2.4. Kültür ortamlarının hazırlanması

Besi ortamı olarak VWD (Van Waes ve Debergh, 1986) ortam kullanılmıştır (Tablo 3.1). VWD ortamları temel olarak kullanıldıklarında bileşiminde bulunan maddelerin miktarları aynı oranlarda kalırken; kullanılan karbonhidrat (şeker) tipi ve konsantrasyonu değiştirilerek yeni kültür ortamları hazırlanmıştır. Sukroz, glukoz, fruktoz, galaktoz ve maltoz formundaki karbonların 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 g/l konsantrasyonları kullanarak VWD kültür ortamları oluşturulmuştur (şekil 3.3). Tüm ortamlar için 0.85 gr/l agar kullanılıp; pH 1 N HCl ve 1 N NaOH ile 5,8'e ayarlandıktan sonra 121°C sıcaklıkta 1,2 atmosfer basınçta 20 dakika otoklav edilmiştir. Hazırlanan tüm besi ortamları cam petri kaplarına dökülmüştür (şekil 3.4). Tohum ekimi yapılan petri kapları 23±1 °C sıcaklıkta ve karanlıkta bekletilmiş olup, protokorm oluşmasıyla birlikte karanlıktan 16/8 saat aydınlık/karanlık ortama alınmıştır. Alt kültüre alma işlemi ayda bir tekrarlanmıştır.



şekil 3.3. Kültür ortamlarının hazırlanması (Orj.)



Şekil 3.4. Kültür ortamı içine tohum ekimi (Orj.)

Tablo 3.1. Van Waes ve Debergh kültür ortamında yer alan maddeler ve miktarları (Van Waes ve Debergh, 1986)

Makro Elementler	Miktar (mg/l)	Mikro Elementler	Miktar (mg/l)	Aminoasit	Miktar (mg/l)	Vitaminler	Miktar (mg/l)
NH_4NO_3	370	Na-EDTA	27,8	L.Glutamin	100	Nikotik asit	2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	60	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37,3			Pyridoksine HCl	0,5
KNO_3	400	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25			Thiamin HCl	0,5
KH_2PO_4	300	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10			Biotin	0,05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025			Myo-inositol	1000
		H_3BO_3	10				
		$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025				
1 litre saf su için							

3.2.5. İncelenen özellikler

Kültür ortamlarına ekilen orkide tohumlarının aşağıda belirtilen özellikleri incelenmiştir. Oluşan çimlenmeler mikroskop; protokorm ve sürgün görüntüleri, fotoğraf çekimi destekli mikroskop ve fotoğraf makinesi ile kayıt altına alınmıştır.

3.2.5.1. Tohumların çimlenme oranı (%)

Tohumların şişkinleşerek tohum kabuğunu çatlatma ve hücre büyümesinin gerçekleşmesi çimlenmedir. Çimlenme mikroskop altında takip edilerek ve miktarı oransal olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5).

3.2.5.2. Protokorm oluşum oranı (%)

Çimlenen tohumların şişkinleşerek çiviye benzer oluşturdukları ilk yapı protokormdur. Protokorm miktarı, çimlenen tohumlara oranlanarak yüzde oranlarının hesaplanmasıyla elde edilmiştir (şekil 3.6 ve 3.7).

3.2.5.3. Sürgün oluşum oranı (%)

Gelişen sürgünlerin protokorm sayısına oranlanmasıyla elde edilen değerdir (şekil 3.8).

3.2.5.4. Çimlenme süresi (gün)

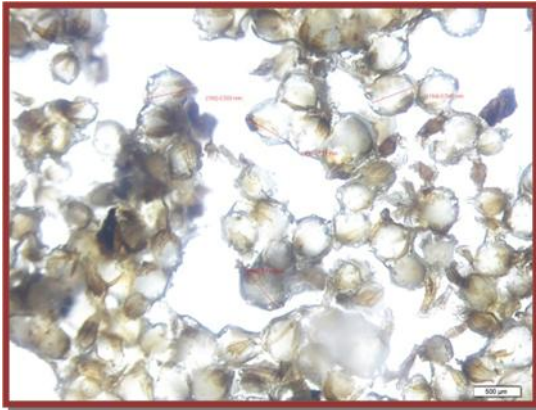
Tohum ekiminden itibaren çimlenmeye kadar geçen süreyi ifade etmektedir.

3.2.5.5. Protokorm oluşum süresi (gün)

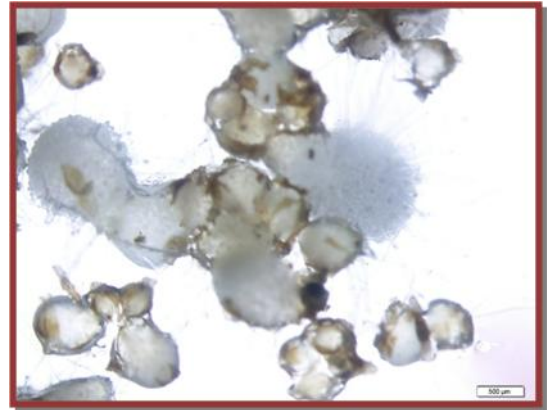
Tohum ekiminden itibaren protokorm oluşumuna kadar geçen süreyi ifade etmektedir.

3.2.5.6. Sürgün oluşum süresi (gün)

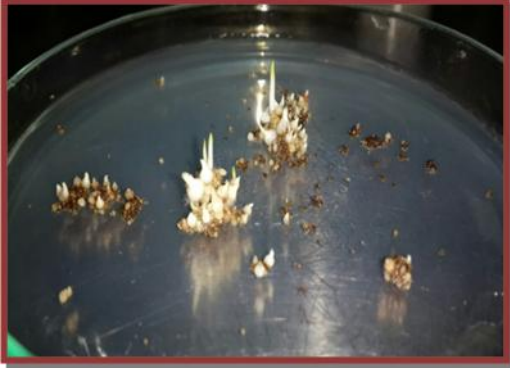
Tohum ekiminden itibaren sürgün oluşumuna kadar geçen süreyi ifade etmektedir.



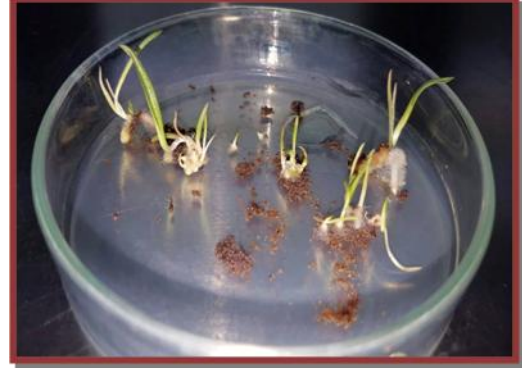
şekil 3.5. Çimlenen orkide tohumlarının mikroskop altında görüntüsü (Orj.)



şekil 3.6. Protokorm oluşumunun mikroskop altında görüntüsü (Orj.)



Şekil 3.7. Protokorm oluşumu (Orj.)



Şekil 3.8. Sürgün oluşumu (Orj.)

3.2.6. İstatistiki değerlendirmeler

Üzerinde durulan özellikler bakımından tanımlayıcı istatistiklerle; ortalama ve standart hata ifade edilmiştir. Bu özellikler bakımından, konsantrasyon ve ortam arasında fark olup olmadığını belirlemek amacıyla, “tesadüf parselleri deneme tertibinde faktöriyel düzende varyans analizi” yapılmıştır. Ölçümü yapılan yüzde değişkenlerine “varyans analizi öncesi açı transformasyonu” uygulanmıştır. Varyans analizini takiben farklı konsantrasyon ve ortam belirlemede; “Tukey çoklu karşılaştırma testi” kullanılmıştır. Hesaplamalarda istatistik önemlilik düzeyi $p < 0.01$ olarak alınmış ve hesaplamalar JMP 5.0.1a istatistik paket programında yapılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Orchis sancta L. türünün in vitroda çimlenme, protokorm ve sürgün oluşturma potansiyellerinin araştırıldığı çalışmada, kültür ortamının içine galaktoz, glukoz, maltoz, fruktoz ve sukroz olmak üzere beş farklı karbonhidrat (şeker) formunun 20, 40, 60, 80 ve 100 g/l konsantrasyonları (dozları) uygulanmış ve incelenen özellikler üzerinde istatistik olarak önemli düzeyde farklılıklar görülmüştür ($p<0.01$) (Tablo 4.1 ve 4.2)

Tablo 4.1. Karbonhidrat formlarının ve konsantrasyonlarının çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum oranlarına etkisi (%)

Karbonhidrat Formları	Karbonhidrat Konsantrasyonları (g/l)	Çimlenme Oranı ** (%)	Protokorm Oluşum Oranı ** (%)	Sürgün Oluşum Oranı** (%)
Galaktoz	0	67,53 bcdef	55,31 cdefgh	0,00 h
	20	60,85 fghij	59,79 bcde	0,00 h
	40	59,91 ghij	52,21 efghi	0,00 h
	60	65,93 defgh	45,90 ijk	0,00 h
	80	44,39 n	31,40 l	0,00 h
	100	44,36 n	31,79 l	0,00 h
Glukoz	0	67,53 bcdef	55,31 cdefgh	0,00 h
	20	61,62 fghi	68,44 a	9,02 c
	40	66,53 cdefg	59,86 bcde	8,77 cd
	60	52,86 klm	46,87 hijk	0,00 h
	80	47,92 lmn	60,34 abcde	2,80 g
	100	56,39 ijk	41,08 k	0,00 h
Maltoz	0	67,53 bcdef	55,31 cdefgh	0,00 h
	20	71,91 abcd	53,74 defghi	0,00 h
	40	77,85 a	64,40 ab	0,00 h
	60	68,87 bcde	49,74 ghij	0,00 h
	80	64,87 efgh	51,22 fghij	0,00 h
	100	59,73 hij	52,66 efghi	0,00 h
Fruktoz	0	67,53 bcdef	55,31 cdefgh	0,00 h
	20	72,94 abc	57,67 bcdefg	13,16 a
	40	61,18 fghij	55,63 cdefg	6,56 e
	60	47,04 mn	43,03 jk	0,00 h
	80	50,41 klmn	28,94 l	0,00 h
	100	47,91 lmn	25,33 l	0,00 h
Sukroz	0	67,53 bcdef	55,31 cdefgh	0,00 h
	20	68,93 bcde	61,58 abcd	8,01 d
	40	73,88 ab	63,11 abc	13,30 a
	60	63,28 efgh	58,72 bcdef	5,36 f
	80	54,62 jkl	50,52 fghij	3,50 g
	100	66,25 cdefgh	68,53 a	10,90 d

** Aynı sütunda, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir

Tablo 4.2. Karbonhidrat formlarının ve konsantrasyonlarının çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum sürelerine etkisi (gün)

Karbonhidrat Formları	Karbonhidrat Konsantrasyonları**(g/l)	Çimlenme Süresi** (gün)	Protokorm Oluşum Süresi** (gün)	Sürgün Oluşum Süresi** (gün)
Galaktoz	0	14,66 fghij	23,66 gh	0,00 tce
	20	15,50 defghi	22,50 h	0,00 tce
	40	18,16 bcd	34,66 cd	0,00 tce
	60	16,33 defg	25,83 efgh	0,00 tce
	80	21,33 a	51,33 a	0,00 tce
	100	14,83 fghij	24,50 gh	0,00 tce
Glukoz	0	14,66 fghij	23,66 gh	0,00 tce
	20	13,33 hij	22,83 h	89,33 c
	40	12,50 j	25,83 efgh	100,66 ab
	60	14,50 fghij	31,83 def	0,00 tce
	80	15,83 defgh	32,66 de	75,66 d
	100	13,00 hij	25,00 fgh	0,00 tce
Maltoz	0	14,66 fghij	23,66 gh	0,00 tce
	20	12,83 ij	25,00 fgh	0,00 tce
	40	12,50 j	25,66 fgh	0,00 tce
	60	15,33 defghij	30,50 defg	0,00 tce
	80	13,49 ghij	25,60 fgh	0,00 tce
	100	15,05 efghij	27,66 efgh	0,00 tce
Fruktoz	0	14,66 fghij	23,66 gh	0,00 tce
	20	13,16 hij	27,16 efgh	99,33 b
	40	17,88 bcde	40,72 bc	105,33 a
	60	20,83 b	50,83 a	0,00 tce
	80	19,50 abc	43,66 b	0,00 tce
	100	17,16 cdef	39,66 bc	0,00 tce
Sukroz	0	14,66 fghij	23,66 gh	0,00 tce
	20	12,50 j	25,00 fgh	60,66 e
	40	13,05 hij	24,33 gh	50,66 f
	60	13,88 ghij	28,38 defgh	101,16 ab
	80	15,33 defghij	28,00 defgh	57,99 e
	100	14,66 fghij	28,88 defgh	104,50 a

** Aynı sütunda, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir

4.1. Tohumların Çimlenme Oranı (%)

Orkide tohumlarının ekimin yapıldığı VWD kültür ortamına eklenen karbonhidrat tiplerinin çimlenmeye olan etkisi istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Kullanılan beş tip karbonhidrat arasından maltozun çimlenmeyi en çok teşvik eden karbonhidrat olduğu belirlenmiştir. Çimlenme, maltozun içinde olduğu ortamlarda % 68,46 oranında gerçekleşirken, en düşük çimlenme ortalama değerine sahip olan şekerin % 57,16 ile galaktoz olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.3).

Orkide tohumlarının in vitroda asimbiyotik olarak çimlendirilmesinde kültür ortamına bazı inorganik maddeler ile sukroz, glukoz ve başka şekerlerin faydalı olacağı; karbon kaynağı olarak dekstroz ve sukrozun da kullanılabileceği bildirilmiştir (Harvais,

1973). Çalışmamızda sukroz ve glukoz, maltozdan sonra çimlenmeye etki eden şekerler olmuştur.

