



**ANADOLU'DA YETİŞEN SALEP ORKİDESİ
TOHUMLARININ İMMOBİLİZE EDİLEREK
ÇİMLENEBİLİR HALE GETİRİLMESİ
HATİCE NUR GİRĞİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
PROF. DR. İSA KARAMAN
Haziran - 2018
Her hakkı saklıdır**

**T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ANADOLU'DA YETİŞEN SALEP ORKİDESİ
TOHUMLARININ İMMOBİLİZE EDİLEREK
ÇİMLENEBİLİR HALE GETİRİLMESİ**

HATİCE NUR GİRGIN

**TOKAT
Haziran - 2018**

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;


**Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
2016/83 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Hatice Nur GİRGIN tarafından hazırlanan "Anadolu'da Yetişen Salep Orkidesi Tohumlarının İmmobilize Edilerek Çimlenebilir Hale Getirilmesi" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 11 HAZİRAN 2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çekluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Danışman
Prof. Dr. İsa KARAMAN
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Üye
Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Üye
Dr. Öğr. Gör. Uğur TUTAR
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

İmza



ONAY

Prof. Dr. Ebubekir ALTUNTAS
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

09.07.2018

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

HATİCE NUR GİRĞİN

11 Haziran 2018

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANADOLU'DA YETİŞEN SALEP ORKİDESİ TOHUMLARININ İMMOBİLİZE EDİLEREK ÇİMLENEBİLİR HALE GETİRİLMESİ

HATİCE NUR GİRGİN

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İSA KARAMAN

Orchidaceae familyası, dünyadaki en zengin çiçekli bitki grubunu oluşturmaktadır. Ülkemizde 24 cinse ait 170 takson orkide türü doğal olarak yetişmektedir. Özellikle salep elde edilen orkideler, aşırı otlatma ve yoğun sökümden dolayı tehdit altındadırlar. Bu çalışmada; ülkemiz Anadolu topraklarında doğal olarak yetişebilen salep orkidelerinin Tokat Canpolat Köyü civarında yetişmekte olanlarının oluşturdukları tohumların organik materyallerle immobilizasyonu ile doğal ortamlarında çimlenebilir hale getirilmesi amaçlanmıştır. Literatürde var olan çalışmalar tohumların bitki kültüründe ve spesifik besin ortamlarında büyütülmesi yönündedir. Gerçekleştirilen çalışmada orkide tohumlarına sükroz, fruktoz, glukoz, laktoz, mannitol, nişasta, melas ve zeytin karasuyu bileşiklerinin immobilizasyonu ile tohumlarda eksik olan endosperm dokunun yerini alması beklenmiştir. Ayrıca salep orkidesi tohumları 7 farklı kimyasal muamelesiyle orkide embriyoları etrafındaki kalın tohum kılıfının inceltilmesi ve dolayısıyla immobilize edilen karbonhidrat kaynaklarından daha iyi faydalanması hedeflenmiştir. Denemeye alınan tüm gruplara ait tohumlar vermikompost içerisine ekilmiştir ve çimlenmeleri için optimum sıcaklık ve nem koşullarında 4-5 ay beklemeye bırakılmıştır. Denemeler sonucunda, deneye dâhil edilen tüm gruplar için ne bir çimlenme ne de bir protokorm oluşumu gözlemlenmemiştir.

2018, 58 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Salep, Orkide, İmmobilizasyon, Çimlenme

ABSTRACT

MASTER THESIS

IMMOBILIZING SEEDS OF SALEP ORCHID GROWING IN ANATOLIA TO MAKE THEM GERMABLE

HATİCE NUR GİRĞİN

**TOKAT GAZİOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

SUPERVISOR: PROF. DR. İSA KARAMAN

Orchidaceae family is the richest flowering plant group in the world. In our country, 170 taxa orchid species of 24 genus are naturally grown. Orchids, especially those obtained from salep, are threatened by overgrazing and intensive dissolution. In this study; it is aimed to make the seeds of the salep orchids that grow naturally in the Anatolian lands of our country growing in the vicinity of Tokat Canpolat Village to be germable in the natural environment by immobilizing them with organic materials. Studies in the literature suggest that seeds are grown in plant culture and in specific nutrient media. In the study, it was expected that the orchid seeds would be immobilized with sucrose, fructose, glucose, lactose, mannitol, starch, molasses and olive barley compounds and the endosperm tissue missing in the seeds. In addition, salep orchid seeds are intended to be thinned around the orchid embryos with 7 different chemical treatments and thus benefitting better from the carbohydrate sources immobilized. The seeds of all the groups in the experiment were planted in vermicompost and left to stand for 4-5 months under optimum temperature and humidity conditions for germination. As a result of the experiments no germination or no protocorm formation was observed for all the groups included in the experiment.

2018, 58 PAGE

KEYWORDS: Salep, Orchid, Immobilization, Germination

ÖNSÖZ

Çalışmamın başından sonuna kadar gerek örnek toplama gerekse laboratuvar çalışmalarım boyunca desteklerini hiç esirgemeyen Sayın danışman hocam Prof. Dr. İsa KARAMAN' a içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca TLC çalışmalarım için desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kıymet BERKİL AKAR'a, her konuda desteklerini esirgemeyen Sayın Bölüm Başkanımız Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye ve diğer tüm bölüm hocalarıma ve tez çalışmam boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Halime SEYMAN, Şule İNİŞ, Rabiye KARADAŞ, Merve GÜÇÇÜK, Beyza Hilal ALAGÖZ ve Emre TUNÇ'a teşekkür ederim. Ayrıca çalışmama maddi manevi destek sağlayan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kurumuna teşekkür ederim.

Bana hayatım boyunca verdikleri destek sevgiyle her zaman yanımda olan sevgili anne ve babama, her koşulda maddi manevi desteğini esirgemeyen abime gösterdikleri sabır ve verdikleri güçten dolayı teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 2013/83 No' lu "Anadolu'da Yetişen Salep Orkidesi Tohumlarının İmmobilize Edilerek Çimlenebilir Hale Getirilmesi" projesi tarafından desteklenmiştir.

HATİCE NUR GİRGIN

Haziran-2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER 4	
2.1 Salep Orkideleri	4
2.1.1 Kimyasal Yapısı	5
2.1.2 Salep Elde Edilen Bölgeler.....	6
2.1.3 Salep Elde Edilişi.....	7
2.1.4 Orkidelerin Tahribi.....	8
2.1.5 Salep Orkidelerine İlişkin Yapılan Araştırmalar	10
2.2 Vermikültür ve Vermikompost	16
2.2.1 Vermikompostun Tarım ve Toprak Üzerine Etkileri	17
2.3 İmmobilizasyon	18
2.3.1 Taşıyıcıya bağlama metodu	19
Kovalent bağ oluşturulması	19
İyonik bağlanma.....	20
Adsorpsiyon (kovalent olmayan ilişkiler).....	20
Biyospesifik Bağlama Metodu.....	20
2.3.2 Çapraz bağlama	21
2.3.3 Hapsetme (Entrapment).....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1 Materyal	23
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Tohumlar.....	23
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Vermikompost	24
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Diğer Malzemeler	24
3.2 Yöntem	24
3.2.1 Bitki Tohumlarının Toplanması	24
3.2.2 Çalışmada Kullanılan Tohumların Hazırlanması	25
Grup 1 Ön Muamele İşlemi	25
Grup 2 Ön Muamele İşlemi	25

Grup 3 Ön Muamele İşlemi	25
Grup 4 Ön Muamele İşlemi	26
Grup 5 Ön Muamele İşlemi	26
Grup 6 Ön Muamele İşlemi	26
Grup 7 Ön Muamele İşlemi	26
3.2.3 Tohumların İmmobilizasyonu	27
Sükrozlu Tohum İmmobilizasyonu.....	27
Fruktozlu Tohum İmmobilizasyonu	28
Glukozlu Tohum İmmobilizasyonu	29
Laktozlu Tohum İmmobilizasyonu.....	29
Mannitollü Tohum İmmobilizasyonu	30
Nişastalı Tohum İmmobilizasyonu	31
Melaslı Tohum İmmobilizasyonu	32
Zeytin Karasuyu(OMW) ile Tohum İmmobilizasyonu	32
Zeytin Karasuyu(OMW) ve Glukoz ile Tohum İmmobilizasyonu	33
Kontrol Grubu için Tohum İmmobilizasyonu	34
3.2.4 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC).....	35
3.2.5 İmmobilize Tohumların Ekimi	36
4. BULGULAR	38
4.1 İmmobilizasyon İşleminin Sonuçları	38
4.2 Beadlerin Vermikompostta Erime Süresi	42
4.3 İmmobilizasyon Başarısının TLC ile Belirlenmesi.....	43
4.4 İmmobilize Edilmiş Salep Tohumlarının Çimlenme Performansı	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
6. KAYNAKLAR.....	51
7. ÖZGEÇMİŞ.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C

Ca

CaCl₂

cm

H₂SO₄

g

K

kg

m

mg

ml

mm

Mn

N

N

Na

NaClO

P

pH

rpm

TL

Zn

Açıklama

Celsius Derece

Kalsiyum

Kalsiyum Klorür

Santimetre

Sülfirik Asit

Gram

Potasyum

Kilogram

Metre

Miligram

Mililitre

Milimetre

Manganez

Normalite

Azot

Sodyum

Sodyum Hipoklorit

Fosfor

Asitlik Derecesi

Dakikadaki Devir Sayısı

Türk Lirası

Çinko

Kısaltmalar

BAP

CITES

Açıklama

6-Benzil Amino Pürin

Convention on International
Trade in Endangered Species
of Wild Fauna and Flora

IAA
GA3
TLC
VWD

İndol Asetik Asit
Gibberellik Asit
Thin Layer Chromatography
Van Waes-Debergh Ortamı



ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1. Salep orkidesi ve salep orkidelerinden toplanan tohumlar	22
Şekil 3.2. Salep orkidesi tohumlarının mikroskop görüntüleri (100x)	22
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan vermikompost örnekleri	23
Şekil 3.4. İmmobilizasyon işleminde kullanılan çözeltiler ve immobilizasyon işlemi	26
Şekil 3.5. TLC işlemi	34
Şekil 3.6. Ekim işleminin gerçekleştirilme şekli.	36
Şekil 3.7. Ekim işlemi gerçekleştirilip etiketlenmiş bardaklar.	36
Şekil 4.1. Ön işlemde geçirilmemiş tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler	37
Şekil 4.2. Ön işlemde geçirilmiş 1. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler	38
Şekil 4.3. Ön işlemde geçirilmiş 2. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.	38
Şekil 4.4. Ön işlemde geçirilmiş 3. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.	39
Şekil 4.5. Ön işlemde geçirilmiş 4. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.	39
Şekil 4.6. Ön işlemde geçirilmiş 5. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.	40
Şekil 4.7. Ön işlemde geçirilmiş 6. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.	40
Şekil 4.8. Ön işlemde geçirilmiş 7. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.	41
Şekil 4.9. İmmobilizasyonla oluşturulmuş beadler ve üzerlerinde görünen siyah noktalar salep tohumları.	41
Şekil 4.10. Kontrol grupları için immobilizasyonla oluşturulmuş beadler ve üzerlerinde görünen siyah noktalar salep tohumları	42
Şekil 4.11. İmmobilizasyonla oluşturulmuş beadlerin parçalanmasıyla görülen salep tohumu	42
Şekil 4.12: TLC sonunda elde edilen görüntüler	45

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Sandal Erzurumlu ve Doran (2011)'a göre Türkiye'de salep elde edilen orkide cins ve türler.....	5
Çizelge 4.1. Beadlerin 14 gün içinde vermikompost içinde çözünme durumları.....	43
Çizelge 4.2. İmmobilize tohumların çimlenme durumları.....	46



1. GİRİŞ

Ülkemiz var olan endemik bitki türü sayısı ile oldukça zengin bir ülkedir. Ancak ekonomik değeri nedeni ile topraktan bilinçsizce toplanan türlerin birkaçı nesillerinin tükenmesi tehdidi ile karşı karşıyadır. Milli gelirden en az payı alan orman köylüsü için, odun dışı orman ürünü niteliğindeki salep bitkisinin toplanması ve ticareti önemli bir gelir kalemini teşkil etmektedir. Bu sebeple, ticareti yapılan ancak kültür çalışmaları hâlihazırda hala devam eden birçok bitki gibi, salep bitkisi de uluslararası sözleşme ve yerel mevzuat tedbirine rağmen tehdit altındadır. *Orchidaceae* familyasının tüm türleri, nadir ve nesli tükenmekte olan yabancı bitki ve hayvan türlerinin Kırmızı Listesinde yer almaktadır (Sgarbi ve ark., 2001).

Orkideler, çok sayıda, toza benzer ve konik şekilli tohumlar üretmektedir. Her bir orkide kapsülü milyonlarca tohum içermektedir. Bu tohumlar şeffaf bir tohum kabuğu ile kaplıdır ve embriyo etrafında bir endosperm doku mevcut değildir. Orkide tohumlarının endosperm içermemesinden dolayı dışarıdan bir karbonhidrat kaynağı sağlanmadıkça çimlenmenin gerçekleşmesi mümkün değildir (Ingold ve Hudson, 1993). Endosperm bulunmayan tohumlarda embriyolar canlılıklarını çok hızlı kaybetmekte ve doğal ortamda sadece %5'ten daha azı çimlenebilmektedir. Salep bitkisinde çimlenmenin ilkbaharda, yaz mevsiminin ilk günlerinde, ağustos ayında, kışın ilk zamanlarında olduğu belirlenmiştir. Çimlenen tohumdan yumru ve yapraklar uzun zaman sonra meydana gelir. İlk yumrunun *Spiranthes aestivalis* türünde 9 yılda, ilk çiçeğin *Neottia* türlerinde 9-12 yılda olduğu bildirilmiştir (Sezik, 1984). Laboratuvar şartlarında orkide tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişimi sağlansa da tohumdan gelişen bitkilerin sökülecek olgunluğa erişmesi çok uzun zaman almaktadır. Salep türlerinden elde edilen yumruların, toprağa şaşırtılmasında en uygun zamanın Eylül – Ekim ayları olduğunu belirlenmiştir. Çimlenmeden sonra olgun bitki meydana gelebilmesi için 2-16 yıl gibi uzun bir süre beklemek gerekmektedir. Bitkinin yumruları yılda sadece tek bir yeni yumru meydana getirmekte ve yeni yumru geliştikçe eski yumru buruşmaktadır. Doğada birden fazla yumru verme yeteneği olan *Serapias vomeracea* Brig., *Orchis sancta* L. türleri besin maddeleri ve organik maddece zengin

fide toprağı olarak nitelendirilen ortamlara dikildiklerinde 2-3, hatta bazılarında 5-6 yeni yumru meydana getirdikleri tespit edilmiştir.

Özellikle salep elde edilen orkideler, aşırı otlatma ve bitkinin yoğun sökülümünden dolayı büyük tehdit altındadır. Salep elde edilmesi için sökülen yumrular, bir sonraki yıl yumru geliştirememekte ve çiçekleri ile birlikte söküldüğü için tohumlarını kaybetmektedirler. Bu nedenle özellikle salep orkidelerinin çimlenip fide haline gelmesi ve yaşamlarına devam edebilmesi büyük önem taşımaktadır. Günümüzde, bu konu ile ilgili, özellikle koruma ve kültüre alma çalışmaları yapılmaktadır. Kültüre alma çalışmaları yapılırken, orkidelerin doğal yaşam alanları analiz edilmekte, özellikle yetiştikleri toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri ile mikrobiyolojisi belirlenmektedir. Bu özelliklerin belirlenmesi, orkidelerin kültüre alınmasında büyük fayda sağlamaktadır. Toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri, tohumların çimlenme aşamasında sağladığı fiziki şartlar ile besin ihtiyacının karşılanmasında; çimlenme ve fide oluşturduktan sonra yumru iriliğinin oluşmasında hem doğrudan hem de dolaylı yoldan etkili olmaktadır (Parlak ve Tutar, 2011).

Bitki topluluklarının büyük çoğunluğu endo ve ekto mikoriza olmak üzere iki büyük mikoriza grubu tarafından enfekte edilmektedir. Orkide tohumları çok küçüktür ve besin dokuları olmadığından, yaşayabilmek için bir toprak mikorizası ile ortak yaşama girmek zorundadırlar. Dolayısıyla direkt olarak bir tohum ekimi ve bitki gelişimi gözlemlenmemektedir.

Salep üretimi için 1 kg kuru yumru elde etmek için doğadan sökülmesi gereken yumru (bitki) sayısının 1000-4000 adet arasında değiştiği belirlenmiştir. İç tüketime konu edilen salep miktarının 20-45 ton arasında olduğu, bunun içinde yaklaşık olarak 40 ile 180 milyon adet bitkinin toplandığı tahmin edilmektedir. Salebin ilk toplayıcıları, topladıkları 1 kg yaş ürünü 10-15 TL'den tüccara satmaktadırlar. Kuru salebin pazardaki kg fiyatı 400 TL'ye kadar çıkmaktadır.

Salep üretiminde kullanılan orkide türlerinin toplanması ve ticaretine dönük önlemler kapsamında yapılan hukuki düzenlemeler sonucunda; salep yumrusu, ihracı yasak bir ürün haline gelmiştir. Ancak doğadan toplanmasına yönelik yasak sadece ormanlık

alanlar için geçerli olmuştur. Orman rejimi dışındaki alanlardan toplanmasına dönük herhangi bir hukuki hüküm ve yaptırım bulunmamaktadır.

Günümüze kadar salep orkideleri üzerine yapılmış onlarca bilimsel çalışmaya rağmen ekonomik anlamda, geniş alanlarda tarımsal faaliyete dönüşebilecek kültürü yapılamamıştır. Ancak bazı salep türlerinin yumru verimini arttıracak yöntemlerle muamele edilmesi sonucunda yumru sayısının arttığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, toprak içeriğinin gübre kullanımı ile zenginleştirilmesi sonucunda, tohumdan çimlenmelerin arttığı gözlemlenmiştir (Gümüş, 2009).

Bu çalışmada; ülkemiz Anadolu topraklarında doğal olarak yetişebilen salep orkidelerinin Tokat Canpolat Köyü civarında yetişmekte olanlarının oluşturdukları tohumların organik materyallerle immobilizasyonu ile doğal ortamlarında çimlenebilir hale getirilmesi amaçlanmıştır. Tohumda hali hazırda eksik olan endosperm, tohumun normal şartlarda çimlenmesi için yetersiz kalmakta ve tohumdaki embriyo canlılığını sürdürememektedir. Literatürde var olan çalışmalar tohumların bitki kültüründe ve spesifik besin ortamlarında büyütülmesi yönündedir. Bu çalışma ile orkide tohumlarına yapılacak farklı karbonhidrat bileşiklerinin immobilizasyonu ile tohumlarda eksik olan endosperm dokunun yerini alması ve doğal ortam şartlarında embriyonun çimlenmesini sağlanması beklenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER

2.1 Salep Orkideleri

Taksonomik olarak monokotiledonlar içinde sınıflandırılan orkideler, *Orchidaceae* familyasına ait olup yaklaşık 600-800 cins ve 30-35 000 kadar türü içermektedir, son araştırmalara göre familyaya 9 cinse ait 46 türün daha katıldığı bildirilmiştir (Aytaş, 1994; Kreutz, 2000). Dünya’da orkide denildiğinde gösterişli çiçeklere sahip “ılıman kuşak orkideleri” ile özellikle ülkemizde salep elde edilmesinde kullanılan “karasal orkideler” (terrestrial orchids) akla gelmektedir. Ülkemizde doğal alanlarda yetişen karasal orkideler daha küçük çiçeklere sahiptir. Yurdumuzda %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 (Sezik, 2002); Van ve çevresinde 36 adet orkide türünün doğal olarak yetiştiği bildirilmektedir (İşler, 2005). Yumrulu bitkilerin çoğunlukla birbirine yapışık ve iki adet olarak bulunduğu, bitki geliştikçe yeni yumrunun da geliştiği ve yeni bitkinin çiçekli haldeyken kazılıp toplanarak salep elde edildiği belirtilmektedir. Orkide türlerinde çimlenmeden sonra yaprak ve yumru oluşumunun uzun yıllar aldığı ve en kısa ortalamanın 4 yıl olduğu bildirilmiştir. İlk yaprak oluşumunun *Orchis*, *Ophrys*, *Dactylorhiza* ve *Listera* türleri için ortalama 4 yıl, *Epipactis* ve *Cephalanthera* türleri için 2-3 yıl, ilk yumrunun *Spiranthes aestivalis* türünde 9 yıl, ilk çiçeğin *Neottia* türlerinde 9-12 yılda oluştuğu bildirilmiştir (Sezik, 1984).

Salep bitkisi genellikle iki yumruya sahiptir ve birçok türde her yıl tek bir yavru yumru meydana getirmektedir. Yeni yumru gelişirken eski yumru ise buruşup, yeni yumrunun yanında ona yapışık ve içi boşalmış halde kalmaktadır. Gelecek yılın bitkisini oluşturacak olan bu taze yumru, bitkiler çiçekli iken salep yapımı için toplanmaktadır. Bitkiler çiçekli iken sökümlerin yapılması ile bu bitkilerin tohumla çoğalmasına engel olunmaktadır. Yumrular yaş iken ortalama 4 g ağırlığa sahip olduklarından 1 kg yumru elde etmek için 250 orkidenin sökümleri gerekmektedir. Yapılan araştırmalarda

Türkiye’de bulunan 9 cinse ait 25 orkide türünden salep elde edildiği bildirilmiştir (Sandal Erzurumlu ve Doran, 2011) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1: Sandal Erzurumlu ve Doran (2011)’a göre Türkiye’de salep elde edilen orkide cins ve türler

	Cins	Türler
1	<i>Aceras</i>	<i>A. anthroporum</i>
2	<i>Anacamptis</i>	<i>A. pyramidalis</i>
3	<i>Barlia</i>	<i>B. robertiana</i>
4	<i>Dactylorhiza</i>	<i>D. iberica, D. osmanica</i>
5	<i>Himantoglossum</i>	<i>H. affine</i>
6	<i>Ophrys</i>	<i>O. bombyliflora, O. ferrumequinum, O. fusca</i>
7	<i>Orchis</i>	<i>O. anatolica, O. coriophora, O. italica, O. laxiflora, O. morio, O. pallens, O. palustris, O. pinetorum, O. provincialis, O. purpurea, O. sancta, O. simia, O. spitzelii, O. tridentata</i>
8	<i>Serapias</i>	<i>S. vomeracea</i>
9	<i>Neotinea</i>	<i>N. maculata</i>

2.1.1 Kimyasal Yapısı

Salebin bileşimi, hem coğrafyaya hem de toplandığı döneme bağlı olup türlere göre değişim göstermektedir. Salebin kaliteyi belirleyen ve etkili en önemli bileşeni; stabilizasyon, kıvam arttırıcı ve koyulaştırıcı özelliğine sahip glukomannandır. Salep yaklaşık %16-55 glukomannan, %2.7 nişasta, %12 nem ve %2.4 mineral madde içerir. Bir başka kaynağa göre salebin bileşiminde %48 müsilaj, %1 şeker, %2.7 nişasta, %5 azotlu madde ve taze haldeyken eser miktarda uçucu yağ bulunmaktadır. Salebin

bileşiminde yer alan %2 düzeyindeki külü, büyük ölçüde potasyum ve kalsiyum fosfat klorürlerden oluşturmaktadır (Tamer ve ark., 2006; Sezik ve Baykal, 1988; Doğan ve Kayacıer, 2004; Sezik, 1984; Telcioğlu ve Kayacıer, 2007).

Glukomannanlar birçok bitkinin kök, soğan ya da yumrularında bulunan bir hidrokolloiddir (Vahid ve ark., 2011). Yapılarını glikoz ve mannozun β (1-4) bağı ile birleşmesi sonucu oluşan bir polisakkarit zinciri yapmaktadır. Ancak birleşme oranları glukomannanın elde edildiği kaynağa göre farklılık göstermektedir. Kendi ağırlığının 50 katı kadar su absorblayabilen glukomannanlar, bilinen en viskoz diyet liflerden kabul edilmektedir (Keithley ve Swanson, 2005). Bu özellikleri sayesinde gıda endüstrisinde jelleştirici, kıvam arttırıcı, film yapıcı ve emülsifiye edici olarak geniş kullanım alanına sahip oldukları bildirilmektedir (Farhoosh ve Riazi, 2007). Salep glukomannanı, 3 mol mannoz ve 1 mol glikozun birbirine β (1-4) bağı ile bağlanması ve polimerleşmesi sonucu meydana gelmektedir (Chen ve ark., 2005). Bu madde süt ve su ile şişer ve viskoz bir çözelti sağlar. Salebe orijinal kıvamını veren ve Maraş dondurmasına erimeyi geciktirme ve sertlik özelliği meydana getiren bileşik, salep içinde bulunan glukomannanlardır (Sezik, 1984; Arı, 2000). Yararlı etkileri bulunan ve ticari önemi olan salebi elde etmek için önüne geçilemeyen bir söküm problemi vardır. Salep yumrulu orkidelerden, daha çok *Anacamptis*, *Orchis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Himantoglossum*, *Barlia* gibi ovoit yumrulu olanlar *Dactylorhiza* gibi parçalı yumruluların bazı türlerinden üretilmektedir. Toplanan her yumru ile sonraki yıl meydana gelecek bitki ve bu bitkinin üreteceği çok sayıdaki tohumun meydana gelmesi engellenmektedir. Sezik'e (1984) göre yumrular taze iken 2-7 gram ağırlığındadır. Ortalama 4 gram olarak düşünüldüğünde 1 kg yumru için 250 kadar orkidenin sökümü gerekmektedir. 1 kg salep üretmek için yaklaşık 1 000-4 000 yumruya gerek vardır.