Tablo 4.3. Karbonhidrat formlarının çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum oranlarına etkisi (%)

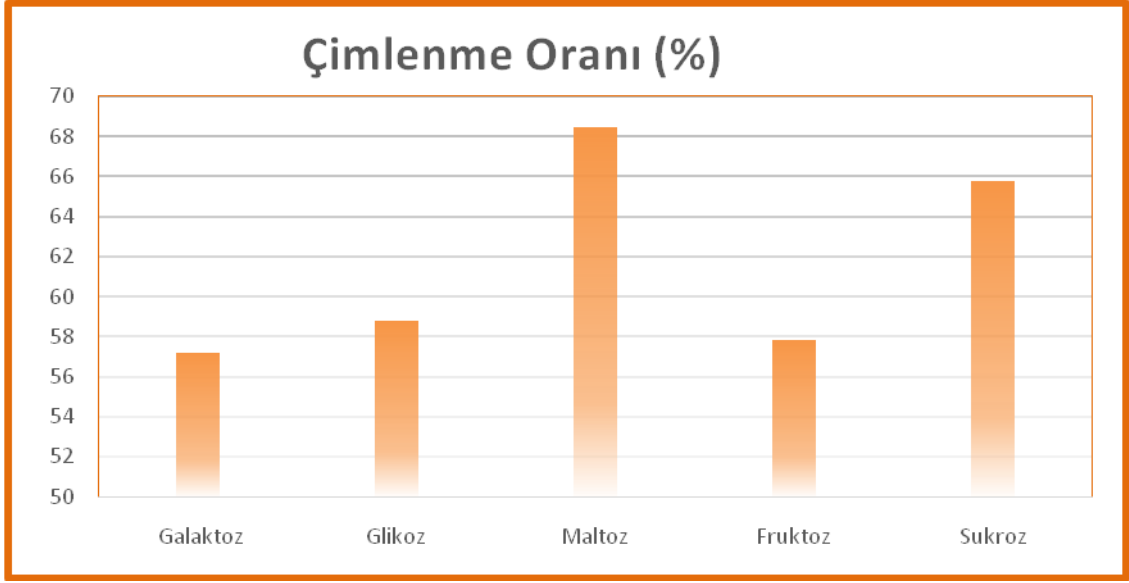
Karbonhidrat Formları	Çimlenme Oranı** (%)	Protokorm Oluşum Oranı** (%)	Sürgün Oluşum Oranı** (%)
Galaktoz	57,16 d	46,06 c	0,00 d
Glukoz	58,81 c	55,31 b	6,87 c
Maltoz	68,46 a	54,51 b	0,00 d
Fruktoz	57,83 cd	44,25 d	9,86 a
Sukroz	65,75 b	59,63 a	8,21 b

** Aynı sütunda, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir

Van Waes ve Debergh (1986), sukrozun diğer şekerlere oranla çimlenme üzerinde daha etkili olduğunu söylerken, galaktozun olumsuz etkisinden bahsetmiştir. Galaktoz, çalışmamızda % 57,16 çimlenme ile en düşük ortalama değere sahip olmuştur. Mead ve Bulard (1975), *Orchis* ve *Ophrys* cinslerine ait türlerde yaptıkları çalışmada yine sukrozun eklenmesiyle başarı elde etmişlerdir. *Dactylorhiza* türlerinde yapılan başka bir çalışmada çimlenmenin, glukoz ve sukroz ile uyarıldığı bildirilmiştir (Wotavová-Novotná ve ark., 2007). Önceki çalışmalar dikkate alındığında çimlenmeyi en çok glukoz ve sukrozun teşvik ettiği görülmektedir. Çalışmamızda bu iki şeker tipi maltozdan sonra en yüksek ikinci ve üçüncü ortalama değere sahip olmuştur (Şekil 4.1). Araştırmacıların kullandıkları kültür ortamı ve orkide türünün farklı olabileceği düşünülmektedir. Daha çok farklı türlerde yapılan çimlendirme çalışmalarında kullanılan kültür ortamları da çeşitlilik göstermektedir. *O. sancta* türünde yaptığımız bu çalışma, VWD ortamında maltozun etkisiyle en yüksek çimlenme yüzdesine sahip olmuştur. *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* tohumlarının yüzey sterilizasyonunun çimlenmeye olan etkisinin bakıldığı bir çalışmada en iyi sonuç % 50,3 olarak kaydedilmiştir (Özkoç,1991).

Kültür ortamları içinde kullanılan şeker konsantrasyonlarının çimlenme yüzdesine olan etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.4).

Orkide tohumlarının çimlenmesinde şekerlerin 0 (kontrol), 20 ve 40 g/l uygulamalarının en etkili olduğu bulunmuştur. En yüksek çimlenme ortalama değeri % 67,87 ile 40 g/l konsantrasyonundan elde edilmiştir. 100 g/l şeker uygulaması ise % 54,93 oranında çimlenme sağlarken en düşük ortalama değere sahip olmuştur.



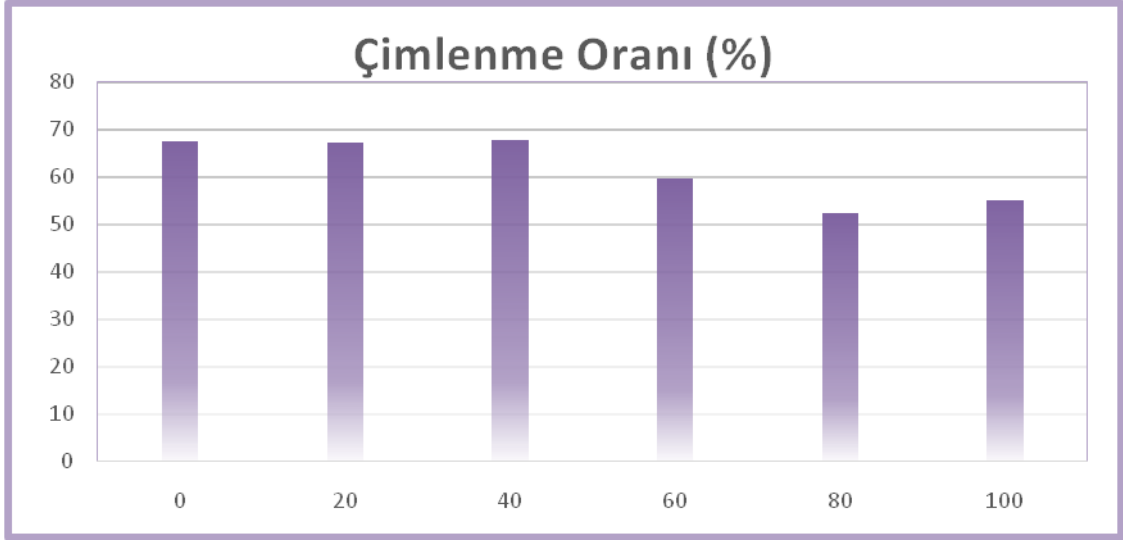
Şekil 4.1. Karbonhidrat formlarının tohumların çimlenme oranına etkisi (%)

Tablo 4.4. Karbonhidrat konsantrasyonlarının çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum oranlarına etkisi (%)

Karbonhidrat Konsantrasyonu (g/l)	Çimlenme Oranı** (%)	Protokorm Oluşum Oranı** (%)	Sürgün Oluşum Oranı** (%)
0	67,53 a	55,31 b	0,00 e
20	67,25 a	60,16 a	10,06 b
40	67,87 a	59,04 a	9,54 b
60	59,59 b	48,85 c	5,36 c
80	52,44 d	44,48 d	3,15 d
100	54,93 c	43,88 d	10,90 a

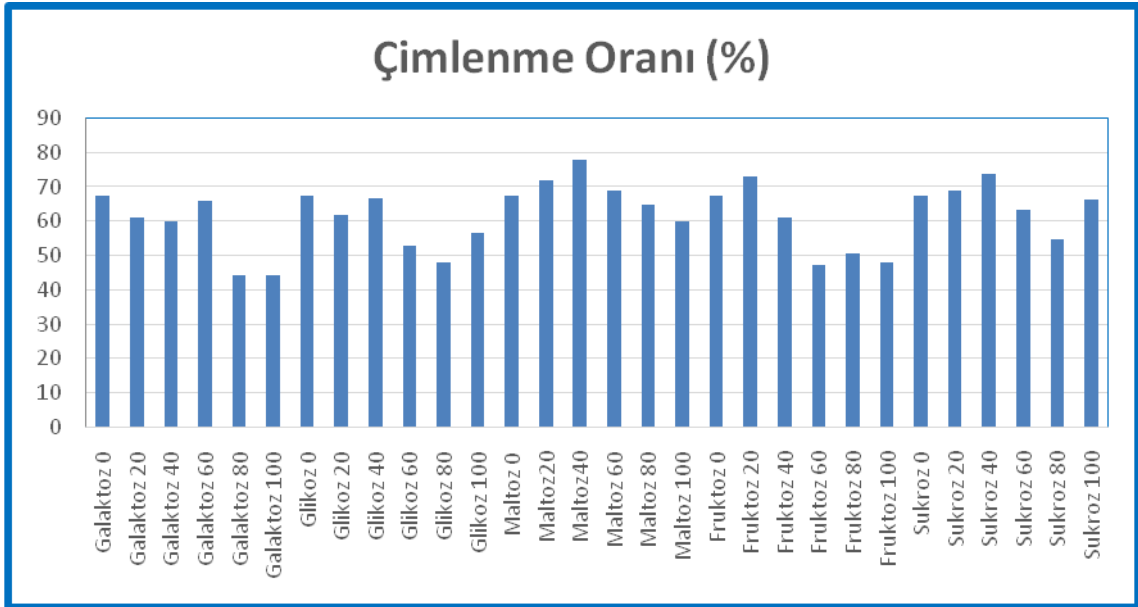
** Aynı sütunda, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir

Çalışmamızdan görüleceği gibi şekerlerin 60, 80 ve 100 g/l artan dozlarında, çimlenmeye olumsuz etki oluşmuştur. Pek çok araştırmacı artan şeker dozlarının çimlenmeyi azaltıcı ya da engelleyici özelliğinden bahsetmiştir (Harvais, 1973; Van Waes ve Debergh, 1986). In vitro koşullarda çimlendirilen *Dactylorhiza* türlerinin sürgün ve kök büyümesi, şeker ve büyüme düzenleyiciler tarafından önemli derecede etkilendiği; çimlenmenin, şekerlerin 10 g/dm⁻³ konsantrasyonu ile uyarıldığı bildirilmiştir (Wotavová-Novotná ve ark., 2007). Çalışmamızda en yüksek ortalama değerler 0-40 g/l arasındaki şeker uygulamalarından elde edilmiş olup istatistik olarak aynı grupta yer almışlardır. Çalışmamızdan elde edilen veriler, araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermiş olup, artan şeker dozlarının çimlenme oranını düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 4.2).



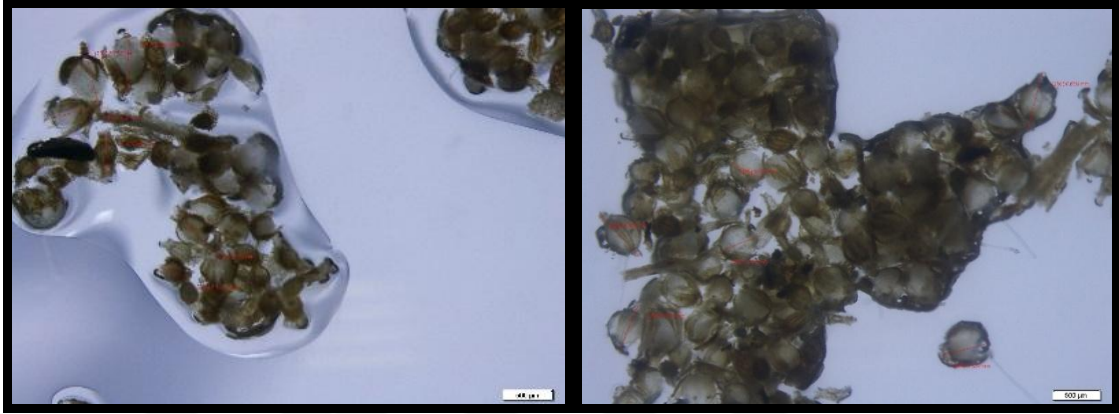
Şekil 4.2. Karbonhidrat konsantrasyonlarının tohumların çimlenme oranına etkisi (%)

Kullanılan ortam ve konsantrasyonların çimlenme üzerine etkisi incelendiğinde en yüksek çimlenme ortalamasının % 77,85 ile Maltoz40'tan elde edildiği görülmektedir (Tablo 4.1). En düşük çimlenme ortalama değerinin ise Galaktoz100 ortamından % 44,36 elde edildiği belirlenmiştir. Tüm şeker formlarına genel olarak bakıldığında kullanılan dozlar arttıkça çimlenme oranının düştüğü görülmektedir. Bu da kullanılan karbon konsantrasyonunun artmasıyla *O. sancta* tohumlarının çimlenmesine azaltıcı yönde etki oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının tohumların çimlenme oranına etkisi (%)

Çimlenme, uygulanan tüm ortam ve dozlarda gerçekleşmiştir (Şekil 4.4). Galaktoz uygulamasında % 44,36-67,53; glukoz uygulamasında % 47,92-66,53; maltoz uygulamasında % 59,73-77,85; fruktoz uygulamasında % 47,04-72,94 ve sukroz uygulamasında % 54,62-73,88 arasında çimlenme olmuştur ve ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur.



Şekil 4.4. Kültür ortamında çimlenen *O. sancta* tohumları

14 farklı besin ortamında ve 7 adet orkide türünde yapılan in vitro çalışmasında en yüksek çimlenme oranı % 2,32 olarak VWD+domates ekstraktı+aktif karbon ortamında elde edilmiştir (Gönülşen ve ark., 1996). In vitro koşullarda 14 farklı ortamda kültüre alınan orkide tohumlarında en yüksek çimlenme % 2,29 olarak gerçekleşmiştir (Çağlayan ve ark., 1998). Dokuz orkide türünün üç tanesinden olumlu sonuç alındığı bir çalışmada çimlenme oranı *O. sancta*'da % 100 olarak saptanmıştır (Önal, 1999). Orkide tohumlarının çimlenmesi için 1/10 MS ortamına % 20'lik şeker ilave edilen ve ultrason uygulanan bir diğer çalışmada; *Orchis italica* tohumlarından % 81 oranında çimlenme elde edilmiştir (Yararbaş, 2008). 6 orkide türü ile yapılan ve tam kuvvet MS, VWD ve KC ortamları ile ½ MS ortamının kullanıldığı çalışmada 30 g/l sukroz ilave edilmiştir. En yüksek çimlenme oranı % 7,34 olarak VWD ortamından elde edilmiştir (Gümüş ve ark., 2008). KC, VWD ve Pfeffer besi ortamlarına ekilen 4 orkide türünde en yüksek çimlenme % 38,41 oranında gerçekleşmiştir (Kısakürek, 2011). *O. sancta* tohumlarıyla yapılan çalışmada GA₃, BAP, hindistan cevizi sütü, muz ve patates ekstraktı katkılı KC ve VWD ortamları kullanılmış olup çimlenme oranı VWD ortamında % 20-40 oranında; KC ortamında ise % 20-100 olarak bulunmuştur (Sarı ve ark., 2011). Beş orkide türü arasında en çok çimlenme oranı *O. sancta* türünde % 30 olarak bulunmuştur (Bulunuz Palaz ve ark., 2012). Araştırmacıların yaptığı başka bir çalışmada *O. sancta* tohumları

EBP+AK ortamında % 79,08 oranında çimlenme göstermiştir (Bulunuz Palaz ve ark., 2014).