2.1.2 Salep Elde Edilen Bölgeler

Orchidaceae botanikte en büyük ve en çeşitli çiçekli bitki familyası olarak bilinir. Bu familya içinde yaklaşık 900 cins ve 20 000 türün tanımlandığı ve her yıl artarak tür sayısının 30 000'e kadar çıkabileceği bildirilmiştir. Tüm dünyada orkideler belirli bir bölge gözetmeden yayılış gösteren bir familyadır (Sandal, 2009). Dünya üzerinde

kutuplar ve gerçek ölller dışında deniz seviyesinden itibaren 5 000 m yükseltiye kadar orkide türleriyle karşılaşılabilir (Bozyel, 2014).

Türkiye’de yaygın olarak salep elde edilen 4 bölge mevcuttur, ayrıca sınırlarımızın olduğu ülkelerden gelen salepler de bulunmaktadır. Türkiye de salep türlerinin yetişme ortamları genel hatları ile ormanlık, makilik, çayırılık, zeytinlik ve tarım alanlarıdır. Ağırıklı olarak koyu gölge olmayan, orman ve maki içi açıklıklarda yayılır, ışık ihtiyacı yüksek değildir. Gölgeyi seven bir bitkidir. Salep orkidelerinin en yaygın bulunduğu bölgeler; Kuzey Anadolu (Kastamonu, Sinop), Güney Anadolu (Muğla, Antalya, Silifke), Güneydoğu Anadolu, (Kahramanmaraş, Gaziantep, Hatay) ve Doğu Anadolu (Elazığ, Van, Muş, Bitlis)’dur. Bu bölgelere ilaveten Yozgat, Çankırı ve Çorum’dan da salep elde edildiği, salep piyasasının merkezinin ise Burdur’un Bucak ilçesi ile Siirt ili olduğu bildirilmiştir (Arslan, 2011).

2.1.3 Salep Elde Edilişi

Salep elde edilmesi işlemi genel olarak 3 başlık altında toplanabilmektedir. Bu işlemler sırasıyla salep yumrularının toplanması, yumruların kaynatılması ve kurutulması şeklindedir.

Yumruların toplanması: Orkideler genellikle 2 yumru taşır. Birinin önceki, diğerinin ise yeni yıla ait olduğu bilinmektedir. Salep üretilirken yeni yıl çıkan yumru kullanılmaktadır. Yumruların toplanma işlemi bitki çiçekli iken, yani Nisan-Mayıs aylarında veya bazen taban yaprakları belirgin hale geldiğinde yapılmaktadır. Salep toplayıcılar, küçük bir çapa veya kürek ile bitkinin yumrularını topraktan çıkarmakta, bitkiye bağlı olan genç yumruyu almakta ve geri kalan kısımları bir kenara atmaktadırlar. Yumrular üzerlerindeki topraktan kısmen temizlenmektedir.

Yumruların kaynatılması: Yumrular ilk olarak üzerindeki kir ve topraklar kalmayınca kadar soğuk su ile yıkanmaktadır. Bu yıkama işlemi sırasında salebe karışan yabancı kökler ve eski yumrular su üstüne çıkmakta, bunlar atılmaktadır. Temizlenen yumrular sepetlere ayrılmaktadır. Diğer taraftan, büyük kazanlarda su kaynatılmaktadır. Su tamamen kaynatıldıktan sonra toplanan ve yıkanan yumrular, suyun içine daldırılır.

Suyun kaynaması durmakta, su tekrar kaynamaya başlayınca bir müddet daha beklenmektedir (ortalama 10 dakika kaynar suda tutulmaktadır), sonra sepet çıkarılmakta ve hemen diğer bir kazanda bulunan soğuk suya daldırılmaktadır. Kaynatmanın esas amacı yumruların gelişmesini durdurmaktır. Kaynatılmayan yumrulara bahar aylarında enzimatik faaliyet başlamakta ve yeni bir orkide meydana gelebilmektedir. Ayrıca kaynatma işlemi yapılmazsa salebin kendine özgü aroması oluşmamaktadır. Kurutma işlemine geçilmeden önce kaynatma ile yumuşayan yumrunun dış katmanı soyulmaktadır.

Yumruların kurutulması: Kurutma işi daima açık havada ve bol güneş altında yapılmaktadır. Kaynatılmış yumrular kilim veya çarşaflar üzerinde, çatılarda veya bahçelerde ya ipe dizilerek ya da dizilmeden kurutulmaktadır. Kurutma işi, yumrunun dış ile kesilmeyecek bir sertliğe gelene kadar devam etmektedir (Baytop ve Sezik, 1968).

2.1.4 Orkidelerin Tahribi

Türkiye, dünyadaki en büyük salep üreticisi konumundadır. Bu nedenle her yıl 45 ila 180 milyon civarında orkide yumrusu doğadan toplanmaktadır (Kreutz, 2009). Türkiye'den salep ithal eden ülkelerin başında Almanya, Hollanda ve Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti yer almaktadır. Daha az miktarlarda ithalat yapan ülkeler ise İsviçre, Avusturya, Suudi Arabistan, İngiltere, Bulgaristan, İsrail, Libya, Romanya, Rusya, Azerbaycan, Birleşik Arap Emirlikleri ve Danimarka'dır (Kasperek ve Grimm, 1999).

Rakamlara göre ihracatın bazı yıllarda 15 tona kadar çıktığı görülmektedir. Bu veya daha az sayıdaki orkidenin her yıl salep elde edilmek amacıyla toplanması ve hızlı şehirleşme orkidelerin neslinin tükenme aşamasına gelmesine neden olmaktadır. Avrupa ülkelerinde orkide dernekleri kurulmuş ve orkideler koruma altına alınmıştır. Türkiye'de ise salep üretmek üzere her yıl milyonlarca orkidenin kökü toplanmakta ve orkideler tahrip edilmektedir (Sezik, 1984).

Türkiye'deki bu bitkiler büyük tehlike altında, hatta soyu tükenme tehlikesi ile karşı karşıyadır. Bu tehlikenin nedenlerinden biri hızlı büyüyen yapılaşma ve doğal alanların

tahribidir. Düzensiz şehirleşme, tarla alanlarını kazanmak için ormanlık ve sulak alanların bozulması ve aşırı otlatma orkidelerin varlığını tehdit etmektedir. Bütün dünyada orkideler tehlikede olan ve korunması gereken bitkiler olarak kabul edilmektedir. Salep elde edilen orkidelerin ise durumları daha da vahimdir. Yumruları devamlı sökülen orkideler bir daha tohum oluşturamamaktadır. Oluşan tohumların ise çimlenebilmeleri ise epey zordur. Denemeler göstermektedir ki, eğer bitki yumru toplanmasından ya da sökümden hemen sonra tekrar dikilirse tekrar tohum üretebilmekte ve birçok durumda eski yumruların acil durum sürgünü şeklinde yaşamını sürdürmek üzere kendisini güvence altına alabilmektedir.

Ayrıca Doğu Avrupa'nın birçok bölgesinde doğal orkide yumrularının popülaritesinin yüksek olduğu ve kesinlikle farmakolojik araştırmalara gereksinim bulunduğu, böyle çalışmalarla sentetik ürünler ortaya çıkartılabileceği ve böylece doğal orkide yumrularının yanı sıra geriye kalan doğal topluluklarının da yaşamda kalmasının sağlanabileceği belirtilmektedir (Kreutz, 2009).

Özhatay ve ark. (1997), "Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma" konulu araştırmada, Avrupa topluluğu (EC) Habitatlar Yönetmeliğini değerlendirmişler; doğal çiçek soğanları ile ilgili Yönetmeliği tartışmışlardır. Yönetmelik kapsamında her yıl ihraç edilmek üzere belirlenen çiçek soğanlarının yanı sıra doğadan toplanmaları yasak olan türlerin de bildirildiğini belirterek bunlar arasında salebe (yumru, toz) de dikkat çekmişlerdir.

Dünyada doğadan izinsiz olarak toplanan bitkiler yasa dışı yollarla iç ve dış ticarete yerini almaktadır. Dünyanın her bölgesinde yetişen orkideler de çok farklı amaçlarla doğadan toplanmakta; bazı ülkelerde "Botanik Gezileri" gibi turizmin de alet edilebildiği çeşitli yollarla izinsiz olarak toplanmakta ve pazarlanmaktadır. Dünyada artan nüfusla birlikte yerleşim alanları ve yolların daha geniş alanlar kaplaması ve sanayinin çeşitlenmesi doğal alanların tahribini artırmıştır. Doğal alanların tahrip edilmesindeki artışla birlikte belirli türlere yönelik toplama faaliyetleri beraberinde, doğanın ve doğal elemanların korunmasını da gündeme getirmiştir. Ulusal ve uluslararası boyutta çeşitli yasal düzenlemeler ortaya çıkmıştır. Türkiye'nin gerek bitki türleri ve gerekse bunların doğal yaşam ortamlarının korunması amacıyla taraf olduğu uluslararası sözleşmeler CITES, Bern ve Biyolojik Çeşitlilik sözleşmeleridir. Bunlara

ilave olarak Türkiye Avrupa Birliği'ne tam üye olmamasına rağmen EC Habitatlar Yönetmeliği hükümlerinden de dolaylı olarak etkilenmektedir. Orkide türlerinin büyük bölümünün tıbbi amaçlarla da kullanıldığı bilinmektedir. Bu nedenle orkideler, bu bitki grubu için yapılan yasal düzenlemelerden etkilenmektedir. 1973 yılında yaban yaşamını sömürden kurtarmak amacıyla bir sözleşme Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: CITES) yapılmıştır. Günümüzde yaklaşık 5 000 hayvan ve 28 000 bitki türü bu sözleşme yoluyla koruma altına alınmıştır. 12 Şubat 2008 tarihli CITES listesinde 91 orkide türünün yok olma tehdidi ile ticaretine ancak çok özel koşullarda izin verildiği, 25 284 orkide türünün de ticaretinin kontrollü yapılması gerektiği bildirilmektedir (CITES, 2009). Bu sözleşme Türkiye'nin çevre konusunda taraf olduğu uluslararası sözleşmeler içerisinde Ülkemizde 20 Haziran 1996 tarihli Resmi Gazetede yayınlanarak, 22 Aralık 1996 tarihinde 22 672 sayılı yasa ile yürürlüğe girmiştir. Bu tarihe kadar ülkemizde orkideler doğadan sökülerek serbestçe yurt dışına ihraç edilmiştir. Günümüzde ise CITES ile ilgili yönetmelikte yurt dışına yumru, toz veya başka bir şekilde satışı yasaklanmıştır. Ancak Ülkemizde salep orkidelerinin doğadan toplanarak yurt içinde ticaretinin yapılmasına bir yasak getirilememiştir.

2.1.5 Salep Orkidelerine İlişkin Yapılan Araştırmalar

Salep, yumrusu olan tüm orkide cinslerinden elde edilememektedir. En çok *Orchis*, *Anacamptis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Himantoglossum*, *Barlia* gibi ovoit yumrusu olan ve *Dactylorhiza* gibi parçalı yumrusu olan orkidelerin farklı birçok türü salep elde edilmesinde kullanılır (Sezik, 1984).

Türkiye'nin Güneybatısında birçok orkide türü bulunmakla birlikte, Akdeniz Bölgesi'nde ve Ege Bölgesi'nde özellikle Muğla civarında oldukça fazla türle karşılaşmaktadır. Ayrıca Kuzeydoğu yörelerindeki fındık bahçeleri, Akseki (Antalya) çevresinde geniş alanlı çam ormanları; Mersin'in kuzeyindeki dağlar (Arslanköy - Gözne; Mersin), Hatay'ın güneyindeki Ziyaret Dağları'ndaki meşe ormanları ile Lice ve Kulp çevresi (Diyarbakır'ın kuzeyi) çok zengin orkide çeşitliliğine ev sahipliği yapmaktadır (Kreutz, 2009).

Tekinşen ve Güner'in (2009), yaptıkları bir çalışmada ülkemizde salep elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan *Orchis* cinsi için sırasıyla *Orchis italica*, *Orchis coriophora* ve *Orchis palustris*'e ait salep yumrularının daha büyük ve ağır olduğu, *Serapias vomeracea ssp. orientalis*, *Orchis morio* ve *Ophrys mammosa*'ya ait yumruların ise nispeten daha küçük olduğunu söylemişlerdir.

Bir çeneklilerin en ünlüsü olan orkidelerin 26 000'e yakın türü ve kayıtlara geçmiş on binlerce melezi vardır. Antarktika dışındaki bütün ana karalarda dağılım gösteren orkideler, deniz seviyesinde ve deniz seviyesinden 5 000 metre yüksekliğe kadar olan rakımlarda hayatta kalabilen, 80 milyon yıllık geçmişiyle tohumlu bitkilerin en yaşlısıdır (Bozkurt, 2012).

Arditti (1967), Orkide tohumunun simbiyotik metotla çimlendirilmesinin 1921 yılına kadar tek metot olarak uygulandığını ancak bu yıl içinde Knudson'un *Cattleya Lindly*, *Laella Lindly* ve *Epidendrum Ln* cinslerine dâhil türlerin şeker ve mineral madde içeren agar ortamında herhangi bir fungus aşılamaadan çimlendirdiğini belirtmiştir. Orkide köklerinde bazı fungusları tespit etmiş olsa da, orkide tohumlarının simbiyotik olarak çimlendirilmesinin yanı sıra, *Cattleya*, *Epidendrum* ve *Laelia* cinsleri içinde yer alan türlerin tohumlarının çimlenebilmeleri için herhangi bir fungusa gerek duyulmadığını; şeker ve mineral madde içeren agar ortamlarının da yeterli olabileceğini ve böylece asimbiyotik kültür yöntemlerini geliştirildiğini bildirmiştir. Araştırmacı, tohumların çimlenmesi için belirli ışık şiddeti ve fotoperiyoda gereksinim duyan orkide türlerinin yanı sıra bazı orkide türlerinin karanlıkta çok daha iyi çimlendiğini, bazı türlerin hem ışıktaki hem de karanlıkta çimlendiğini bildirilmiştir. Orkide tohumlarının çimlenme ve gelişmesinde en uygun pH'ın orkide türlerine göre farklılık gösterdiğini ve değişik türlerdeki optimum pH değerinin 3.6-7.6 arasında değiştiğini belirtmiştir.

Harvais'in (1973) gözlemlerine göre asimbiyotik kültür ortamı olarak kullanılan ortam, doğada epifit orkideleri (başka bir bitki üzerine sarılmış olarak yetişen) besleyen ağaçların gövde süzüntülerinin bileşiminden daha yoğun olmakta ve genel olarak epifit orkideler yoğun; karasal orkideler ise seyreltik ortamlarda daha iyi çimlenmektedir. Ancak asimbiyotik ortamda çimlenmenin gerçekleşebilmesi için ortama bazı organik maddelerin eklenmesi gerekmektedir. Bazı orkide türlerinin tohumlarının çimlenmesi için ise sükroz, glukoz ve başka şekerlerin de çok yararlı olabileceği bildirilmektedir.

Araştırmacı aynı zamanda in vitro çimlendirme çalışmalarında, araştırıcıların çoğu tarafından farklı orkide tohumları için karbon kaynağı olarak kabul edilen dekstroz ve sakkarozun kullanıldığını bildirmiştir. Yetişme ortamına eklenen şekerin arttırılmasıyla büyümenin de arttığı, artan şeker konsantrasyonu ile ise çimlenme ve büyümenin engellendiği belirtilmiştir.

Mead ve Bulard (1975), *Orchis laxiflora* ve *Ophrys sphegodes* bitkilerinin asimbiyotik olarak çimlenmeleri hakkındaki çalışmalarında vitamin ve azot kaynaklarının etkilerini incelemiştir. İki tür arasında küçük farklılıklar oluşmasına rağmen, amonyum nitrat içeren temel bir mineral ortama sakkaroz, organik azot ve vitaminlerin eklenmesiyle her iki türde de iyi gelişimler tespit edilmiştir. alışmalarında yüksek oranda çimlenme ve protokorm gelişimi elde etmiş olmalarının yanı sıra bitkide kararma ve ölümlere de rastlamışlardır. Her iki türün de en iyi gelişimleri karanlıkta gerçekleşmiştir. Fakat ne yazık ki tohum ekiminden sekiz ay kadar sonra bazı beyaz protokormlar kararıp bitki ölümü ile sonlanmıştır.

Arditti ve Harrison (1977), kullanılan kimyasal bileşiklerden pozitif 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.

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 yalnızca inorganik azot içermeyen ortamda imlenebileceğini, bu imlenen tohumların sonraki aşamalara gelmesi için inorganik azotun gerekli olduğunu belirlemiştir. Üstelik yüksek azot konsantrasyonunun çimlenmeyi engellediğini belirtmiştir.

Süberoğlu (1987), bazı salep orkidelerinde yaptığı çalışmada tohumları farklı sürelerde sodyum hipokloritli çözeltilerde tutma işleminin, tohumların gelişimi üzerinde farklı etkiler yarattığı yönünde bulguya rastlamamıştır. Tohumlar kültüre alınmalarından 3 ay sonra, Bürobct ve Knudson C ortamına 2 mg/l IAA katılmasıyla elde edilen Knudson 6

ortamına aktarılmış olup; çok düşük miktarda, beyaz renkte protokorm oluşumunun başladığı görülmüştür. Bu çimlenmeden yaklaşık 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.

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, sonrasında bu protokormlar bir orkide kültür ortamına transfer edildiğinde 2 ay içinde fideler oluşmuştur.

Özkoç'un (1991) yaptığı çalışmaya göre simbiyotik kültür yönteminde fungusların kullanılmasının yanı sıra 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 uygulandığında sonuç vermediği belirtilmiştir.

Aytaş (1994), *Ophrys apifera* tohumlarının asimbiyotik kültür ortamlarında 4–6 ay içinde çimlendiğini belirlemiştir. Farklı asimbiyotik kültür ortamlarında farklı çimlenme oranları elde ettiği çalışmasında, protokormları taze kültür ortamlarına aktararak gelişmiş fide elde etmiştir. Ancak simbiyotik kültürlerde başarılı sonuçlar elde edememiştir.

Özdener (1994), *Dactylorhiza urvilleana* ve *Dactylorhiza iberica* orkide türlerinde simbiyotik ve asimbiyotik ortamlarında çimlenme ve büyüme üzerine bir çalışma yapmak için fungus izole etmiştir. Yapılan çalışmada simbiyotik ilişki içerisinde olan orkide türlerinin köklerinden elde edilen fungus örneklerinin çimlenme ve gelişmede daha olumlu sonuçlar ortaya koyduğunu saptamıştır. Aynı türlerin tohumlarının asimbiyotik ortamlarda çimlenmelerinde şekerden kaynaklanan bazı olumsuz etkilerden dolayı düşük çimlenme oranı elde edildiği bildirilmiştir.

Avcı (1995), Kahramanmaraş'ta doğal olarak yetişen türlerde embriyo kültürü kullanılarak *in vitro* koşullarda yumru oluşturma yeteneklerini araştırmıştır. *In vitro* ortamda *Orchis coriophora*'da ve *Orchis anatolica*'da yumru elde edilmiştir. Çalışılan 22 ortamdan *Orchis coriophora* için Van Waes Debergh – domates ekstraktı –aktif karbon ortamının, *Orchis anatolica* için Van Waes Debergh ortamı en iyi çimlenme ortamı olarak belirlenmiştir.

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).

Çağlayan ve ark. (1998), *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda tohumların asimbiyotik koşullarda da çimlenmesinin mümkün olduğu bildirilmiştir. Değişik ortamlar, büyüme düzenleyiciler ve çevresel faktörler denenirken farklı sonuçlar alınmıştır. *Orchis anatolica*, *Orchis coriophora*, *Ophrys bornmuelleri* ve *Serapias vomeracea* embriyo kültürü kullanılarak *in vitro* koşullarda başarıyla kültüre alınmışlardır. En iyi sonuçlar *Orchis coriophora* türünden alınmıştır. Bu türde 5 ayda bitkicik elde edilebilmiştir. Sürgün ucu kültürü kullanılarak yalnızca *Orchis anatolica* ve *Himantoglossum affine* türlerinde çoğalma sağlanmış, fakat aşırı kararmalar nedeniyle bitki elde edilememiştir.

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 bir ayda çimlenmiş olup, Knudson+%10 patates ekstraktından %100 başarı elde edilmiştir. Hormon uygulamalarında neredeyse 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 (2004), Ege ve Akdeniz bölgelerinde yetişen salep bitkilerinin simbiyotik yaşam kurduğu mikorizaların izolasyonu tanımlanması ve inokulant olarak kullanımını araştırmak amacıyla yürüttüğü çalışma sonucunda salep bitkilerinin kök ve yumrularından elde edilen toplam 47 fungus izolatının 44'ünün *Fusarium* genusuna, 2'sinin *Rhizoctonia* genusuna ve 1'inin *Papulaspora* genusuna ait olduğunu ortaya koymuştur.

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

Sazak (2004), *Spirantes spiralis*, *Dactylorhiza romana subsp. romana* orkide türlerinin tohumlarının simbiyotik ve simbiyotik olmayan koşullardaki çimlenme, protokorm ve yumru oluşturma durumlarını incelemek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Çalışma sonucunda adı geçen orkide türlerinin tohumlarının çimlenme ve protokorm oluşturulmasında tohumlara uygulanan farklı doz ve konsantrasyonlardaki sterilizasyonun etkili olduğunu saptamıştır. Aynı orkidelerin farklı mikorizal fungus izolatlarında da tohum çimlenmesi ve fide gelişimi üzerinde büyük ölçüde etkilendiğini saptanmıştır.

Valletta ve ark. (2008), in vitro koşullarda yürüttükleri 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 muamelesi ile tohumun su alıp şişmesinin yanında 2 ay süreyle 4-8°C muamele edilmesi çimlenmeyi olumlu yönde etkileyen faktörler olmuştur. Sürekli olarak 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 oluşumu ve 5-6 ay içinde ilk yaprak oluşumu gözlemlenmiştir.

Natdanai Aewsakul ve ark. (2013), yaptıkları araştırmada simbiyotik tohum çimlenmesi için basit ve etkili bir metot için çalışmışlardır. Mikorizal fungus inokule edilmiş ortamlar izerinde yaptıkları çalışmada önemli derecede çimlenme tespit etmişlerdir. 9 hafta sonunda fungus inokule edilen tohumlar çimlenmiş, inokule edilmeyen tohumlar imlenmemiştir.

ığ, Yılmaz (2014), yaptıkları çalışmada *Anacamptis*, *Cephalanthera*, *Dactylorhiza* ve *Orchis* cinslerine ait on bir orkide türünün yumru ve rizomlarından bir; yetiştikleri topraklardan i olmak izere toplam dört izolasyon yöntemi denemişlerdir. Yöntemlerde i farklı kültür ortamı kullanılmışlardır. Çalışmanın sonunda *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma* ve *Verticillium* fungusları izole etmişler. Özellikle *Rhizoctonia spp.* fungusunun izole edilmesinin hedeflendiği çalışmada, *Rhizoctonia spp.*, *Dactylorhiza umbrosa* ve *Orchis palustris* türlerinin yumrularından; *Orchis simia* türünün ise toprağından mikorizal fungusları izole etmişlerdir.

Vudala ve Ribas (2017), gerçekleştirdikleri çalışmada *Hadrolaelia grandis* türünün tohumlarını Woody Bitki Ortamı (WPM), Murashige ve Skoog (MS), Vacin & Went (VW) ve Knudson C (KC) ortamlarında imlendirmeye amaçlamışlardır. Araştırma sonucunda tohum çimlenmesi ve fide gelişimi için etkili ortam WPM en çok olduğu kanıtlamışlardır. Aktif kömür içeren WPM ortamında Protokorm oluşumu ve kök gelişimi sağlanmıştır ve 16 hafta sonra fideler vermikomposta şaşırtılmış 12 haftadan sonra (%91,07 saç kalım oranı ile) başarıyla iklimlendirmişlerdir.