Önceki araştırmalardan görüldüğü gibi, farklı orkide türleri ve kültür ortamları ile çalışıldığında, çimlenme oranları % 2,29-81 arasında değişiklik göstermektedir. Çalıştığımız tür olan *O. sancta* tohumları önceki çalışmalarda % 20-100 arasında değişen oranlarda çimlenmiştir. Özellikle VWD ortamının farklı materyallerle katkılandırılmasıyla çimlenme oranları üzerinde olumlu etkiler ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen bulgular bu aralık içinde yer almaktadır.

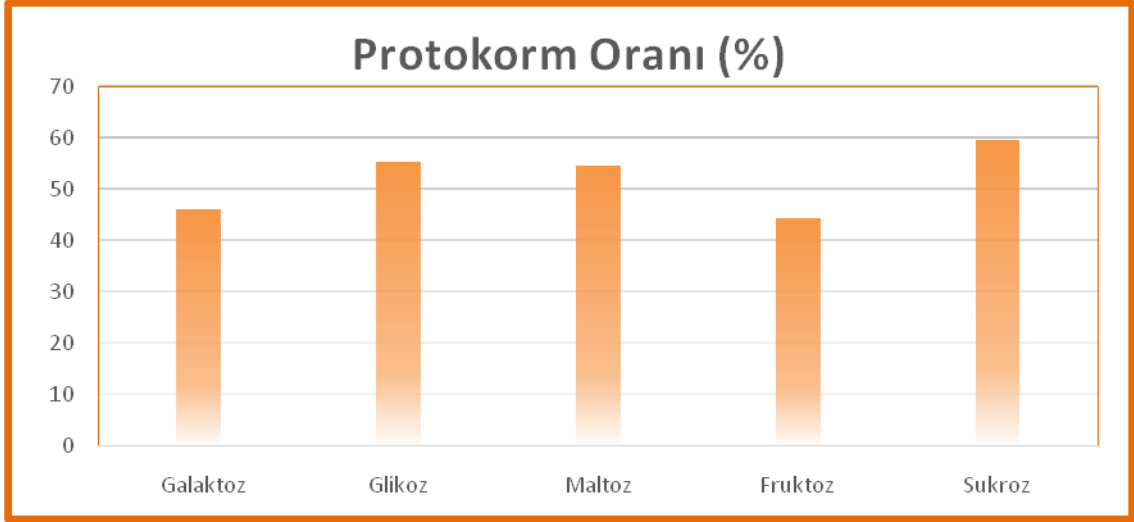
4.2. Protokorm Oranı (%)

Kültür ortamları içinde kullanılan şeker tiplerinin protokorm oluşumuna olan etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.3).

Kültür ortamına eklenen beş şeker tipi arasında protokorm oluşumuna ait en yüksek ortalama değer % 59,63 olarak sukrozdan; en düşük ortalama değer ise % 44,25 ile fruktozdan elde edilmiştir. Glukoz ve maltoz istatistik olarak aynı grup içinde yer alırken aralarında fark bulunmamıştır. Çimlenme konusunda bahsedildiği üzere çimlenme ve gelişmeyi en fazla sağlayan şekerlerin glukoz ve sukroz olduğu bildirilmiştir. Protokorm safhası, çimlenmeden sonra çiviye benzer bir yapının oluşması olarak açıklanmaktadır (Sezik, 2002). Dolayısıyla besi dokusuna sahip olmayan orkide tohumları, in vitroda şeker ve diğer maddelerin yardımıyla çimlenme ve ardından protokorm oluşumunu başlatmaktadır. Çalışmamızda çimlenmede birinci derecede etkili olan maltoz ve ardından gelen sukrozun; protokorm oluşumunda yer değiştirdiğini ve aynı şekilde fruktoz ve galaktozun yine son sıraları aldığı ve aynı şekilde onların da sıralamada yer değiştirdiği görülmektedir (Şekil 4.5). Burada çimlenme ve protokorm oluşumunda şekerlerin çok küçük farklılıklarla başarı sıralamasında yer değiştirdiği, ancak genel itibar ile önceki çalışmaları yine destekler nitelikte olduğu görülmektedir.

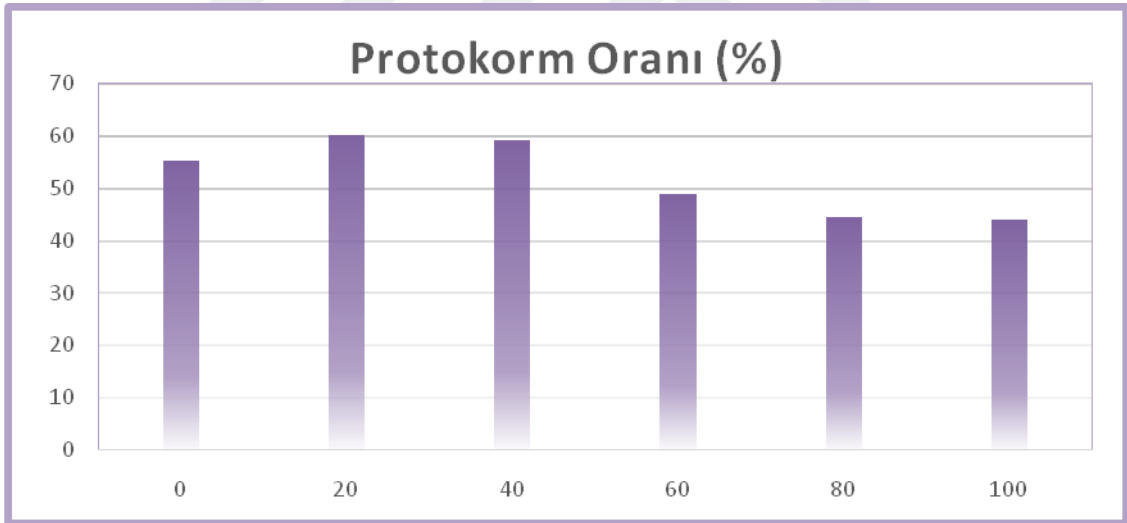
Kültür ortamları içinde kullanılan şeker konsantrasyonlarının protokorm oluşumuna etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.4).

Çimlenmeye paralel olarak kullanılan şeker konsantrasyonlarının yine 60 g/l ve üzeri uygulamalarında, azalan ortalama değerler elde edilmiştir.



Şekil 4.5. Karbonhidrat formlarının protokorm oluşum oranına etkisi (%)

Şeker konsantrasyonlarına göre elde edilen en yüksek ortalama değer (% 60,16) 20 g/l uygulamasından elde edilmiş olup istatistik olarak 40 g/l (% 59,04) uygulaması ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.6).

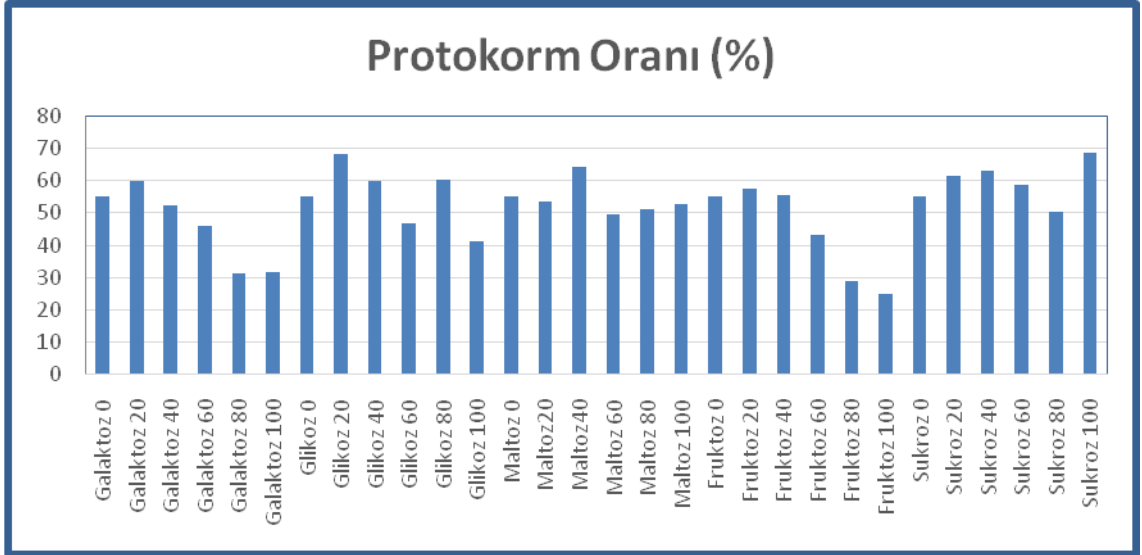


Şekil 4.6. Karbonhidrat konsantrasyonlarının protokorm oluşum oranına etkisi (%)

En düşük protokorm oluşumu 80 ve 100 g/l uygulamalarından elde edilmiştir ve istatistik olarak aynı grup içinde yer almışlardır. Protokorm oluşumunda da çimlenmede olduğu gibi, artan şeker dozlarının büyümeyi engelleyici olduğu görülmektedir (Harvais, 1973; Van Waes ve Debergh, 1986).

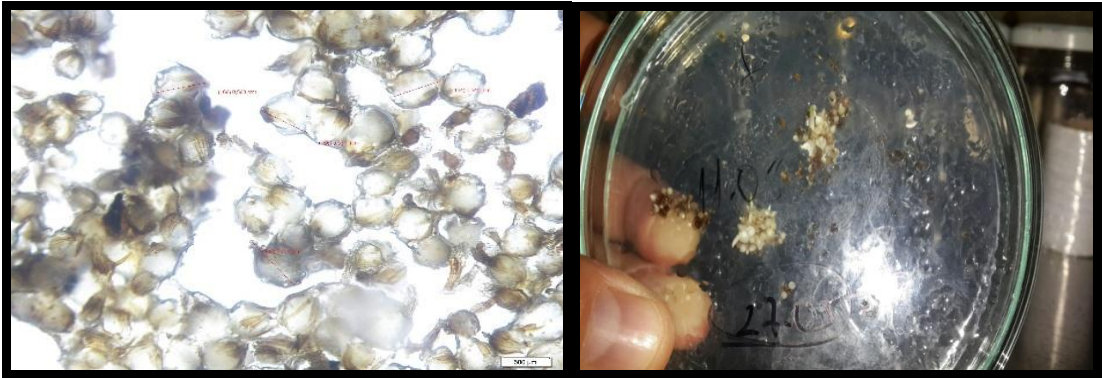
Kullanılan ortam ve konsantrasyonların protokorm oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde en yüksek protokorm oluşum oranının % 68,53 ile Sukroz100'den elde

edildiği görülmektedir (Tablo 4.1). En düşük protokorm ortalama değerinin ise Fruktoz100 ortamından % 25,33 elde edildiği belirlenmiştir. Tüm şeker formlarına genel olarak bakıldığında kullanılan dozlar arttıkça protokorm oluşumunun düştüğü görülmektedir. Ancak 60 g/l dozu bir kırılma noktası gibi görülmekte, sonra yine genel olarak protokorm oluşumunda artış gözlenmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının protokorm oluşum oranına etkisi (%)

Protokorm, uygulanan tüm ortam ve dozlarda gerçekleşmiştir (Şekil 4.8). Galaktoz uygulamasında % 31,40-59,79; glukoz uygulamasında % 41,08-68,44; maltoz uygulamasında % 49,75-% 64,40; fruktoz uygulamasında % 25,33-57,67 ve sukroz uygulamasında % 50,52-68,53 arasında protokorm oluşmuştur ve ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli çıkmıştır.



Şekil 4.8. Kültür ortamında çimlenen *O. sancta* tohumlarından protokorm oluşması

VWD ve KC ortamlarının kullanıldığı çalışmada *Spiranthes spiralis* ve *Dactylorhiza osmanica* türlerinin in vitroda protokorm oluşumları izlenmiştir. Protokormlar, bazı N kaynağı çıkarılmış VWD ortamlarında daha zayıf, çok küçük ve sağlıklı olarak gelişmiştir. Türlerin protokormları N içeren ortama aktarıldığında sağlıklı hale gelmiştir (Sazak ve Ozdener, 2006). Altı adet orkide türünün protokorm oluşumuna etkisine bakıldığında en yüksek oranın % 13,11 olduğu görülmüştür (Gümüş ve ark., 2008). Beş farklı kültür ortamında çimlendirilen altı adet orkide türünde en yüksek protokorm oluşum oranı % 62,92 olarak KC ve VWD ortamında elde edilmiştir (Çığ, 2012). Beş orkide tohumunun KC ve KC+1 mg/l GA₃ ortamlarına ekilmesiyle yapılan çalışmada protokorm oluşumu en fazla *O. sancta* türünde % 5,34 olarak ortaya çıkmıştır (Bulunuz Palaz ve ark., 2012). Sekiz adet orkide türü ile yapılan in vitro çalışmasında *O. sancta* tohumları EBP+AK ortamında % 78,12 oranında protokorm oluşturmuştur (Bulunuz Palaz ve ark., 2014). In vitroda beş orkide türüyle yapılan çalışmada en fazla protokorm oluşma oranı tripton içeren besi ortamında *Serapias vomeracea* türünde % 28, *O. sancta* türünde % 48, *Orchis coriophora* türünde % 48 olarak kaydedilmiştir (Karakuş, 2015).