2.2 Vermikltr ve Vermikompost

Vermikltr, besiciliği yapılan hayvanların yemlerine protein kaynağı veya vermikompost iretmek için toprak solucanlarının kültüre edilerek yetiştirilmesidir. Vermikompost, farklı organik atıkların belirli bazı toprak solucanları tarafından sindirimleri sırasında kompostlaştırılması sonucunda elde edilen ve tarım endüstrisinde organik gübre ve toprak düzenleyicisi olarak kullanılan malzemedir (Edwards ve Bohlen, 1996).

1970'lerden sonra bazı solucanların organik maddeleri parçalayarak ekonomik değeri olan kompost ürettikleri görülmüştür (Edwards, 1988). Yetmişli ve seksenli yıllarda hızla popüler olmaya başlayan vermikültür ve vermikompost üretimi başta İngiltere, Japonya, Birleşik Devletler olmak üzere Küba, Fransa ve Almanya'da önemli iş sahası haline gelmiştir. Birkaç yıl süresince Amerika'da vermikültür çiftliği sayısı 90000 civarına ulaşmış ve sadece Kaliforniya'da yılda 20 000 ton vermikompost üretilmiştir (Zeng, 1982). Günümüzde vermikompostu sıklıkla kullanan ülkelerin başında Küba gelmektedir (Cracas, 2000).

Yeryüzündeki bütün toprak solucanları organik maddeleri kompostlaştırabilmektedir. Ancak *Eisenia fetida*, *Dendrobaena veneta*, *Lumbricucus rubellus*, *Eudrilus eugeniae*, *Perionyx excavatus* ve *Perionyx hawayana* türleri diğer toprak solucanlarına oranla daha hızlı besin tüketmeleri, yüksek üreme ve popülasyon artış oranlarına sahip olması, farklı iklim ve çevre koşullarına kolay adapte olabilmeleri, dolayısıyla hayatta kalma oranlarının yüksek olması nedeniyle tercih edilmektedirler (Edwards ve ark., 1996; Meyer ve ark., 1997; Campbell, 1999). Adı geçen altı türden ticari olarak yaygın üretimi gerçekleştirilen *Eisenia fetida* ve *Lumbricus rubellus*'tur (Dickerson, 2004).

2.2.1 Vermikompostun Tarım ve Toprak Üzerine Etkileri

Solucanlar; toprağın yapısını, verimliliğini ve bitki üretimini büyük ölçüde değiştirmektedir. Beslenmeleri ve galeri açma aktiviteleri yoluyla toprağın dengesini olumlu anlamda geliştirebilir, suyun toprağa nüfuzunu artırabilir, yüzeye uygulanan organik madde, kireç ve gübrelerin toprakla karışımını hızlandırabilir, gözenekliliğini artırabilirler. Bunlara ek olarak bitki kök gelişimini destekledikleri, kök hastalıkları oranını büyük ölçüde azalttıkları, çayır ve yıllık ürün miktarı ile tahıl kalitesini artırdıkları gerek laboratuvar gerekse arazi koşullarında yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Birçok ülkede, topraklara solucan aşılmasının, çayır verimini %10 ile %75 arasında değişen oranlarda, tahıl bitkilerinin gelişimini %39, yıllık tohum miktarını %35, tohumun azot içeriğini %12 oranında artırdığı gözlemlenmiştir (Mısırlıoğlu, 2011).

Arancon ve ark. (2005)'na göre az miktarda kullanıldıklarında bile bitkilerin gelişmelerini büyük ölçüde arttıran vermikompost hem çiçekçilikte hem de meyve ve sebze yetiştiriciliğinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır.

Vermikompost toprağa kazandırdığı besin elementleriyle bitkilerin sadece sağlıklı, kaliteli ve verimli olmalarını sağlamakla kalmaz, hümik asit ve büyüme hormonlarıyla gelişmelerini de desteklemektedir. Çok daha önemlisi mikrobiyal aktivite ve mikrobiyal biyokütle seviyelerini artırarak toprak verim ve kalitesinin artışı sağlar. Ayrıca toprak kaynaklı hastalıkların ve zararlıların yıkımını önlemektedir. Vermikompostun içindeki bitki besin elementlerinin %97'si özellikle N, P ve K bitki tarafından doğrudan alınabilir formdadır. Buna bağlı olarak vermikompostta, zengin üst topraktan tüketilebilir formdaki azot miktarının 5 kat, potasyum miktarının 7 kat, kalsiyum miktarının ise 3 kat daha fazla olduğu, Barley (1961) tarafından bildirilmiştir.

Vermikompost bitkilerin gelişimleri için toprakta olması gereken besin elementlerini sağlaması ve zenginleştirmesinin yanı sıra pH, havalanma, su tutma kapasitesi, parçacık büyüklüğü, agregatlaşma gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini düzenlemektedir (Bryan ve Lance, 1991; Gallagher ve Wollenhaupt, 1997; Gouin, 1998). Organik atıkların solucanlar kullanılarak kompostlanması ile üretilen ürünün toprağa uygulanması ile başta biyolojik kompozisyonu olmak üzere yapısı önemli miktarda düzeltilebilmektedir (Hartenstein, 1978; Karmegam, 2010).

Yapılan çalışmada vermikompost uygulanmış toprakta azot bağlayan bakteriler, mikorizal mantarlar ve aktinomisetlerin sayısında artış olduğu, buna bağlı olarak topraktaki azot miktarının da yükseldiği ifade edilmiştir (Kale, 1992).

Azarmi ve ark.(2008), domates üretimi yapılan topraklarda dekara 1,5 ton vermikompost uygulandığında toprağın fiziksel yapısının olumlu yönde etkilendiği, organik karbon, N, P, K, Ca, Zn, Mn miktarlarında yükseliş olduğunu bildirmişlerdir.

2.3 İmmobilizasyon

Biyoteknolojik çalışmalarda kullanılan hücrelerin tekrar kullanılabilir hale getirilmesi veya kesiksiz sistemde daha kolay kullanılabilirliğinin sağlanması için immobilizasyon

teknikğine başvurulmaktadır. İmmobilizasyon işlemi hücrelerin ya da enzimlerin aktivitesini kaybetmeden belirlenmiş olan tutuklama materyalinde hedeflenen boşluğa tutturulması veya hapsedilmesidir. Bu işlem enzimlere, hücre organellerine, mikrobiyal hücrelere ve diğer tüm biyokatalizörlere uygulanabilmektedir. Bazı durumlarda, biyokatalizörler çözünmeyen destek (taşıyıcı) malzemeye fiziksel veya kimyasal bağlarla bağlanırken, diğer durumlarda ise destek malzemedeki boşluklarda serbest halde hapsedilmektedir (Telefoncu, 1997).

2.3.1 Taşıyıcıya bağlama metodu

Taşıyıcıya bağlama; biyokatalizörün suda çözünmeyen taşıyıcıya kovalent bağlar, iyonik bağlar, fiziksel adsorpsiyon veya biyospesifik etkileşimler ile bağlanmasına temeline dayanan bir metottur. Suda çözünmeyen polisakkaritler, sentetik polimerler ve inorganik materyaller gibi çeşitli çözünmeyen materyaller doğrudan veya özel modifikasyon ya da aktivasyon sonrası kullanılabilir (Tanaka ve Kawamoto, 1999).

Kovalent bağ oluşturulması

Kovalent bağlama metodu enzim immobilizasyonu için en sık kullanılan tekniktir. Fakat kovalent bağlayıcı ajanların toksisitesi ve doğru immobilizasyon koşullarının bulunmasının zorluğundan dolayı hücre immobilizasyonu için kullanımı oldukça azdır. Enzim ile aktifleştirilmiş bir taşıyıcı arasında kovalent bağ oluşumuna dayanır. Bu yöntemde matriks ve enzim arasındaki bağ kararlı ve sağlam olduğundan enzimin çözeltiliye geçmesi önlenmiş olur. Kovalent bağ genellikle enzim yüzeyinde bulunan aminoasitlerin radikal gruplarıyla matriksde bulunan fonksiyonel gruplar arasında oluşur (Kennedy, 1995). Kovalent bağ oluşumu ile immobilizasyon yönteminde en çok dikkat edilmesi gereken nokta enzimin aktif bölgesinin kovalent bağ oluşumuna katılmamasıdır. Çünkü böyle bir durum enzimin katalitik aktivitesini kısmen veya tamamen yitirmesine neden olabilir. Bu durumu önlemek için immobilizasyonun gerçekleştiği ortama enzimin inhibitörlerini ilave etmek uygun bir yaklaşım olabilir.

Kovalent bağlanma ile immobilizasyon enzimin konformasyonel kararlılığını arttırarak enzimin sıcaklık, pH ve organik çözücülere karşı kararlılığını arttırır (Mateo ve ark., 2007).

İyonik bağlanma

İyonik bağlanma immobilizasyonunda iyon değişimi kromatografisi yönteminde kullanılan matriks-enzim etkileşimi kullanılır. Basit ve geri dönüşümlü yöntemin uygulanmasındaki en önemli problem enzimin hem kuvvetli bağlandığı hem de aktif olduğu koşulların bulunmasındadır. Bu uygulamada substrat veya ürünler yüklenmiş halde bulduklarından enzimin optimum pH'sı ve pH stabilitesi değişebilir. Bu durum başlangıçta bir dezavantaj gibi görülse de gerçekleştirilen biyoteknolojik sürece bağlı olarak enzimin optimum pH'sının daha bazik veya daha asidik koşullarda gerçekleşmesi arzu edilen bir durumda olabilir (Brena ve Batista, 2006).

Adsorpsiyon (kovalent olmayan ilişkiler)

Adsorpsiyon immobilizasyon en basit immobilizasyon yöntemidir ve enzim ile matriks arasında hidrojen bağı, Van der Waals etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler, tuz köprüleri gibi zayıf etkileşimler vasıtası ile gerçekleşir (Persson ve ark., 2000). Adsorpsiyon ile immobilizasyonun ılımlı ortamda, kimyasal maddelerin kullanımına gerek duymadan gerçekleşir. Enzimin aktif bölgesi bu adsorpsiyondan etkilenmez ve aktivitesini korur (Mulchandam ve Rogers, 1998). Uygulama kolaydır ve enzim aktivitesinin korunması açısından avantajlıdır. Diğer taraftan bu immobilizasyonda, bağın gücü, pH, iyonik şiddet, sıcaklık gibi enzimin bazı özellikleri değişebilir. Kullanılan matriksin yüzey özelliklerine bağlı olarak enzim denatürasyonu görülebilir (Costa ve ark, 2004).

Biyospesifik Bağlama Metodu

Biyospesifik bağlama metodu, çoğunlukla affinite ayırması işlemlerinde kullanılan koenzimler, inhibitörler, efektörler, lektinler ve antikolar gibi bileşikler ile enzimler arasındaki biyospesifik etkileşime dayanır. Eğer etkileşim kuvvetli ise enzim bu bileşiklerden biri ile konjuge oluşturarak taşıyıcıya bağlanır. Bunun yanında, enzimler ile bağlandıklarında onları inaktive ettiklerinden dolayı antikolar ve inhibitörler iyi bir seçim olmayabilirler. Lektin ile spesifik karbonhidrat birimleri içeren enzimler arasındaki etkileşim bu uygulamalar için faydalıdır (Sulkowski ve Laskowski, 1974).

Glikoprotein olan lektinler, spesifik karbonhidrat birimi ile sıkı bir şekilde bağlanır. En çok kullanılan lektinlerden biri konkanavalin A'dır. Birçok enzim glikoprotein olduğundan dolayı, lektinlerin kullanım alanı vardır. Ayrıntılı manipülasyon işlemlerinin gerekliliği ve pahalı bir yöntem olması nedeniyle bu yöntem, sadece likit sistemlerde ve değerli enzimlerin kullanıldığı durumlarda tercih edilir.

2.3.2 Çapraz bağlama

Bu metot, küçük molekülü bi- ve multi- fonksiyonel reaktifler ile enzim molekülleri arasında bağlar yaparak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif yoğunluğuna, pH ve immobilize edilecek enzime direkt olarak bağlıdır. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutraldehit, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenerler, bioksiranlar, divinilsülfonlar ve epiklorhidrinlerdir. Bu metot ile immobilize edilmiş biyokaralizörün aktivitesinde çoğunlukla azalma gözlenir (Telefoncu, 1997). Bu yöntemde proteinlerin çözünmeyen taşıyıcıya çapraz bağlanmasıyla, substrat çözeltisindeki enzim kaybı önlenmektedir (Sheldon, 2010).