Yapılan benzer çalışmalardan anlaşılacağı gibi protokormlar genellikle VWD ortamlarında başarılı gelişme göstermiştir. Özellikle *O. sancta* ile ilgili elde edilen % 78,12 ortalama değerinin, kullanılan EBP+aktif karbon ortamından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. % 5,34 olarak bulunan protokorm oluşum oranı KC+1 mg/l GA₃ ortamından elde edilmiş olup, çalışmamızdan elde edilen ortalama değerinin oldukça altında seyretmiştir. Kültür ortamının *O. sancta* türünün protokorm oluşumuna etkisi açıkça görülmektedir.

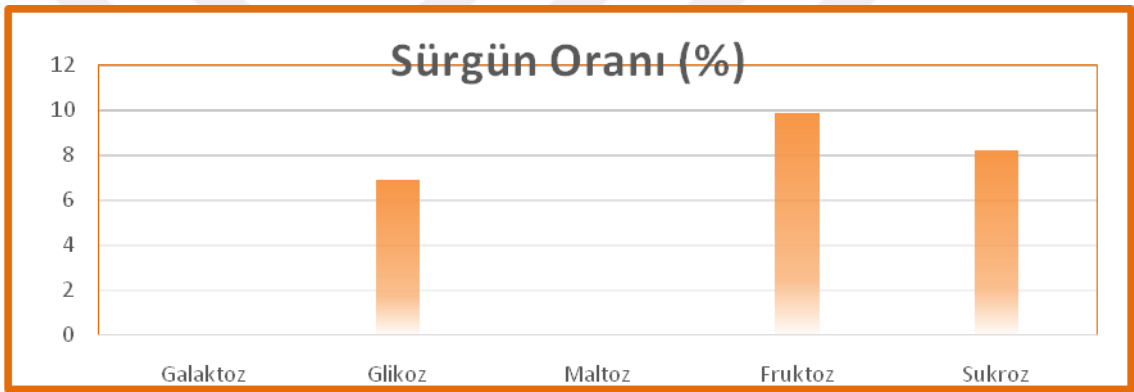
4.3. Sürgün Oranı (%)

Kültür ortamları içinde kullanılan şeker tiplerinin sürgün oluşumuna etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur (p<0.01) (Tablo 4.3).

Kültür ortamına eklenen şeker tipleri arasında sürgün oluşumuna ait en yüksek ortalama değer % 9,86 olarak fruktozdan elde edilmiştir. Sukroz ve glukozdan sırasıyla % 8,21 ve % 6,87 oranlarında sürgün oluşurken; galaktoz ve maltoz uygulamalarından hiç sürgün elde edilememiştir. Tablo 4.3'te görüldüğü gibi sukroz uygulaması, protokorm oluşumunda da etkili bir şeker iken, aynı etkiyi sürgün oluşumunda da

göstermiştir. Glukoz da aynı şekilde sukrozu takip eden şeker tipi olmuş; ancak fruktoz protokorm oluşumunda diğer şeker tiplerine göre daha düşük performans gösterse de sürgün oluşumunda daha fazla olumlu etkiye sahip olmuştur (Şekil 4.9).

Buna karşılık protokorm oluşumunda olumlu etkisi olan maltoz ve galaktozun sürgün gelişimine olumsuz etkisi olmuştur. Sukrozun çimlenme ve gelişme için kullanılan şekerler arasında en çok olumlu etkisinin; galaktoz ve manitolün ise olumsuz etkisinin olduğu (Van Waes ve Debergh, 1986); in vitro çalışmalarda elde edilen fideler için glukoz, mannoz, maltotrioz, maltopentozun kullanılabilirdiği bildirilmiştir (Ernst ve Arditti, 1990). Galaktozun *O. sancta* tohumlarının çimlenmeden sürgün gelişimine kadar olan safhaların tümünde olumsuz etkisi görülmektedir. Aksine glukoz ve sukroz çalışmanın her aşamasında teşvik edici rol oynamıştır.

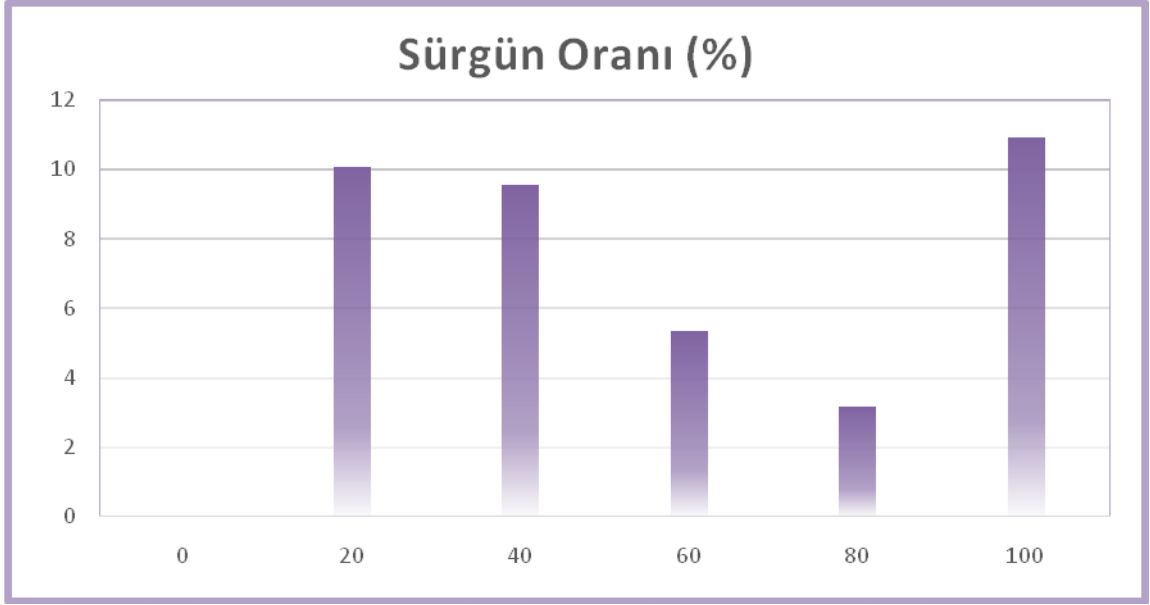


Şekil 4.9. Karbonhidrat formlarının sürgün oluşum oranına etkisi (%)

Fruktoz ve maltoz ise protokorm ve sürgün aşamalarında değişen etkiye sahip olmuştur. Bu sonuçlardan *O. sancta* tohumlarının VWD ortamında protokorm ve sürgün oluşturma safhalarında genelde fruktoz, sukroz ve glukoz şeker tiplerinde tutarlı isteklerinin olduğu; ancak galaktoz ve maltoz tiplerinde olumsuz yönde etkilendiği anlaşılmaktadır.

Kültür ortamları içinde kullanılan şeker konsantrasyonlarının sürgün oluşumu üzerine olan etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$) (Tablo 4.4).

Şeker konsantrasyonlarının sürgün oluşturmada etkisi kontrol grubu dışında genellikle olumlu olmuştur ancak azalan etkiye sahip dozların da olduğu görülmüştür (Şekil 4.10).



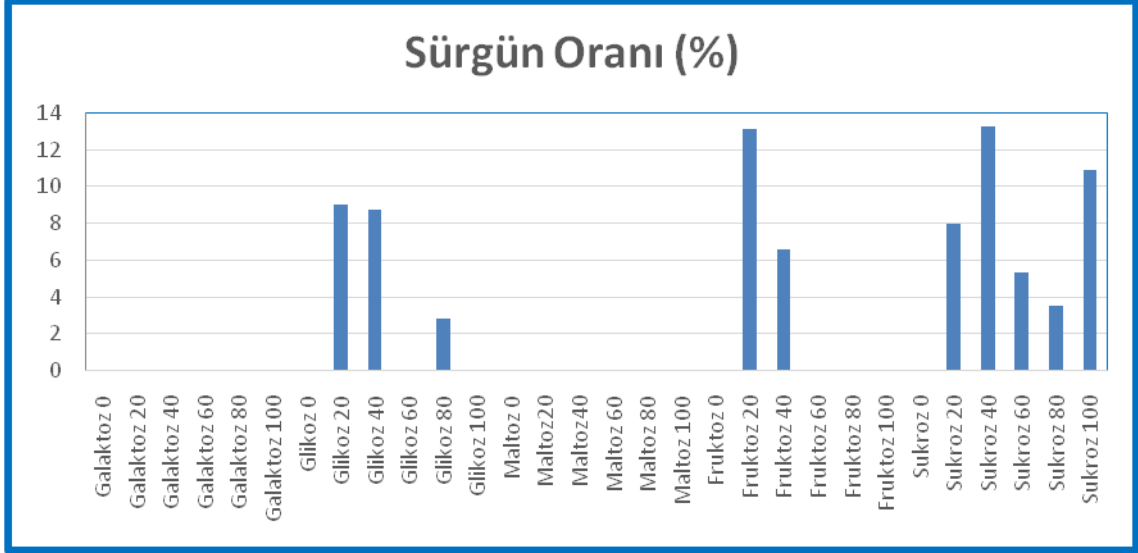
Şekil 4.10. Karbonhidrat konsantrasyonlarının sürgün oluşum oranına etkisi (%)

Sürgün oluşumuna en etkili doz 100 g/l uygulaması olarak belirlenmiştir (% 10,90). Bu sıralamayı % 10,06 ile 20 g/l ve % 9,54 ile 40 g/l uygulaması takip etmiştir. Çimlenme ve protokorm oluşumundan farklı olarak kontrol uygulamasının sürgünü hiç teşvik etmediği; aksine artan doz bağlamında 100 g/l uygulamasının 80 g/l uygulamasından daha etkili olduğu görülmüştür. Çalışmamızdan anlaşılacağı gibi sürgün oluşumu için 60 ve 80 g/l uygulamaları düşük doz grubu olarak az etkiye bulunmuştur. Ancak şeker uygulamasının hiç yapılmadığı kültür ortamında sürgün gelişmemiştir. Bu bağlamda sürgün gelişimi için şeker varlığının gerekliliği ortadadır. Protokorm gelişiminde 80 ve 100 g/l en az etkiyi sağlarken sürgün gelişiminde 80 g/l uygulamasının yine en az etkiyi gösterdiği ancak 100 g/l uygulamasının sürgün gelişiminde öne çıktığı belirlenmiştir.

Kullanılan ortam ve konsantrasyonların sürgün oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde en yüksek sürgün oluşum oranının % 13,30 ile Sukroz40'tan elde edildiği görülmektedir (Tablo 4.1). Maltoz ve galaktozun tüm dozlarının olduğu; glukozun 0, 60 ve 100, fruktozun ise 0, 60, 80 ve 100 g/l dozlarının olduğu ortamlar içinde hiç sürgün oluşmamıştır (Şekil 4.11). Oluşan sürgünler Şekil 4.12'de görülmektedir.

Sürgün, uygulanan tüm ortam ve konsantrasyonlarda gerçekleşmemiştir (Şekil 4.9 ve 4.10). Glukoz ve fruktozun bazı dozlarında; sukrozun ise tüm dozlarında sürgün

oluşumu gözlenmiştir. Glukoz grubunda % 0-9,02; fruktoz uygulamasında % 0-13,16 ve sukroz uygulamasında % 3,50-13,30 arasında sürgün oluşmuştur ve ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli çıkmıştır.



Şekil 4.11. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının sürgün oluşum oranına etkisi (%)



Şekil 4.12. Kültür ortamında oluşan *O. sancta* sürgünleri

Yapılan önceki araştırmalarda, protokormdan oluşan bitkicik sayısı % 1,86 (Çağlayan ve ark., 1998); % 80 oranlarında elde edilmiştir (Önal, 1999). Protokormlardan elde edilen sürgün oranı en yüksek 1/100 oranında KC ve 1/10 MS ortamında saptanmıştır (Çığ, 2012). Beş orkide türü ve iki kültür ortamı ile yapılan çalışmada en yüksek bitki gelişim oranı *O. sancta*'da % 3,5 olarak belirlenmiştir (Bulunuz Palaz ve ark., 2012). 8 adet orkide türü ile yapılan in vitro çalışmasında *O.*

sancta tohumlarında EBP+AK ortamında % 72,50 oranında sürgün oluşmuştur (Bulunuz Palaz ve ark., 2014).

O. sancta türü, yapılan önceki araştırmada % 72,50 ortalama sürgün değeri ile yüksek başarı göstermiştir. Çalışmada kullanılan EBP besi ortamı ve aktif karbonun, sürgün oluşumu üzerinde olumlu etkisinin olduğu açıkça görülmektedir. Diğer % 100 başarı elde edilen çalışma ile karşılaştırıldığında ise, sürgün oluşumu üzerinde farklı orkide türlerinin etkilerinin de değişiklik gösterebileceği düşünülmektedir.