2.3.3 Hapsetme (Entrapment)

Hapsetme immobilizasyon yönteminde serbest halde bulunan enzim molekülleri ya da hücreler matriks yapısı içerisine hareketsiz olarak yerleştirilir. Bu yöntemde genellikle matriks olarak organik polimer, sol-jel gibi polimerik ağ yapısı gösteren maddeler kullanılır (Ackerman, 2006). Biyomolekülün hapsedildiği matriksin gözenekleri

molekölün dışarı sızmasını önleyecek kadar sıkı olmakla birlikte substratın ve ürünün hareket etmesine izin verecek boyutta olması gerekmektedir (Bickerstaff, 1997). Biyomoleküllerin tutuklanması genellikle mikrokapsülasyon, jel veya fiber yapısına hapsetme şeklinde gerçekleştirilir (Guisan, 2006).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Tohumlar

Araştırmada, ülkemiz florasında bulunan salep orkideleri kullanılmıştır. Tokat Canpolat köyü mevkiinde, ormanlık araziden 26.07.2016 tarihinde bitkilerin toprak altı yumrularına zarar verilmeden, yalnızca tohumları toplanmıştır.



Şekil 3.1: Salep orkidesi ve salep orkidelerinden toplanan tohumlar.



Şekil 3.2: Salep orkidesi tohumlarının mikroskop görüntüleri (100x).

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Vermikompost

Araştırmada kullanılan vermikompost Kayseri ilinde bulunan Megasol firmasından temin edilmiştir.



Şekil 3.3: Çalışmada kullanılan vermikompost örnekleri.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Diğer Malzemeler

Araştırmada immobilizasyon için Tween-20, sodyum aljinat, $CaCl_2$, patates nişastası ve karbonhidrat kaynağı olarak glikoz, fruktoz, laktoz, nişasta, mannitol, sükroz, melas ve zeytin karasuyu kullanılmıştır. Ayrıca TLC için Silica Gel 60 F254 25 Tlc Aluminium Sheets (20 X 20 cm) ve 1 μ L'lik şırınga kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitki Tohumlarının Toplanması

Araştırmada kullanılan tohumlar 26.07.2016 tarihinde Tokat Canpolat köyü mevkiinden toplanmıştır. Tohum toplama işleminde salep orkidesi bitkisinin çiçeklerinin altında yer alan tohum keselerinden hasat işlemi gerçekleştirilmiştir. Hasat edilen keselerin tamamen kurumuş olmasına dikkat edilmiştir. Hasat edilen tohumlar laboratuvarında

kapsüllerden ayrılmış ve bir falkon tûpünde toplanıp kullanılacağı zamana kadar +4°C’de saklanmıştır.

3.2.2 Çalışmada Kullanılan Tohumların Hazırlanması

+4°C’de saklanan tohumların bir grubuna direkt olarak farklı karbonhidrat kaynakları ile immobilizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu ilk grup dışında 7 grup için immobilizasyon işleminden önce her biri farklı ön muameleden geçirilmiştir.

Grup 1 Ön Muamele İşlemi

5 g tartılan tohumlar bir tûp içerisine koyulmuştur. 4 ml %80(v/v) gliserol ile 1 dakika boyunca maksimum rpm’de vortekslenmiştir. Ardından 1,5 ml etanol ve 1-2 damla Tween-20 ile 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. Sûzûlen tohumlar 4 ml distile su ile vortekslenmiştir. Ardından tûp 14000 rpm’de 3 dakika boyunca santrifûjlenmiş ve tohumlar çöktürülmüştür. Santrifûj sonunda sıvı faz uzaklaştırılır ve tohumlar 3 kez daha distile su ile muamele edilip aynı çöktürme işlemleri tekrarlanmıştır (Kamçı ve Karakuş, 2015). Son olarak tohumlar kurutma kâğıdından yapılmış bir kese içerisine koyularak 38°C’de kurumaya bırakılmıştır.

Grup 2 Ön Muamele İşlemi

5 g tartılan tohumlar %2’lik H₂SO₄ ile 5 dakika muamele edilmiştir. Ardından yüzey sterilizasyonu için (1damla/100ml) Tween-20 ile desteklenmiş %1’lik NaClO ile 20 dakika boyunca muamele edilmiştir. Son olarak tohumlar 5’er dakika boyunca 2 kez distile su ile durulanır (Valetta ve ark., 2008). Tüm işlemlerin sonunda tohumlar kurutma kâğıdından yapılmış bir kese içine aktarılarak 38°C’de kurumaya bırakılmıştır.

Grup 3 Ön Muamele İşlemi

5 g tartılan tohumlar 20 dakika boyunca 33°C'deki sıcak su ile muamele edilmiştir. Ardından 1N H₂SO₄ ile 45-60 dakika kadar muamele edilmiştir. Süre sonunda tohumlar bu kez %10'luk NaOCl ile 30 dakika muamele edilmiştir (Demir, 2004). İşlemler bittikten sonra tohumlar 38°C'de kurumaya bırakılmıştır.

Grup 4 Ön Muamele İşlemi

5 g tartılan salep orkidesi tohumları, 2-3 damla Tween-20 eklenmiş %10'luk ticari sodyum hipoklorit içinde 12 dakika kadar bekletilmiştir. Ardından 5'er dakika boyunca 3 kez distile su ile durulanmışlardır (Gümüş, 2009). Tohumlar kurutma kâğıdı ile paketlenerek gerçekleştirilen işlemlerin sonunda kurumaları amacıyla 38°C'deki etüve bırakılmıştır.

Grup 5 Ön Muamele İşlemi

5 g tartılan tohumlar 10 dakika süreyle 1-2 damla Tween-20 eklenmiş %1'lik sodyum hipoklorit ile muamele edilmiştir. Sonrasında 3 kez distile su ile durulanmıştır (Yararbaş, 2008). Son olarak tohumlar kurutma kâğıdı ile paketlenerek 38°C'de kurumaya bırakılmıştır.

Grup 6 Ön Muamele İşlemi

5 g tartılan tohumlar kurutma kâğıdı ile paketlenir ve %0.5'lik NaOCl çözeltisi ile 5 dakika boyunca muamele edilmiştir. Ardından 38°C'de kurumaya bırakılmıştır.

Grup 7 Ön Muamele İşlemi

5 g tartılan tohumlar %0.1'lik Tween-20 içeren %0.6'lık sodyum hipoklorit çözeltisi ile 20 dakika boyunca 200 rpm'de vortekslenmiştir. Ardından 38°C'de kurumaya bırakılmıştır (Lauzer ve ark., 2007).

3.2.3 Tohumların İmmobilizasyonu

+4°C’de saklanan tohumlar direkt olarak immobilizasyon yöntemi ile farklı karbonhidrat kaynakları ile immobilize edilmiştir.



Şekil 3.4: İmmobilizasyon işleminde kullanılan çözeltiler ve immobilizasyon işlemi.

Sükrozlu Tohum İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan metot, Schoebitz ve ark. (2013)’nin kullandıkları metot temel alınarak oluşturulan ve tohumlar için optimize edilmiş bir metottur.

Oluşturulacak olan tohumlu beadler için ilk olarak 50 ml distile su ile 2 gr Na-Aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Karışımın tamamen homojen olması için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözeltilere 4 gr sükroz, 5 mg tohum ve 20 gr patates nişastası eklenmiştir. Karışımın tekrar homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Ayrı bir beherde damlatma çözeltisi, 500 ml distile su ile 7.5 gr CaCl₂ manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır.

İçinde tohum ve sükroz bulunan aljinat çözeltisi bir enjektöre çekilip CaCl₂ çözeltisi içine damlatılmıştır. Oluşan tohumlu ve sükrozlu aljinat beadleri 30 dakika kadar CaCl₂ çözeltisi içinde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda aljinat beadleri süzülerek 2 kez distile

suda yıkanmıştır. Son kez süzülen aljinat beadleri bir kurutma kâğıdı üzerine boşaltılıp 38°C’de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Sükroz ve tohumla yapılan bu beadler HİS-I olarak kodlanmıştır ve ekim gününe kadar kurutulmuş beadler +4°C’de saklanmıştır.

Ön muameleden geçirilmiş olan salep tohumları içinde yukarıda anlatılan immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonunda oluşan beadler de grupları belli olacak şekilde HİS-I/1, HİS-I/2, HİS-I/3, HİS-I/4, HİS-I/5, HİS-I/6 ve HİS-I/7 olarak kodlanmıştır.

Fruktozlu Tohum İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan metot, Schoebitz ve ark. (2013)’nın kullandıkları metot temel alınarak oluşturulan ve tohumlar için optimize edilmiş bir metottur.

Oluşturulacak olan tohumlu beadler için ilk olarak 50 ml distile su ile 2 gr Na-Aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Karışımın tamamen homojen olması için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözeltiliye 4 gr fruktoz, 5 mg tohum ve 20 gr patates nişastası eklenmiştir. Karışımın tekrar homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Aynı bir beherde damlatma çözeltisi, 500 ml distile su ile 7.5 gr CaCl₂ manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır.

İçinde tohum ve fruktoz bulunan aljinat çözeltisi bir enjektöre çekilip CaCl₂ çözeltisi içine damlatılmıştır. Oluşan tohumlu ve fruktozlu aljinat beadleri 30 dakika kadar CaCl₂ çözeltisi içinde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda aljinat beadleri süzülerek 2 kez distile suda yıkanmıştır. Son kez süzülen aljinat beadleri bir kurutma kâğıdı üzerine boşaltılıp 38°C’de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Fruktoz ve tohumla yapılan bu beadler HİS-II olarak kodlanmıştır ve ekim gününe kadar kurutulmuş beadler +4°C’de saklanmıştır.

Ön muameleden geçirilmiş olan salep tohumları içinde yukarıda anlatılan immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonunda oluşan beadler de grupları belli olacak şekilde HİS-II/1, HİS-II/2, HİS-II/3, HİS-II/4, HİS-II/5, HİS-II/6 ve HİS-II/7 olarak kodlanmıştır.

Glukozlu Tohum İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan metot, Schoebitz ve ark. (2013)'nın kullandıkları metot temel alınarak oluşturulan ve tohumlar için optimize edilmiş bir metottur.

Oluşturulacak olan tohumlu beadler için ilk olarak 50 ml distile su ile 2 gr Na-Aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Karışımın tamamen homojen olması için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözeltiliye 4 gr glukoz, 5 mg tohum ve 20 gr patates nişastası eklenmiştir. Karışımın tekrar homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Ayrı bir beherde damlatma çözeltisi, 500 ml distile su ile 7.5 gr CaCl₂ manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır.

İçinde tohum ve glukoz bulunan aljinat çözeltisi bir enjektöre çekilip CaCl₂ çözeltisi içine damlatılmıştır. Oluşan tohumlu ve glukozlu aljinat beadleri 30 dakika kadar CaCl₂ çözeltisi içinde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda aljinat beadleri süzülerek 2 kez distile suda yıkanmıştır. Son kez süzülen aljinat beadleri bir kurutma kâğıdı üzerine boşaltılıp 38°C'de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Fruktoz ve tohumla yapılan bu beadler HİS-III olarak kodlanmıştır ve ekim gününe kadar kurutulmuş beadler +4°C'de saklanmıştır.

Ön muameleden geçirilmiş olan salep tohumları içinde yukarıda anlatılan immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonunda oluşan beadler de grupları belli olacak şekilde HİS-III/1, HİS-III/2, HİS-III/3, HİS-III/4, HİS-III/5, HİS-III/6 ve HİS-III/7 olarak kodlanmıştır.

Laktozlu Tohum İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan metot, Schoebitz ve ark. (2013)'nın kullandıkları metot temel alınarak oluşturulan ve tohumlar için optimize edilmiş bir metottur.

Oluşturulacak olan tohumlu beadler için ilk olarak 50 ml distile su ile 2 gr Na-Aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Karışımın tamamen homojen olması için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözeltiliye 4 gr laktoz, 5 mg tohum ve 20 gr patates nişastası eklenmiştir. Karışımın tekrar homojen

hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Ayrı bir beherde damlatma çözeltisi, 500 ml distile su ile 7.5 gr CaCl₂ manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır.

İçinde tohum ve laktoz bulunan aljinat çözeltisi bir enjektöre çekilip CaCl₂ çözeltisi içine damlatılmıştır. Oluşan tohumlu ve laktozlu aljinat beadleri 30 dakika kadar CaCl₂ çözeltisi içinde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda aljinat beadleri süzülerek 2 kez distile suda yıkanmıştır. Son kez süzülen aljinat beadleri bir kurutma kâğıdı üzerine boşaltılıp 38°C'de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Laktoz ve tohumla yapılan bu beadler HİS-IV olarak kodlanmıştır ve ekim gününe kadar kurutulmuş beadler +4°C'de saklanmıştır.

Ön muameleden geçirilmiş olan salep tohumları içinde yukarıda anlatılan immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonunda oluşan beadler de grupları belli olacak şekilde HİS-IV/1, HİS-IV/2, HİS-IV/3, HİS-IV/4, HİS-IV/5, HİS-IV/6 ve HİS-IV/7 olarak kodlanmıştır.

Mannitollü Tohum İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan metot, Schoebitz ve ark. (2013)'nin kullandıkları metot temel alınarak oluşturulan ve tohumlar için optimize edilmiş bir metottur.

Oluşturulacak olan tohumlu beadler için ilk olarak 50 ml distile su ile 2 gr Na-Aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Karışımın tamamen homojen olması için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözeltiliye 4 gr mannitol, 5 mg tohum ve 20 gr patates nişastası eklenmiştir. Karışımın tekrar homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Ayrı bir beherde damlatma çözeltisi, 500 ml distile su ile 7.5 gr CaCl₂ manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır.

İçinde tohum ve mannitol bulunan aljinat çözeltisi bir enjektöre çekilip CaCl₂ çözeltisi içine damlatılmıştır. Oluşan tohumlu ve mannitollü aljinat beadleri 30 dakika kadar CaCl₂ çözeltisi içinde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda aljinat beadleri süzülerek 2 kez distile suda yıkanmıştır. Son kez süzülen aljinat beadleri bir kurutma kâğıdı üzerine boşaltılıp 38°C'de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Mannitol ve tohumla yapılan bu

beadler HİS-V olarak kodlanmıştır ve ekim gününe kadar kurutulmuş beadler +4°C'de saklanmıştır.

Ön muameleden geçirilmiş olan salep tohumları içinde yukarıda anlatılan immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonunda oluşan beadler de grupları belli olacak şekilde HİS-V/1, HİS-V/2, HİS-V/3, HİS-V/4, HİS-V/5, HİS-V/6 ve HİS-V/7 olarak kodlanmıştır.

Niştastalı Tohum İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan metot, Schoebitz ve ark. (2013)'nin kullandıkları metot temel alınarak oluşturulan ve tohumlar için optimize edilmiş bir metottur.

Oluşturulacak olan tohumlu beadler için ilk olarak 50 ml distile su ile 2 gr Na-Aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Karışımın tamamen homojen olması için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözeltiliye 5 mg tohum ve 20 gr patates niştastası eklenmiştir. Karışımın tekrar homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Aynı bir beherde damlatma çözeltisi, 500 ml distile su ile 7.5 gr CaCl₂ manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. İçinde tohum ve sadece niştasta bulunan aljinat çözeltisi bir enjektöre çekilip CaCl₂ çözeltisi içine damlatılmıştır. Oluşan tohumlu ve niştastalı aljinat beadleri 30 dakika kadar CaCl₂ çözeltisi içinde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda aljinat beadleri süzülerek 2 kez distile suda yıkanmıştır. Son kez süzülen aljinat beadleri bir kurutma kâğıdı üzerine boşaltılıp 38°C'de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Yalnızca niştasta ve tohumla yapılan bu beadler HİS-VI olarak kodlanmıştır ve ekim gününe kadar kurutulmuş beadler +4°C'de saklanmıştır.

Ön muameleden geçirilmiş olan salep tohumları içinde yukarıda anlatılan immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonunda oluşan beadler de grupları

belli olacak şekilde HİS-VI/1, HİS-VI/2, HİS-VI/3, HİS-VI/4, HİS-VI/5, HİS-VI/6 ve HİS-VI/7 olarak kodlanmıştır.

Melash Tohum İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan metot, Schoebitz ve ark. (2013)'nın kullandıkları metot temel alınarak oluşturulan ve tohumlar için optimize edilmiş bir metottur.

Oluşturulacak olan tohumlu beadler için ilk olarak şeker fabrikasından elde edilen atık madde olan melas çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 50 mg tartılan melas 500 ml distile su ile çözülmüş ve otoklavlanıp steril hale getirilmiştir. İmmobilizasyon için bu melas çözeltisinden 12.5 ml ve 37.5 ml distile su ile 2 gr Na-Aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Karışımın tamamen homojen olması için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözeltiye 5 mg tohum ve 20 gr patates nişastası eklenmiştir. Karışımın tekrar homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Aynı bir beherde damlatma çözeltisi, 500 ml distile su ile 7.5 gr CaCl₂ manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. İçinde tohum ve melas çözeltisi bulunan aljinat çözeltisi bir enjektöre çekilip CaCl₂ çözeltisi içine damlatılmıştır. Oluşan tohumlu ve melashlı aljinat beadleri 30 dakika kadar CaCl₂ çözeltisi içinde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda aljinat beadleri süzülerek 2 kez distile suda yıkanmıştır. Son kez süzülen aljinat beadleri bir kurutma kâğıdı üzerine boşaltılıp 38°C'de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Melas ve tohumla yapılan bu beadler HİS-VII olarak kodlanmıştır ve ekim gününe kadar kurutulmuş beadler +4°C'de saklanmıştır.

Ön muameleden geçirilmiş olan salep tohumları içinde yukarıda anlatılan immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonunda oluşan beadler de grupları belli olacak şekilde HİS-VII/1, HİS-VII/2, HİS-VII/3, HİS-VII/4, HİS-VII/5, HİS-VII/6 ve HİS-VII/7 olarak kodlanmıştır.

Zeytin Karasuyu(OMW) ile Tohum İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan metot, Schoebitz ve ark. (2013)'nın kullandıkları metot temel alınarak oluşturulan ve tohumlar için optimize edilmiş bir metottur.

Oluşturulacak olan tohumlu beadler için ilk olarak 50 ml zeytin karasuyu ile 2 gr Na-Aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Karışımın tamamen homojen olması için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözeltiliye 5 mg tohum ve 20 gr patates nişastası eklenmiştir. Karışımın tekrar homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Aynı bir beherde damlatma çözeltisi, 500 ml distile su ile 7.5 gr CaCl₂ manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır.

İçinde tohum ve zeytin karasuyu çözeltisi bulunan aljinat çözeltisi bir enjektöre çekilip CaCl₂ çözeltisi içine damlatılmıştır. Oluşan tohumlu aljinat beadleri 30 dakika kadar CaCl₂ çözeltisi içinde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda aljinat beadleri süzülerek 2 kez distile suda yıkanmıştır. Son kez süzülen aljinat beadleri bir kurutma kâğıdı üzerine boşaltılıp 38°C'de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Yapılan bu beadler HİS-IX olarak kodlanmıştır ve ekim gününe kadar kurutulmuş beadler +4°C'de saklanmıştır.

Ön muameleden geçirilmiş olan salep tohumları içinde yukarıda anlatılan immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonunda oluşan beadler de grupları belli olacak şekilde HİS-IX/1, HİS-IX/2, HİS-IX/3, HİS-IX/4, HİS-IX/5, HİS-IX/6 ve HİS-IX/7 olarak kodlanmıştır.

Zeytin Karasuyu(OMW) ve Glukoz ile Tohum İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan metot, Schoebitz ve ark. (2013)'nin kullandıkları metot temel alınarak oluşturulan ve tohumlar için optimize edilmiş bir metottur.

Oluşturulacak olan tohumlu beadler için ilk olarak 50 ml zeytin karasuyu ile 2 gr Na-Aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Karışımın tamamen homojen olması için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözeltiliye 4 gr glukoz, 5 mg tohum ve 20 gr patates nişastası eklenmiştir. Karışımın tekrar homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Aynı bir beherde damlatma çözeltisi, 500 ml distile su ile 7.5 gr CaCl₂ manyetik karıştırıcıda karıştırılarak

hazırlanmıştır.

İçinde tohum ve glukoz çözeltisi bulunan aljinat çözeltisi bir enjektöre çekilip CaCl_2 çözeltisi içine damlatılmıştır. Oluşan tohumlu aljinat beadleri 30 dakika kadar CaCl_2 çözeltisi içinde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda aljinat beadleri süzülerek 2 kez distile suda yıkanmıştır. Son kez süzülen aljinat beadleri bir kurutma kâğıdı üzerine boşaltılıp 38°C 'de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Glukoz ve tohumla yapılan bu beadler HİS-X olarak kodlanmıştır ve ekim gününe kadar kurutulmuş beadler $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Ön muameleden geçirilmiş olan salep tohumları içinde yukarıda anlatılan immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonunda oluşan beadler de grupları belli olacak şekilde HİS-X/1, HİS-X/2, HİS-X/3, HİS-X/4, HİS-X/5, HİS-X/6 ve HİS-X/7 olarak kodlanmıştır.

Kontrol Grubu için Tohum İmmobilizasyonu

İmmobilizasyonda kullanılan metot, Schoebitz ve ark. (2013)'nin kullandıkları metot temel alınarak oluşturulan ve tohumlar için optimize edilmiş bir metottur.

Oluşturulacak olan kontrol grubu için ilk olarak 50 ml distile su ile 4 gr Na-Aljinat çözeltisi hazırlanmıştır. Karışımın tamamen homojen olması için 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Homojen karışım elde edildikten sonra çözeltiliye 5 mg tohum eklenmiştir. Karışımın tekrar homojen hale gelmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırılmıştır. Başka bir beherde damlatma çözeltisi, 500 ml distile su ile 7.5 gr CaCl_2 hazırlanmıştır.

İçinde tohum bulunan aljinat çözeltisi bir enjektöre çekilip CaCl_2 çözeltisi içine damlatılmıştır. Oluşan tohumlu aljinat beadleri 30 dakika kadar CaCl_2 çözeltisi içinde karıştırılmıştır. 30 dakika sonunda aljinat beadleri süzülerek 2 kez distile suda yıkanmıştır. Son kez süzülen aljinat beadleri bir kurutma kâğıdı üzerine boşaltılıp 38°C 'de 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Yapılan bu şeffaf beadler HİS-KONTROL olarak kodlanmıştır ve ekim gününe kadar kurutulmuş beadler $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

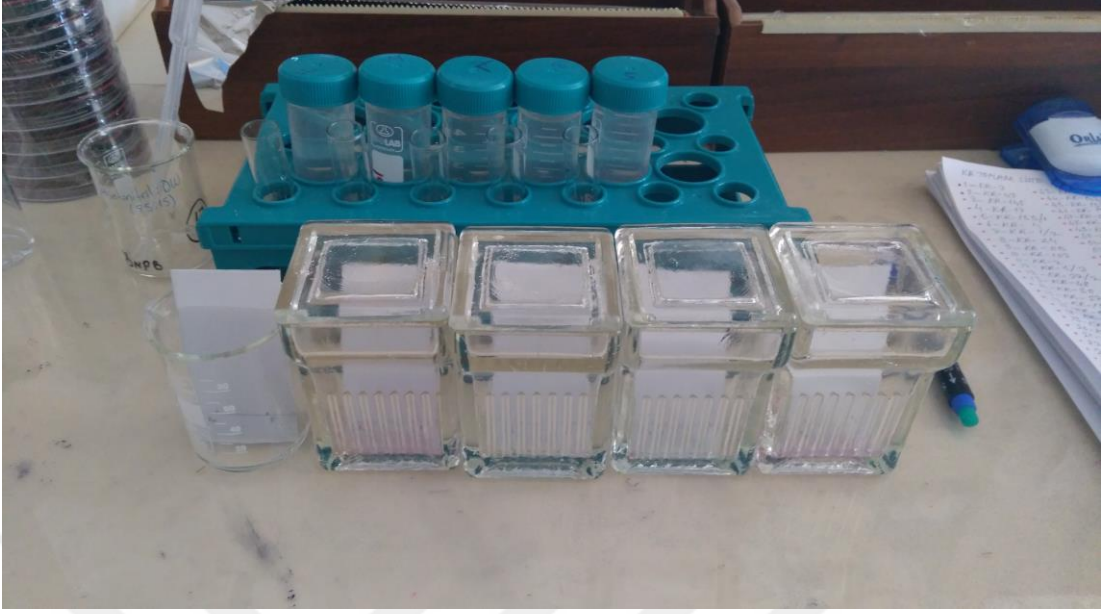
Ön muameleden geçirilmiş olan salep tohumları içinde yukarıda anlatılan immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu işlemin sonunda oluşan beadler de grupları

belli olacak şekilde HİS- KONTROL/1, HİS- KONTROL/2, HİS- KONTROL/3, HİS- KONTROL/4, HİS- KONTROL/5, HİS- KONTROL/6 ve HİS- KONTROL/7 olarak kodlanmıştır.