4.4. Çimlenme Süresi (gün)

Şeker formlarının çimlenme süresine olan etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Karbonhidrat formlarının çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum sürelerine etkisi (gün)

Karbonhidrat Formları	Çimlenme Süresi ** (gün)	Protokorm Oluşum Süresi ** (gün)	Sürgün Oluşum Süresi** (gün)
Galaktoz	16,80 a	26,97 c	0,00 d
Glukoz	13,97 b	30,41 b	88,55 b
Maltoz	14,98 b	26,35 c	0,00 d
Fruktoz	17,20 a	37,62 a	102,33 a
Sukroz	14,01 b	26,37 c	74,99 c

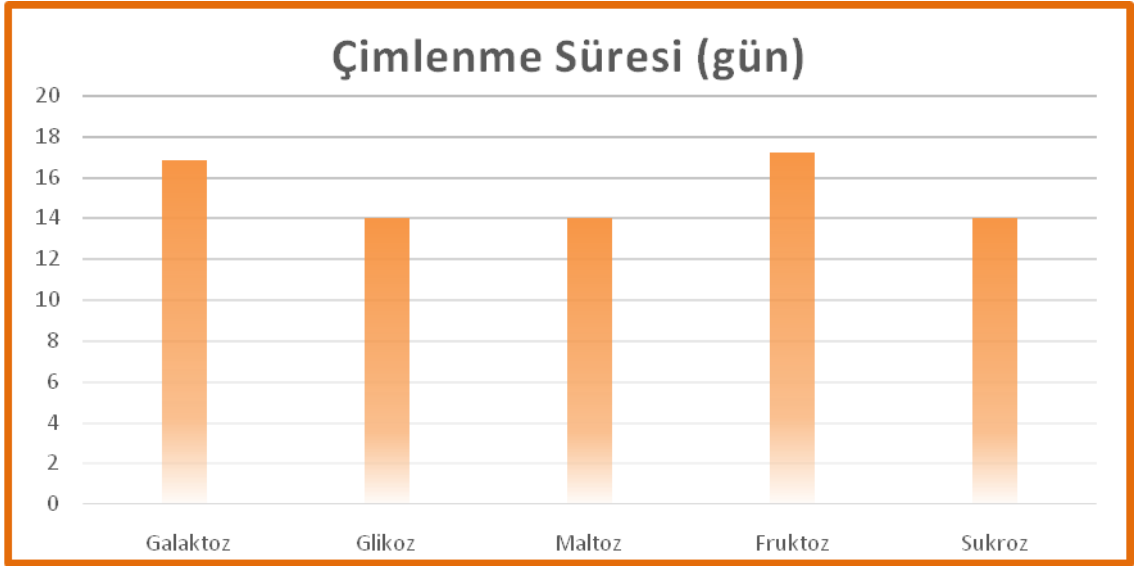
** Aynı sütunda, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir

Çimlenme süresi bakımından en yüksek ortalama değere sahip olan şeker tiplerinin sırasıyla fruktoz (% 17,20) ve galaktoz (% 16,80) olduğu belirlenmiştir. Bu şekerleri maltoz, sukroz ve glukoz takip etmiştir. Galaktoz ve fruktoz, çimlenme süresine olumsuz etkide bulunmuştur (Tablo 4.5). Bu şeker tipleri çimlenme oranındaki etkisi gibi, çimlenme süresi bakımından da olumsuz etkide bulunmuştur. Glukoz, maltoz ve sukroz, çimlenme oranları ile benzerlik gösterip en çabuk çimlenme gerçekleştiren ortamlar olmuştur (Şekil 4.13).

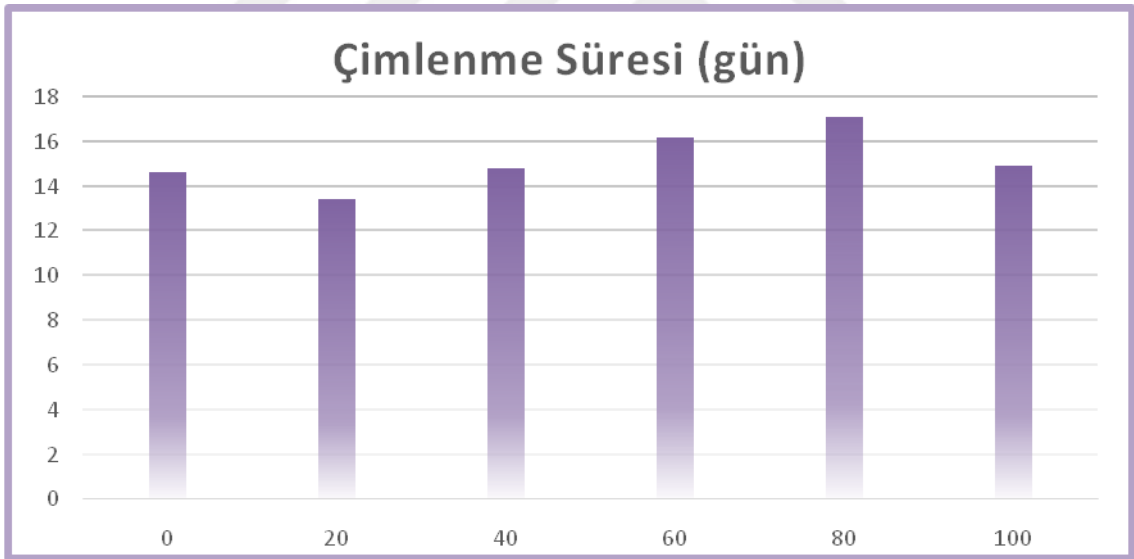
Kültür ortamları içinde kullanılan şeker konsantrasyonlarının çimlenme süresine olan etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.6).

O. sancta tohumlarının çimlenme süresine etkisi bakımından, en yavaş etkisi olan konsantrasyonun şeker konsantrasyonunun 80 g/l olduğu bulunmuştur (17,09 gün).

Bu konsantrasyonu 60 g/l uygulaması izlemiştir. Çimlenme süresine olumlu etkisi bakımından en yüksek ortalama 20 g/l uygulamasında 13,46 gün olarak elde edilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.13. Karbonhidrat formlarının tohumların çimlenme süresine etkisi (%)



Şekil 4.14. Karbonhidrat konsantrasyonlarının çimlenme süresine etkisi (%)

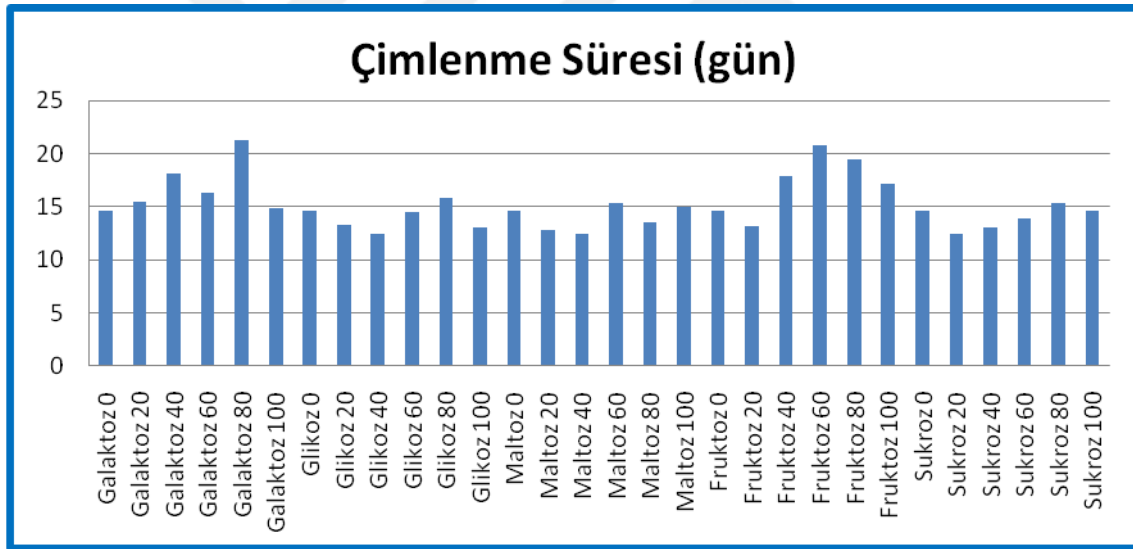
Kullanılan ortam ve konsantrasyonların çimlenme süresi üzerine etkisi incelendiğinde en yüksek çimlenme süresinin 21,33 gün ile Galaktoz80'den elde edildiği görülmektedir (Tablo 4.2). En düşük çimlenme süresi ortalaması ise 12,50 gün ile Glukoz40, Maltozun40, Sukroz20'den elde edilmiştir (Şekil 4.15). Çimlenme süresi bakımından kullanılan ortamlar ayrı ayrı incelendiğinde ortalama değerler, galaktoz uygulamasında 14,66-21,33 gün; glukoz uygulamasında 12,50-15,83 gün; maltoz

uygulamasında 12,50-15,33 gün; fruktoz uygulamasında 13,16-20,83 gün ve sukroz uygulamasında 12,50-15,33 gün olarak belirlenmiştir ve ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli çıkmıştır.

Tablo 4.6. Karbonhidrat konsantrasyonlarının çimlenme, protokorm ve sürgün oluşum sürelerine etkisi (gün)

Karbonhidrat konsantrasyonları (g/l)	Çimlenme Süresi** (gün)	Protokorm Oluşum Süresi** (gün)	Sürgün Oluşum Süresi** (gün)
0	14,66 c	23,66 d	0,00 d
20	13,46 d	24,50 d	83,11 b
40	14,82 c	30,24 c	85,55 b
60	16,17 b	33,47 b	101,16 a
80	17,09 a	36,25 a	66,83 c
100	14,94 c	29,14 c	104,50 a

** Aynı sütunda, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.15. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının çimlenme süresine etkisi (%)

In vitro koşullarda kültüre alınan orkide tohumlarında 58 günde (Çağlayan ve ark., 1998), *Orchis italica* tohumlarında 15 günde çimlenme görülmüştür (Yararbaş, 2008). *O. sancta* ve başka türlerin tohumlarıyla yapılan çalışmada en erken çimlenme *O. sancta* tohumlarında bir ay sürede (Önal, 1999); diğer bir çalışmada iki haftada gerçekleşmiştir (Bulunuz Palaz ve ark., 2012). Modifiye Lucke (LM), Murashige & Skoog, Lindemann, Vacin & Went, Malmgren Modifiye (MM) ve Knudson C (KC) ortamlarının; BA, Zea, Kin, 2-iP sitokininlerinin ve 0/24, 16/8, 24/0 aydınlık/karanlık

fotoperiyotlarının kullanıldığı çalışmada *Habenaria macroceratitis* karasal orkidesinin çimlenmesi incelenmiştir. Çalışmanın 7. haftasında LM ve KC ortamlarında % 89 civarında en yüksek çimlenme oranı elde edilmiştir (Stewart ve Kane, 2006). Yapılan bir çalışmada kültüre alınan tohumlarda 15-20 gün sonra çatlama ve renk açılması gözlenmiştir (Sarı ve ark., 2011). KC, VWD ve Pfeffer besi ortamlarına ekilen 4 orkide türünde çimlenme süresi ortalama 3 ay olarak belirlenmiştir (Kısakürek, 2011). VWD, KC, MS, ½ MS ve 1/10 MS kültür ortamlarının orkide tohumlarının çimlenme sürelerine olan etkilerinin belirlendiği çalışmada; VWD ortamının performansı 27,67-130,53 gün aralığında ortaya çıkmıştır (Çığ, 2012). Diğer ortamlar dikkate alındığında bu aralığın 22,00-191 gün olduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmalara göre çimlenme süresi, çeşitli ortam ve uygulamalarla, türlere göre farklılık göstermiştir (15-191 gün). Ancak bu çalışmada, özellikle *O. sancta* türü ile yapılan önceki in vitro çalışmasında belirtilen 1 aylık ve iki haftalık çimlenme süresinin yakınlığında sonuç almak, *O. sancta* türü tohumlarının erken çimlendiği sonucunu ortaya koymaktadır. Kültür ortamının, katılan karbonhidrat ve konsantrasyonlarının etkili olduğu düşünülmektedir.

4.5. Protokorm Oluşum Süresi (gün)

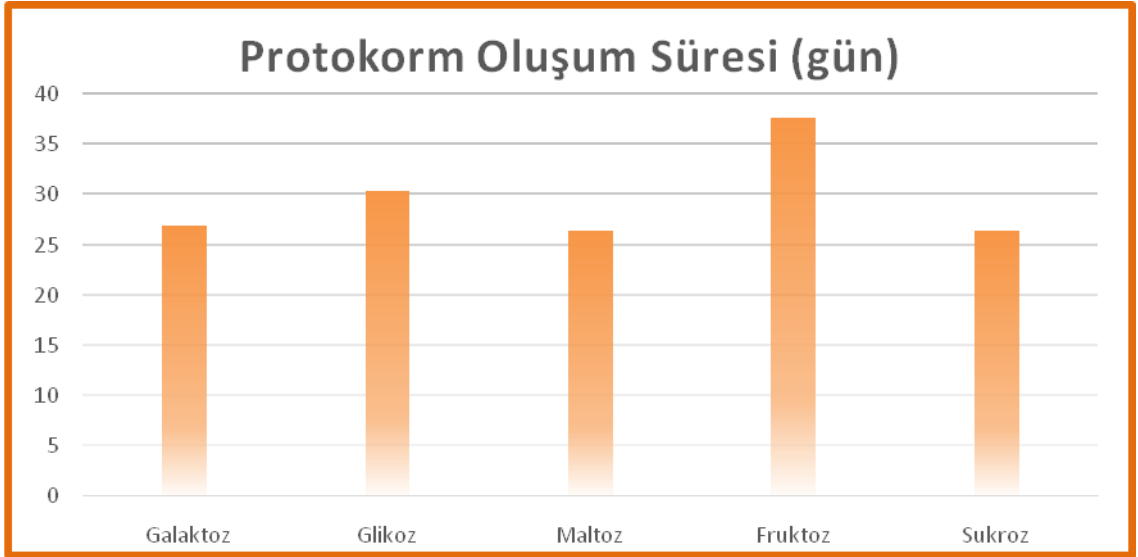
Şeker formlarının protokorm oluşum süresine olan etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.5).

Şeker formlarının protokorm oluşumu üzerine olan etkisine bakıldığında çimlenmede (Tablo 4.5) glukoz, maltoz ve sukroz uygulamaları en erken sürede etki gösterirken; protokorm oluşumundaki en erken sonucu veren ortamlar maltoz, sukroz ve galaktoz olarak belirlenmiştir. Buna göre en hızlı protokorm oluşumu 26,35 gün ile maltozda görülmüştür. En geç protokorm oluşumu ise fruktozda 37,62 gün olarak ortaya çıkmıştır. Fruktozun çimlenme ve protokorm oluşumundaki olumsuz etkisi açıkça görülmektedir (Şekil 4.13 ve 4.16).

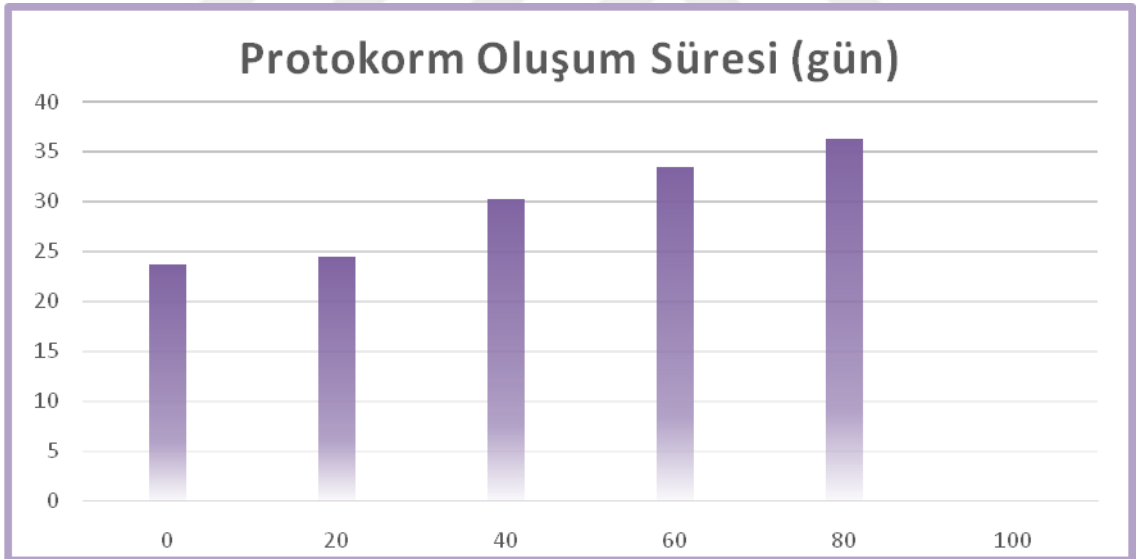
Kültür ortamları içinde kullanılan şeker konsantrasyonlarının protokorm oluşum süresine olan etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.6).

Şeker konsantrasyonları arasında protokorm oluşumunu en çok hızlandıran kontrol ve 20 g/l uygulamaları olmuştur (Şekil 4.17). Sırasıyla 23,66 gün ve 24,50 gün

olarak ortaya çıkmıştır. Protokorm oluşumunu en geç sürede başlatan uygulama 80 g/l olmuş ve 36,25 gün ortalama değeri almıştır.



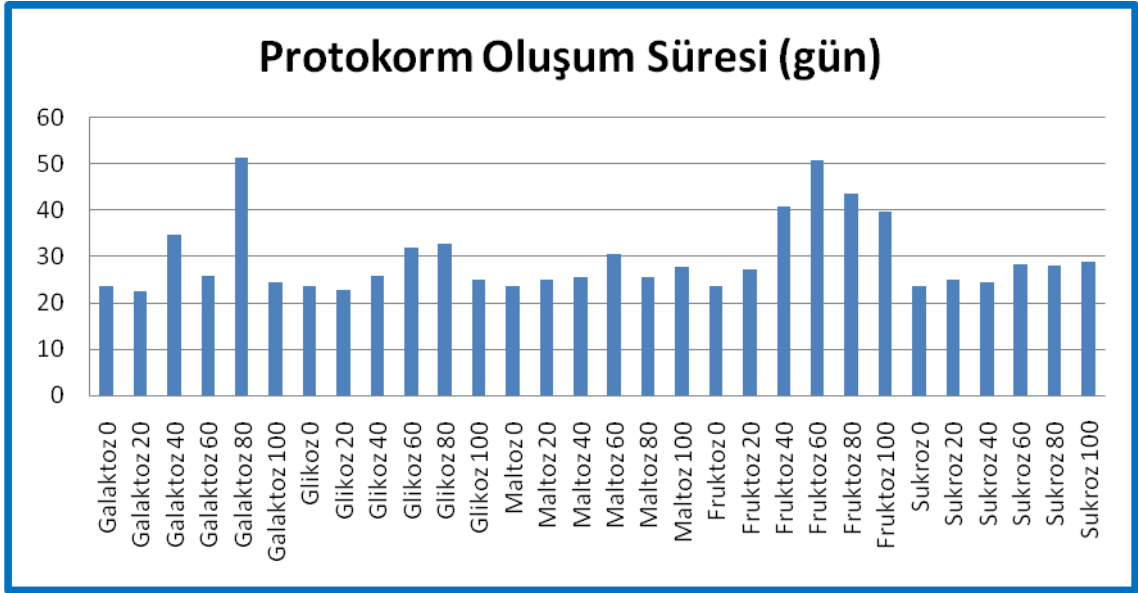
Şekil 4.16. Karbonhidrat formlarının protokorm oluşum süresine etkisi (%)



Şekil 4.17. Karbonhidrat konsantrasyonlarının protokorm oluşum süresine etkisi (%)

Kullanılan ortam ve konsantrasyonların protokorm oluşum süresi üzerine etkisi incelendiğinde en yüksek protokorm oluşum süresi 51,33 gün ile Galaktoz80'den elde edilmekle birlikte, 50,83 gün ile Fruktoz60'dan elde edilen değerle arasındaki fark istatistik olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 4.2). En düşük protokorm oluşum süresi

ortalaması ise 22,50 gün ile Galaktoz20 ve 22,83 gün ile Glukoz20'den elde edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının protokorm oluşum süresine etkisi (%)

Protokorm oluşum süresi galaktoz uygulamasında 22,50-51,33 gün; glukoz uygulamasında 22,83-32,66 gün; maltoz uygulamasında 23,66-30,50 gün; fruktoz uygulamasında 23,66-50,83 gün ve sukroz uygulamasında 23,66-28,88 gün olarak belirlenmiştir ve ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli çıkmıştır.

Değiştirilmiş Curtis ortamına ekilen *Orchis lutea* ve *Orchis fusca* türlerinin tohumlarında iki ay sonra protokorm elde edilmiştir (Barroso ve ark., 1990). Farklı besi ortamları, bitki büyüme düzenleyicileri ve aydınlık/karanlık uygulamalarının *Habenaria macroceratitis* karasal orkidesinin protokorm oluşumları üzerine etkisi incelendiğinde, protokorm gelişiminin MM ortamında 7 ve 16 hafta sonra gerçekleştiği görülmüştür (Stewart ve Kane, 2006). Bioreaktörlerin kullanıldığı çalışmalarda protokorm oluşumu inokulumdan 8 hafta sonra (Paek ve ark., 2001; Young ve ark., 2000); 40 gün sonra (Yang ve ark., 2010) elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada tohum ekimini takip eden 8 ay boyunca başka gelişme kaydedilmemiş olup bu sürenin sonunda besi ortamlarına 2 mg/l IAA eklenmesiyle protokorm oluşumu başlamıştır (Sarı ve ark., 2011). Protokorm oluşum süreleri, çalışılan tüm ortamlar dikkate alındığında 53,50-309,94 gün aralığında iken; VWD ortamında 58,50-309,94 gün olarak ortaya çıkmıştır. (Çığ, 2012). Tehdit altında bir bitki türü olarak gösterilen *Orchis sancta*'nın çimlenme ve protokorm gelişimini takip etmek için yapılan çalışmada 20 g/l sukroz ve 7 g/l agar ihtiva eden tam

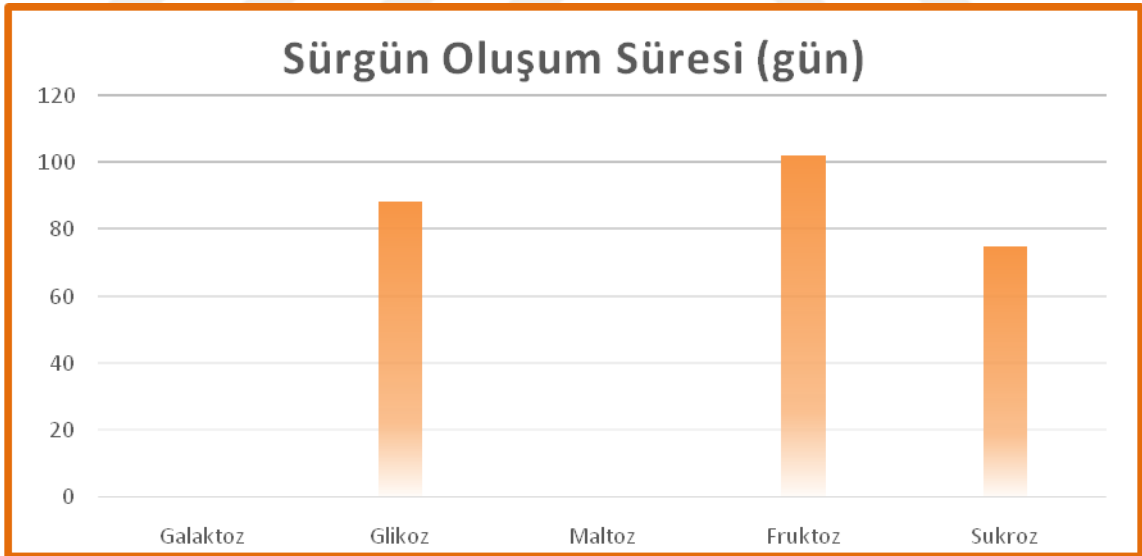
güç ve ½ güç Lindemann (LDM) ortamı kullanılmış olup 12. haftada protokorm oluşumu gözlenmiştir (Acemi ve ark., 2013).

Bu çalışmada *O. sancta* türünün protokorm oluşum süresi ile önceki çalışmadan elde edilen süre karşılaştırıldığında, oldukça kısa sürede başarı elde edildiği açıkça görülmektedir. Diğer çalışmalarda protokorm oluşum süresi aralığı 40-309,94 gün olarak ortaya çıkmaktadır. Bu sürenin, kültüre alınan bitki türleri ve kullanılan ortam içerikleri ile ilgili olarak değiştiği kanısına varılmaktadır.

4.6. Sürgün Oluşum Süresi (gün)

Karbonhidrat formlarının sürgün oluşum süresine olan etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.5).

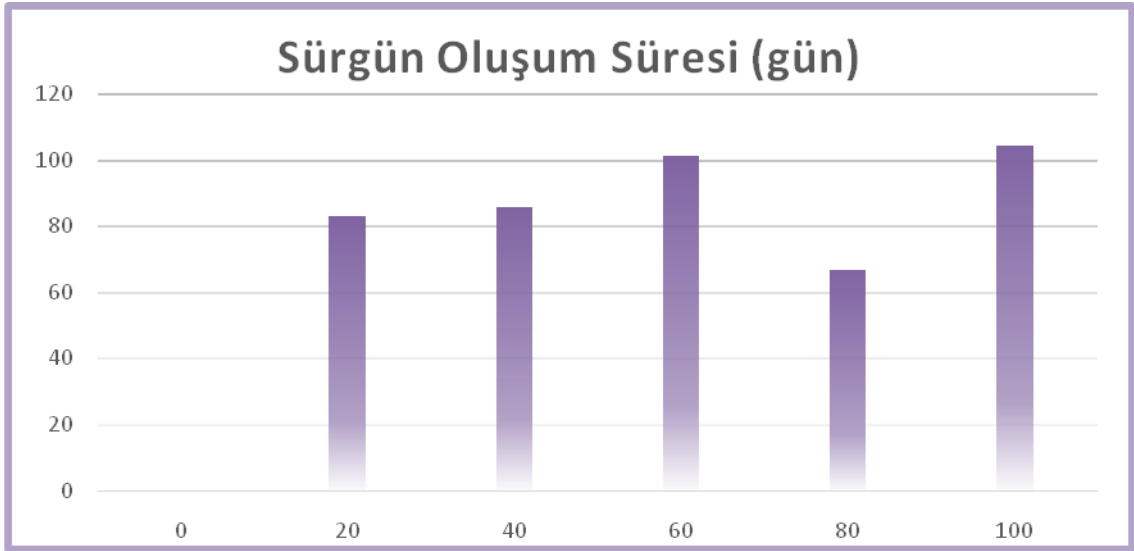
Kültür ortamlarına katılan şeker tipleri arasında sürgün oluşumunu en hızlandıran şekerin sukroz olduğu tespit edilmiştir (74,99 gün). Sukrozu 88,55 gün ile glukoz; glukozu da 102,33 gün ile fruktoz takip etmektedir. Galaktoz ve maltozda sürgün gelişimi olmamıştır. Buna karşılık protokorm oluşum süresini uzatan fruktoz, sürgün oluşum süresini de olumsuz yönde etkilemiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Karbonhidrat formlarının sürgün oluşum süresine etkisi (%)

Kültür ortamları içinde kullanılan şeker konsantrasyonlarının protokorm oluşum süresine olan etkisi incelendiğinde ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$) (Tablo 4.6).

Şeker konsantrasyonları, sürgün oluşum süresi bakımından protokorm oluşum süresinin tersine bir etki göstermiştir. Sürgün gelişim süresinde en etkili konsantrasyon 80 g/l olarak belirlenmiş 66,83 gün olarak kayıt altına alınmıştır. Sürgün oluşum süresi en uzun olarak 104,50 gün ile 100 g/l ve 101,16 gün ile 60 g/l uygulamalarından elde edilmiştir (Şekil 4.20).

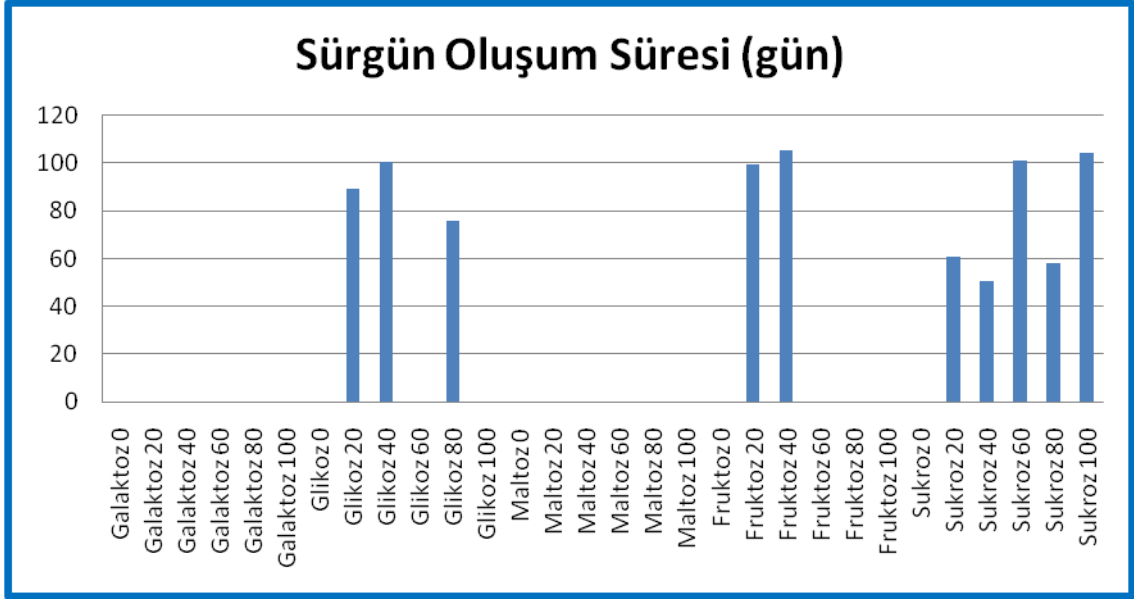


Şekil 4.20. Karbonhidrat konsantrasyonlarının sürgün oluşum süresine etkisi (%)

Kullanılan ortam ve konsantrasyonların sürgün oluşum süresi üzerine etkisi incelendiğinde en yüksek sürgün oluşum süresinin 105,33 gün ile Fruktoz40'tan ve 104,50 gün ile Sukroz100'den elde edildiği görülmektedir (Tablo 4.2). En düşük sürgün oluşum süresi ortalaması ise 50,66 gün ile Sukroz40'tan elde edilmiştir (Şekil 4.21). Bunun yanı sıra galaktoz ve maltoz uygulamalarının tamamında; glukozun 0, 60 ve 100; fruktozun 0, 60, 80 ve 100 g/l ve sukrozun 0 g/l dozlarında sürgün oluşumu gözlenmemiş olup bu sebepten sürgün oluşum süresi de kayıt altına alınamamıştır.

Sürgün oluşum süresi glukoz uygulamasında 75,66-100,66 gün; fruktoz uygulamasında 99,33-105,33 gün; ve sukroz uygulamasında 50,66-104,50 gün olarak belirlenmiştir ve ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli çıkmıştır.

Altı farklı besin ortamı içinde kültüre alınan *Orchis mascula* tohumlarında 4-5 ayda sürgün ucu belirmiştir (Valletta ve ark., 2008). *Orchis italica* tohumlarından 2 ay sonra ilk yapraklar oluşmuştur (Yararbaş, 2008).



Şekil 4.21. Karbonhidrat form ve konsantrasyonlarının sürgün oluşum süresine etkisi (gün)

Beş farklı kültür ortamının sürgün oluşum sürelerine olan etkisi dikkate alındığında 79,00-406,83 gün aralığı dikkati çekerken; VWD ortamında en erken sürgün gelişimi 95,33 günde; en geç sürgün gelişimi ise 267,78 günde belirlemiştir (Çığ, 2012).

Sürgün oluşum süresi bakımından çalışmamızdan elde edilen bulgular, önceki çalışmalardan elde edilen veriler ile benzerlik göstermektedir. Kültüre alınan orkide türlerinden kaynaklanan farklı sonuçlar elde edilmiş olabilir ancak bu süreyi, kullanılan besi ortamlarının farklılığı da etkilemektedir. Üç orkide türünün denendiği çalışmada *Oeceoclades decaryana* türü için sukroz, glukoz ve fruktozun çok iyi enerji kaynağı olduğu görülmüştür. *Dactylorhiza majalis*'in fruktozda biraz zayıf, glukozda ise çok zayıf geliştiği belirtilmiştir (Ponert ve ark., 2011). Bu çalışmalar heksozların bu türler için iyi bir karbon kaynağı olmadığını göstermektedir. *Ophrys lojacoii* sukrozda daha iyi, glukozda zayıf, fruktozda çok zayıf gelişme göstermiştir. Birçok protokorm, fruktoz içeren ortamlarda daha iyi gelişme göstermiş ancak daha ileriye gidememiştir. Bu da fruktozun protokorm gelişiminde engelleyici özelliğinin olduğunu göstermiştir. Bazı araştırmacılar, fruktozun glukozdan daha iyi bir gelişme sağladığını söylemektedir (Arditti, 1967; Ernst, 1967). Orkideler için in vitroda daha çok sukrozun kullanıldığı, ancak bazı durumlarda fruktoz ve glikozun da kullanıldığı bildirilmiştir (Michl, 1988; Rasmussen, 1995).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Salep elde etmede kullanılan *Orchis sancta* L. türünün in vitro koşullarda, Van Waes Debergh kültür ortamının içine farklı formda ve konsantrasyonlardaki karbonların ilave edilmesinin, orkide tohumlarının çimlenmesi ve gelişmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada sukroz, glukoz, fruktoz, galaktoz ve maltoz formundaki karbonların 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 g/l konsantrasyonları uygulanmıştır. Çimlenme süresi, protokorm oluşum süresi, sürgün oluşum süresi, çimlenme oranı, protokorm oranı ve sürgün oranına bakılmıştır.

Karbonhidrat formlarının orkide tohumlarının çimlenmesine olan etkisi incelendiğinde, en etkili şeker tipinin % 68,46 ortalama ile maltoz; şeker konsantrasyonunun etkisine bakıldığında ise en iyi performans sağlayan konsantrasyonların kontrol, 20 ve 40 g/l gibi düşük dozlar ve özellikle % 67.87 ortalama ile 40 g/l olduğu belirlenmiştir. Protokorm oluşumunda % 59,63 ortalama ile sukroz; % 60,16 ortalama ile 20 g/l şeker konsantrasyonu en etkili uygulamalar olmuştur. Sürgün gelişiminde ise fruktoz % 9,86; 100 g/l konsantrasyon % 10,90 oranlarında etkili olmuştur. Karbonhidratların çimlenme süresi bakımından etkisi incelendiğinde çimlenmeyi en erken sürede başlatan uygulamaların glukoz, sukroz ve maltoz olduğu; özellikle glukozun 13,97 günde ilk sırada yer aldığı görülmektedir. Konsantrasyonun çimlenme süresine etkisi incelendiğinde ise en etkili doz 20 g/l (13,46 gün) olmuştur. Şeker tipi ve konsantrasyonunun protokorm oluşum süresi üzerindeki etkisine ayrı ayrı bakıldığında, en erken oluşum maltoz, sukroz ve galaktoz uygulamalarında görülse de maltoz 26,35 gün ile ilk sırada yer almıştır. 0 (kontrol) ve 20 g/l dozları protokorm oluşumunda erkenciliği sağlamış olup en erken oluşum 20 g/l uygulamasında 23,66 gün olarak belirlenmiştir. En erken sürgün oluşumu, karbonhidratlarda sukroz (74,99 gün) ve konsantrasyonlarda 80 g/l (66,83 gün) uygulamalarında gerçekleşmiştir.

İncelen tüm kriterler için uygulanan karbonhidrat tipi ve konsantrasyonları birlikte değerlendirildiğinde, en geç çimlenme süresinin 21,33 gün ile Galaktoz80'den, en erken çimlenme süresinin de 12,50 gün ile Glukoz40; Maltoz40 ve Sukroz20 uygulamalarında olduğu görülmektedir. En yüksek protokorm oluşum süresi 51,33 gün ile Galaktoz80 ve 50,83 gün ile Fruktoz60; en düşük protokorm oluşum süresi ise 22,50 gün ile Galaktoz20 ve 22,83 gün ile Glukoz20 uygulamalarında elde edilmiştir. En yüksek sürgün oluşum süresin 105,33 gün ile Fruktoz40'tan, en düşük sürgün oluşum

süresi ortalaması ise 50,66 gün ile Sukroz40'tan elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre en hızlı çimlenme Glukoz40, Maltoz40 ve Sukroz20; protokorm oluşumu Galaktoz20; sürgün oluşumu Sukroz40 uygulamalarında gerçekleşmiştir.

Tüm şeker formları çimlenme oranına etkiye bulunmuştur. En yüksek çimlenme ortalamasının % 77,85 ile Maltoz40'tan, en düşük çimlenme ortalama değerinin ise Galaktoz100 uygulamasından % 44,36 ve Galaktoz 80 uygulamasından % 44,39 elde edildiği belirlenmiştir. En yüksek protokorm oluşum oranının Glukoz20 ve Sukroz100 uygulamaları olmak üzere en çok % 68,53 ile Sukroz100; en düşük protokorm oluşum oranının ise Galaktoz80, Galaktoz100, Fruktoz80 ve Fruktoz100 uygulamalarından olmak üzere özellikle Fruktoz100 ortamından % 25,33 elde edildiği belirlenmiştir. En yüksek sürgün oluşum oranının Sukroz40 ve Fruktoz20 uygulamalarından olmak üzere başlıca % 13,30 ile Sukroz40'tan elde edildiği görülmektedir. İçinde hiç sürgün oluşmayan uygulamaların; maltoz ve galaktozun tüm dozlarının olduğu; glukozun 0, 60 ve 100, fruktozun ise 0, 60, 80 ve 100 g/l dozlarının olduğu ortamlar olduğu belirlenmiştir.

5.2. Öneriler

Orchis sancta L., yurdumuzda doğal olarak yetişen ve yumrularından salep elde edilen bir orkide türüdür. Hızlı kentleşme, nüfus artışı, aşırı otlatma ve en önemlisi salep elde etmek için yapılan sökümlerden dolayı, her salep orkidesi gibi tahribata maruz kalmaktadır. Generatif ve vejatatif yolla doğal olarak çoğaltılması çok zor olan orkideler için in vitro çalışmalar alternatif olarak gösterilmektedir. In vitro koşullarda simbiyotik ve asimbiyotik olarak çimlendirme ve çoğaltma çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalarda kültür ortamları ve içerikleri, kültür koşulları (sıcaklık, ışık, pH vb.), büyüme düzenleyiciler, bakteri-fungus, ultraviyole, radyasyon gibi farklı öğelerin farklı kullanımları ile pek çok veri alınmaktadır. Orkide tohumlarının endosperme sahip olmamaları sebebiyle de çimlenme başlangıcı için dışarıdan temin edilecek karbonhidrat takviyesine ihtiyaç duyulmaktadır. Karbonhidrat tipinin olduğu kadar, kültür ortamına katılan konsantrasyonu da önem taşımaktadır. Çünkü şekerin teşvik edici rolü, bazı dozlarda engelleyici olarak ortaya çıkabilmektedir. Yapılan bu çalışma, kullanılan şeker tipleri ve konsantrasyonlarının, *O. sancta* tohumlarının çimlenme, protokorm ve sürgün oluşturma safhalarında yaptığı etkilerin farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır.

O. sancta türünü in vitroda çimlendirmede, çalışmada kullanılan beş şeker tipi arasında en iyi performans maltoz, arkasından sukrozdan alınmıştır. Protokorm

oluşumu için ise sukroz en etkili şeker tipi olmuştur. Sürgün oluşumunda öncelikle fruktoz, sonrasında sukroz ve en son glukoz performans gösteren şekerler olmuştur. *O. sancta* ya da diğer orkide türlerinin çimlendirilmesinde maltoz; protokorm ile sürgün oluşmasında ise sukroz kullanılabilir düşüncesi ortaya çıkmaktadır. Dozlar açısından bakıldığında kontrol dâhil olmak üzere 20 ve 40 g/l olan düşük şeker dozlarının çimlenme ve protokorm gelişimine olumlu etki yapığı söylenebilir. Sürgün gelişiminde 100 g/l doz en yüksek değeri vermiştir. Yapılacak olan başka çalışmalarda şeker konsantrasyonu olarak 20 ve 40 g/l dozlar önerilebilir. Sürgün oluşumu için 20 ve 40 g/l dozlarının çok az farkla üstüne çıkan 100 g/l dozu da önerilebilir. Çalışmamızın sonucuna göre kontrol uygulamasında, yani şekerin hiç kullanılmadığı ortamlardan elde edilen çimlenme ve protokorm oluşum oranı bile, yüksek konsantrasyonlu şekerlerin içinde olduğu uygulamalardan daha yüksek çıkmıştır. Buradan çimlenme ve protokorm oluşumu için düşük konsantrasyonların uygulanabileceği; yüksek dozajlardan kaçınılması gerektiği anlaşılmaktadır. Bu çalışmadaki şeker ve dozların birlikte kullanımında önerilebilecek uygulamalar; çimlenme için Maltoz40; protokorm için Glukoz20 ve Sukroz100; sürgün oluşumu için Fruktoz20 ve Sukroz40 olabilir.

Önceliğimiz, türe ait tohumların in vitro koşullarda çimlendirilip çoğaltılması ve doğaya kazandırılmasıdır. Ardından ticari olarak bakıldığında, üretim miktarı kadar, kısa zamanda seri üretimin de önemli olduğu gerçeği bilinmektedir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre; çimlenme küçük sayısal farklılıklarla en hızlı, glukoz, sukroz ve maltoz uygulamalarında olmuştur. Protokorm oluşumu ise sukroz, galaktoz ve maltoz uygulamalarında daha çabuk gerçekleşmiştir. Sürgün gelişiminde ise sukroz etkili olmuştur. Konsantrasyonlar göz önüne alındığında çimlenme için 20 g/l; protokorm oluşumu için 0 ve 20 g/l; sürgün gelişimi için ise 80 g/l uygulamaları önemli bulunmuştur. Öncelikle çimlendirme ve çoğaltması zor olan orkide tohumlarının ne kadar sürede çalışıldığından ziyade türe ait uygun protokolün belirlenmesi önemlidir. Her türe özel olabileceği gibi, genel olarak da uyarlanabilecek uygulamalar olabilir. *O. sancta* için çimlenmede maltoz; protokorm oluşumunda sukroz; sürgün gelişiminde fruktoz; kullanılan şeker konsantrasyonları arasında ise çimlenmede 0, 20 ve 40 g/l; protokormda 20 ve 40 g/l; sürgünde 100 g/l gibi dozlar kullanılabilir. Çimlendirme ve çoğaltma çalışmalarında daha verimli sonuçlar elde etmek için şeker tipi ve dozlarının yanında başka etmenler de işin içine katılabilir. Bu sonuçlar, farklı pH, inorganik maddeler ve dozlar gibi kültür ortamının muhteviyatına ilişkin olarak değerlendirilebilir. Bu şekilde kültür ortamına ekilen orkide tohumlarının, ortamın

içeriğindeki maddelerden yararlanma durumu da değişebilir. Bu alternatif uygulamalar, tohumun çimlenme, protokorm ve sürgün; hatta kök ve yumru oluşturma safhalarında farklı farklı denenebilir.

Sonuç olarak, orkideler hakkında yapılan her çimlendirme ve çoğaltma çalışması ve verimin elde edildiği her metot, önce laboratuvar, devamında araziye adaptasyon safhalarında, tür devamlılığı için hazine değerindedir. Bu bilinç ve azimle yapılacak çalışmalar sayesinde orkideleri arazide, yaşam alanları içinde görmeye devam edilebilir.



6. KAYNAKLAR

- Acemi, A., Kıran, R., Özen, F., 2013. In vitro Germination and Protocorm Formation of a Naturally Growing Salep Orchid in Turkey, *Orchis sancta*, Workshop Abstracts Book, 5th International Orchid Workshop.
- Andronova, E.V., Ivashenko, Zh., V., 2007. Viability of different plant offsprings of *Dactylorhiza maculata* (Orchidaceae) after transfer from in vitro culture to nature. *Botanicheskii Zhurnal*, 92 (10), 1544-1554.
- AOSA, 2002. Seed Vigor Testing Hand Book, Contribution No:32. Association of Official Seed Analyst. New Mexico 88003
- Arditti, J., 1967. Factor affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33, 1-97
- Arditti, J., 1979. Aspects of orchid physiology. *Bot. Rev.*, 7, 421-655.
- Arditti, J., Harrison, C.R., 1977. Vitamin requirement and metabolism in orchids. 6. *Orchid Biology, Review and Respectives*. Cornell University Pres, I, Ithaca, NY. 160-175.
- Aytaş, T., 1994. Bazı *Ophrys* L. (Orchidaceae) Türlerinden Simbiyotik Fungusların İzolasyonu ve *Ophrys apifera* Hudson Tohumlarının Asimbiyotik ve Simbiyotik Ortamlarda Çimlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma (yüksek lisans tezi). *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Samsun.
- Barroso, J., Feveireiro, P., Oliviera, M.M., Pais, M.S.S., 1990. In vitro seed germination, differentiation and production of minitubers from *Ophrys lutea* Cav., *Ophrys fusca* Link and *Ophrys speculum* Link. *Scientia Horticulturae*, 42 (4), 329-337.
- Bulunuz Palaz, E., Kaya, Y., Özdemir, A., 2014. Some Sahlep Orchids Seeds In Vitro Germination and Shoot Development, *International Mesopotamia Agriculture Congress*, 22-25 September 2014 Diyarbakır, Turkey. 154-163.
- Bulunuz Palaz, E., Özdemir, A., Kaya, Y., 2012. Bazı salep orkide türlerine ait tohumların asimbiyotik çimlendirilmesi üzerine yapılan araştırmalar. *Türkiye 2. Orkide ve Salep Çalıştayı Bildirileri*, 25-26 Nisan 2012, İzmir. 293-300.
- Chang, C., Chen, Y.C., Yen, H.S., 2005. Protocorm or rhizome. The Morphology of seed germination in *Cymbidium dayanum* Reichb. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 46, 71-74.
- Clements, M.A., Muir, H., Cribb, P.J., 1986. A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew. Bull*, 41 (2), 437-445.
- Copeland, L.O., McDonald, M.B., 2001. Principles of seed science and Technology. Kluwer Academic Publisher, MA. USA.
- Çağlayan, K., Özavcı, A., Eskalen, A., 1998. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaygın olarak yetişen bazı salep orkidelerinin embriyo kültürü kullanılarak in vitro koşullarda çoğaltılması. *Turkish J. Agriculture and Forestry*, 22, 187-195.
- Çığ, A., 2012. Van'da doğal olarak yetişen salep orkidelerinin simbiyotik ve asimbiyotik olarak in vitro ve in vivo ortamlarda çoğaltılması (doktora tezi) *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Van. 162.
- Davis, P.H., 1984. *Flora of Turkey and the East Aegan Islands*. Volume: 8, Edinburg University Press, Great Britain.

- Erdem, H.E., 2004. Biyolojik Çeşitliliğinin Ekonomik Değerinin Belirlenmesi, Yabani Orkide Örneği (yüksek lisans tezi). *E.Ü., Fen Bilimleri Ens.*, İzmir.
- Ernst, R., 1967. Effect of carbohydrate selection on the growth rate of freshly germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed. *American Orchid Society Bulletin* 36, 1068-1073.
- Ernst, R., Arditti, J., 1990. Carbohydrate physiology of orchid seedlings, III. Hydrolysis of maltooligo saccharides by *Phalaenopsis* (*Orchidaceae*) seedlings. *Amer. J. Bot.*, 77 (2), 188-195.
- Gezgin, Y., 2004. Çeşitli Salep (Orkide) Türlerinde Mikoriza Oluşturan Fungusların İzolasyonu ve Tanımlanması ile İnokulant Olarak Kullanım Olanaklarının İncelenmesi (yüksek lisans tezi). *E.Ü., Fen Bilimleri Ens.*, İzmir.
- Gönülşen, N., Önal, K., Ercan, N., Yıldızgördü, K., Şekeroğlu, E., Biçici, M., Eskalen, A., 1996. Ege ve Doğu Akdeniz Bölgelerinde Doğal Yayılış Gösteren *Orchidaceae* Familyasına Ait Bazı Türlerin In Vitro ve İn Vivo Koşullarda Üretimleri Üzerine Araştırmalar. TUBİTAK Proje No: TBGAG-52.
- Grabe, D.F., Peters J.A., 1998. Lactic Acid clearing of grass seeds in tetrazolium tests. *Seed Technol.* 20 (1), 106-108.
- Güler, N., 1997. Edirne Bölgesi'nde Yetişen *Orchis L.* Türleri Üzerinde Korolojik, Morfolojik, Sistemik, Karyolojik ve Palinolojik Araştırmalar (yüksek lisans tezi). *Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne.
- Gümüş, C., Sezik, E., Ellialtıoğlu, Ş., 2008. Batı Karadeniz Bölgesi'nde yetişen ve salep elde edilen bazı orkide (*Orchidaceae* sp.) türlerinin doku kültürü ile çoğaltılması üzerinde bir araştırma. *III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi*. 8-10 Kasım 2006, İzmir, 179-187.
- Hadley, G., Harvais, G., 1968. The effects of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. *New Phytol.*, 67, 441-445.
- Harvais, G., 1973. Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture. *Can. J. Bot.*, 51, 327-332. Harvais, G., 1982. An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. *Can. J. Bot.*, 60 (12), 2547-2555.
- Harvais, G., 1982. An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. *Can. J. Bot.*, 60 (12), 2547-2555.
- Harvais, G., Hadley, G., 1967. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytol.*, 66, 217-230.
- Hatipoğlu, A., 1981. Soğanlı, yumru ve rizumlu süs bitkileri, yetiştiriciliği ve sorunları. *Akdeniz Bölgesi Bahçe Bitkileri Yetiştiriciliğinde Sorunlar, Çözüm Yolları ve Yapılması Gereken Araştırma Simpozyumu*. 9-13 Nisan, İncekum, Alanya. 942-976.
- Ingold, C. T., Hudson, H.J., 1993. The biology, Sixth Edition (Chapman Hall). London, 224 .
- İşler, S., 2005. Van Salebinin Menşei ve Van Civarının Orkideleri (doktora tezi). *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Ens.*, Van.

- Karakuş, B., 2015. Bazı salep orkidelerinin in vitro ortamda çimlenme, protokorm ve bitkicik oluşumunu etkileyen faktörleri araştırılması (yüksek lisans tezi). *Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Ens.*, Kahramanmaraş.
- Kısakürek, Ş., 2011. Kahramanmaraş florasında bulunan salep orkidelerinin kültüre alınabilme olanakları. *I. Salep Orkidesi Çalıştayı*. 24-25 Mayıs, Kahramanmaraş, 23-38.
- Kreutz, C.A.J., 2000. *Flora of Turkey and East Aegan Islands*. Vol:11, University Press, Edinburgh, 656.
- Lauzer, D., St-Arnaud, M., Barabe, D., 1994. Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 32 (6), 408-412.
- Mead, J.W., Bulard, C., 1975. Effects of vitamins and nitrogen sources on asymbiotic germination and development of *Orchis laxiflora* and *Ophrys sphegodes*. *New Phytologist*, 74 (1), 33-40.
- Michl, J., 1988. Standardizovaná metoda množení evropských orchidejí semeny II. *Živa*, 3, 89-91.
- Mitchell, R.B., 1989. Growing hardy orchids from seeds at Kew., *The Plantsman* 2 (3), 152-169.
- Miyoshi, K., Mii, M., 1998. Stimulatory effects of sodium and calciumhypochlorit, prechilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed in vitro. *Physiologia Plantarum*, 102 (4), 481-486.
- Oliva, A.P., Arditti, J., 1984. Seed germination of North American orchids. II. Native California and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium* and *Spiranthes*. *Bot. Gaz.*, 145 (4), 495-501.
- Ortaş, İ., 2011. Orkide mikorizasının bitki çimlenmesi ve gelişmesi üzerine etksi I. *Salep Orkidesi Çalıştayı*. 24-25 Mayıs, Kahramanmaraş, 39-64.
- Önal, K., 1999. Ege Bölgesi'nde doğal yayılış gösteren *Orchidaceae* familyasına ait bazı türlerin in vitro koşullarda üretimleri üzerinde araştırmalar. *Turkish J. Agriculture and Forestry*, 23 (5), 1057-1064.
- Özdener, Y., 1994. *Dactylorhiza urvilleana* (Steudel) Bauman ve Künkele ve *D. iberica* (Bieb. Ex Willd) Soo (*Orchidaceae*) Türlerinin Köklerinden Fungusların İzole Edilmesi, Bu Türlerle Ait Tohumların Simbiyotik ve Asimbiyotik Kültür Ortamlarında Çimlenme ve Gelişmesi Üzerinde Bir Araştırma (doktora tezi). *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Samsun.
- Özkoç, İ., 1991. *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Briq. subsp. *laxiflora* (Soo) Gözl et. Reinhard ve *Orchis laxiflora* Lam. (*Orchidaceae*) Tohumlarının Simbiyotik ve Asimbiyotik Kültürlerde Çimlenme ve Gelişmesi Üzerinde Araştırılması (doktora tezi). *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Samsun.
- Özkoç, İ., Dalcı, M., 1991. Bazı orkide türlerine ait tohumların çimlenmesi üzerine yüzeysel sterilizasyonda kullanılan sodyum hipokloritin etkisi. *Ondokuz Mayıs Üniv. Fen Dergisi*, 3 (1), 116-122.
- Paek, KY., Hahn, EJ, Son SH 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation system of plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 37 (2),149-157.

- Pedroso, M.C., Pais, M.S., 1992. Minituber production from immature seed suspension culture of *Orchis papilionaceae*. *In vitro Cellular Developmental Biology*, 28, 183-186.
- Pierik, R.L.M., 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants, 149-158.
- Ponert, J., Vosolsobě, S., Kmecová, K., Lipavská, H., 2011. European orchid cultivation-from seed to mature plant. *European Journal of Environmental Sciences*, 1 (2), 95-107.
- Rasmussen, H., Andersen, T.F., Johansen, B., 1990. Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant Cell and Environment*, 13, 171-177.
- Rasmussen, H.N., 1995. Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Ruglup, A., Chavez, V., Martinez, A., 1989. *In vitro* seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana*, 4 (2), 68-73.
- Sarı, A.O., Tutar, M., Çiçek, F., 2011. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü salep üretim çalışmaları. I. *Salep Orkidesi Çalıştayı*. 24-25 Mayıs, Kahramanmaraş, 65-86.
- Sazak, A., 2004. Bazı Orkide Türlerine Ait Tohumların Simbiyotik ve Asimbiyotik Olarak Çimlendirilmesi ve Fide Gelişimi (yüksek lisans tezi). *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Samsun.
- Sazak, A., Ozdener, Y., 2006. Symbiotic and asymbiotic germination of endangered *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. and *Dactylorhiza osmanica* (Kl.) Soó var. *osmanica* (endemic). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9 (12), 2222-2228.
- Sezik, E., 1984. *Orkidelerimiz, Türkiye'nin Orkideleri*. Sandoz Kültür Yayınları, No: 6, 166.
- Sezik, E., 2002. *Acta Pharmaceutica Turcica*. 44, 151-157.
- Smreciu, E.A., Currah, R.S., 1989. Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana*, (1) 4, 6-16.
- Snow, R., 1985. Improvements in methods for the germination of orchid seeds. *Amer. Orch. Soc. Bull.*, 54 (2), 178-181.
- Stewart, S.L., Kane, M.E., 2006. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86 (2), 147-158.
- Süberoğlu, N., 1987. Saleplerin Tohumla Üretilmeleri (yüksek lisans tezi). *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir.
- Tekinşen, K.K., 2006. Salep. *Bilim ve Teknik*. (453), 76-77.
- Valletta, A., Attore, F., Bruno, F., Pasqua, G., 2008. *In vitro* asymbiotic germination of *Orchis mascula* L. *Plant Biosystems*, 142 (3), 653-655.
- Van Waes, J.M., Debergh, P.C., 1986. *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiol Plant.*, 67 (2), 253-261.
- Warren, R., 1981. Sowing the seed, Part II. *Orchids from seed*. The Orchid Review, Vol. 89, No. 1051, 149-151.

- Wotavová-Novotná, K., Vejsadová, H., Kindlmann, P., 2007. Effect of sugars and growth regulators on in vitro growth of *Dactylorhiza* species. *Biologia Plantarum*, 51 (1), 198-200.
- Yang, JF., Piao XC, Sun D, Lian ML 2010. Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration in vitro of *Oncidium* 'Sugar Sweet'. *Scientia Horticulture* 125 (4), 712-717.
- Yararbaş, R.T., 2008. Bazı Orkide Türlerinin In Vitro Koşullarda Çoğaltılması, Çiçeklenmesi (doktora tezi). E.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir.
- Young, PS., Murthy HN, Paek, KY., 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 63 (1), 67-72.
- Url-1<<http://www.sorgun.org/phpBB2/viewtopic.php?t=1179>>, [Ziyaret Tarihi: 13.08.2007].
- Url-2 <<http://royalbotanicgarden.org/plants/orchis-sancta-holy-orchid>>, [Ziyaret Tarihi: 26.07.2016].



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hamiyet BOZDEMİR
Doğum Yeri ve Tarihi : Doğubayazıt - 20.05.1988
Telefon : 05433820071
E-posta : hamiyetbzdmr@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı,	İlçe,	İl	Bitirme Yılı
Lise	: Kenan Evren	Konak	İzmir	2005
Üniversite	: Yüzüncü Yıl	Tuşba	Van	2013