3.2.4 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Farklı şeker birimlerinin immobilizasyonun başarılı olup olmadığını anlamak için standart şeker çözeltilerine karşılık bead oluşumundan sonra oluşan sıvı örneklerinin TLC ile analizi gerçekleştirilmiştir. Beadlerden şeker sızıntısı olup olmadığını anlamak için immobilizasyon işlemi sonunda içinde beadlerin bulunduğu CaCl_2 çözeltisinden örnekler alınmıştır. Bu örnekler fruktoz, sükroz, laktoz, glukoz ve mannitol içeren beadlerin çözeltisinden alınmıştır. Bu 5 şeker kaynağı için ayrı ayrı %20'lik standart çözeltiler hazırlanmıştır.

Kullanılacak TLC plakası her bir şeker için standart ve örnek çözelti için yaklaşık 2 cm genişliğinde kesilmiş ve etiketlenmiştir. Plaka üzerinde belirlenen noktalara $1\mu\text{L}$ 'lik şırınga ile standart çözelti bir kez, örnek çözelti ise 4 kez yüklenmiştir. Her yükleme sonrası nokta saç kurutma makinesi ile kurutulmuştur. Yürütme çözeltisi olarak asetonitril - distile su (85:15, v/v) kullanılmıştır. Hazırlanan yürütme çözeltisi şalelerin içine yaklaşık 2 ml kadar eklendikten sonra, yükleme yapıp kurutulmuş plakalar şalelerin içine yerleştirilmiştir. Yürütme çözeltisi plakanın üst kısmına 4mm kadar yaklaştığı anda plakalar şalelerden çıkartılmış ve tekrar saç kurutma makinesi ile kurutulmuştur. TLC sonucunda plakalar UV ışık altında incelenmiştir (Uludağ, 2000).



Şekil 3.5: TLC işlemi.

3.2.5 İmmobilize Tohumların Ekimi

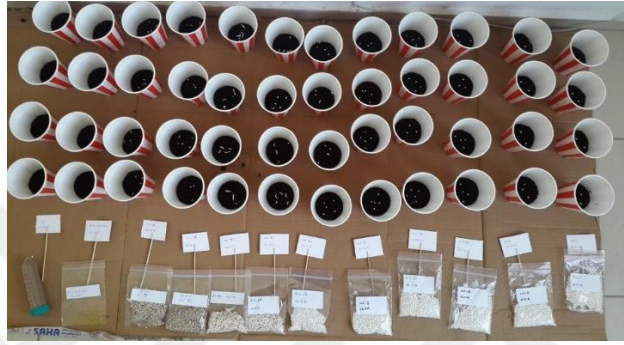
Kontrol grubu da dâhil olmak üzere 10 farklı şekilde immobilize edilmiş ön muameleden geçmemiş ve geçmiş olan tohumların tamamı Kayseri'deki Megasol firmasından temin edilmiş vermikomposta ekilmiştir.

Önceki çalışmaların ve salep orkidelerinin doğal koşullarda çimlenme şartlarının ışığında; salep tohumlarının toprak yüzeyinden 6-8 cm derinliğine gömülmesi gerektiği görülmüştür. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz immobilize tohumların ekimi için de aynı şartları sağlamak amacıyla yaklaşık 15 cm boyunda kâğıt bardaklar temin edilmiştir. Kâğıt bardakların üst kısmından 7 cm'lik boşluk kalacak şekilde vermikompost bardakların tabanına doldurulmuştur. Vermikompostun üstüne immobilizasyonla oluşturduğumuz tohumlu beadler ve tohumların nerede olduğunu anlayabilmek için küçük tahta çubuklar yerleştirilmiştir.

Ön işleminden geçmemiş tohumların beadleri; steril vermikompost ve steril olmayan vermikomposta olmak üzere 2 farklı şekilde ekilmiştir. Bu ekim işlemi 22.12.2016 tarihinde gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılmış bardaklar Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesinde, sıcaklığı ve nemi optimuma ayarlanmış olan odalarda tutulmuştur. Ön

işlemden geçirilmiş olan tohumların beadleri direkt olarak steril edilmemiş vermikomposta ekilmiştir. Bu ekim işlemi 25.01.2017 tarihinde gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılmış bardaklar Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesinde, sıcaklığı ve nemi optimuma ayarlanmış olan odalarda tutulmuştur.

Ekim yapılmış bardaklara uygun aralıklarla yaklaşık olarak vermikompostun üst kısmının 2-3 cm'lik bölümü kuruduğunda sulama yapılmıştır.



Şekil 3.6: Ekim işleminin gerçekleştirilme şekli.



Şekil 3.7: Ekim işlemi gerçekleştirilip etiketlenmiş bardaklar.

4. BULGULAR

4.1 İmmobilizasyon İşleminin Sonuçları

Salep orkidesi tohumları ile 10 farklı karbonhidrat kaynağının immobilizasyon işlemi ile bir araya getirilme işlemi başarıyla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1: Ön işlemden geçirilmemiş tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.



Şekil 4.2: Ön işlemden geçirilmiş 1. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.



Şekil 4.3: Ön işlemden geçirilmiş 2. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.



Şekil 4.4: Ön işlemden geçirilmiş 3. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.



Şekil 4.5: Ön işlemden geçirilmiş 4. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.



Şekil 4.6: Ön işlemden geçirilmiş 5. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.



Şekil 4.7: Ön işlemden geçirilmiş 6. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.



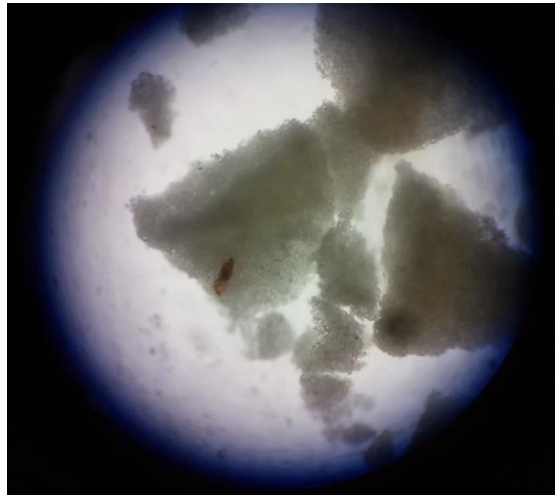
Şekil 4.8: Ön işlemden geçirilmiş 7. Grup tohumlarla gerçekleştirilen immobilizasyon sonucu elde edilen beadler.



Şekil 4.9: İmmobilizasyonla oluşturulmuş beadler ve üzerlerinde görünen siyah noktalar salep tohumları.



Şekil 4.10: Kontrol grupları için immobilizasyonla oluşturulmuş beadler ve üzerlerinde görünen siyah noktalar salep tohumları.


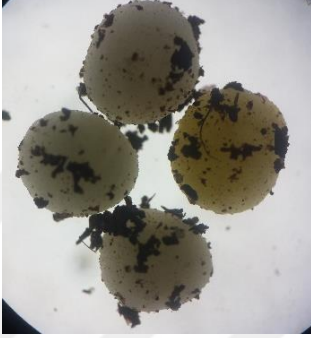
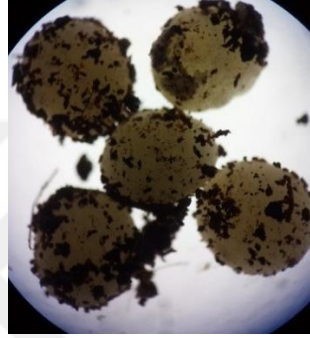


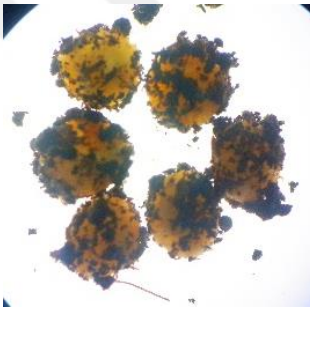




Şekil 4.11: İmmobilizasyonla oluşturulmuş beadlerin parçalanmasıyla görülen salep tohumu.

4.2 Beadlerin Vermikompostta Erime Süresi

Gerçekleştirilen araştırmanın anlamlı bir çalışma olması açısından salep orkidesi tohumları ve karbonhidratlarla oluşturulmuş beadlerin vermikompost içinde belirli bir süre sonunda çözünmesi gerekmektedir. Bu çözünmenin anlaşılabilmesi için küçük bir deneme kurulmuştur. Deneme sonucu Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1: Beadlerin 14 gün içinde vermikompost içinde çözünme durumları.

		
0.Gün	2.Gün	4.Gün
		
6.Gün	8.Gün	10.Gün
		
12.Gün	14.Gün	

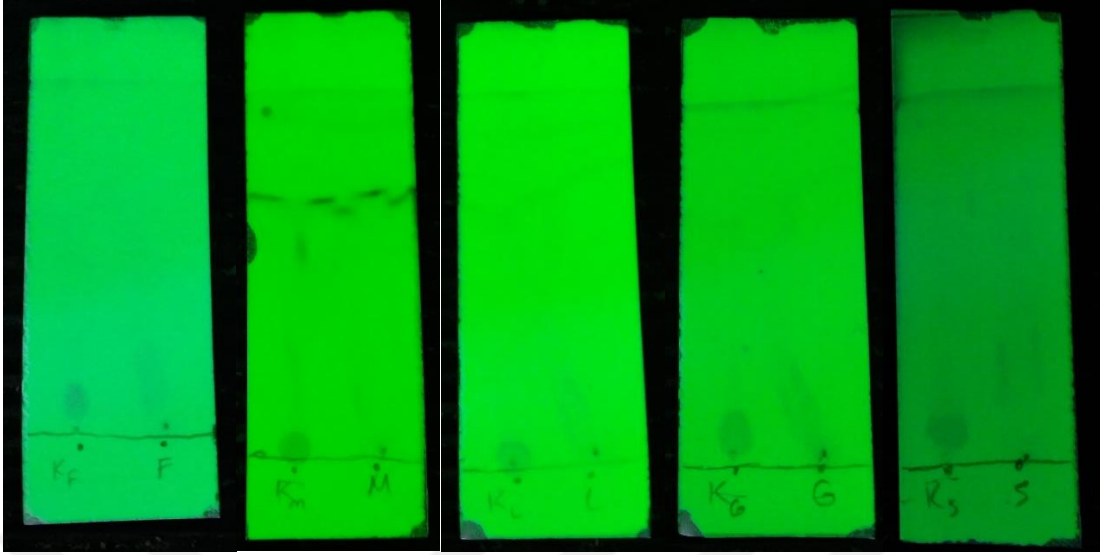
Deneme için tıpkı araştırma kapsamında vermikomposta ekilen beadler gibi 7 bardağa da bead ekimi gerçekleştirilmiştir. 7 bardağa daha ekilen beadlerin çözünme sürelerini anlamak için 2'şer gün arayla bu bardaklar boşaltılmış ve beadlerin son durumları mikroskop altında incelenmiştir. Kullanılan beadler ise kontrol grubu için oluşturulmuş nişasta ve başka bir karbonhidrat içermeyen HİS-KONTROL grubu beadler ve sükroz içeren HİS-I grubu beadlerdir.

4'er gün arayla açılan bardakların içinden çıkan beadlerin mikroskopta incelenmesiyle beadler 14 gün sonunda dokunulduğunda dağılan bir hal almıştır. Oluşturdukları andan itibaren oldukça sert olan bu beadler, vermikompost içine ekildikten ve belirli aralıklara sulandıktan 14 gün sonra kolayca dağılabilir bir forma kavuşmuşlardır. Sürecin sonunda beadlerin ilk oluştukları andaki standart boyutlarında zamanla çözünmeye bağlı olarak küçüldüğü görülmüştür. Yine zamanla çözünmeye bağlı olarak beadlerin yüzeyinde girinti ve çıkıntılar oluştuğu gözlemlenmiştir.

4.3 İmmobilizasyon Başarısının TLC ile Belirlenmesi

İmmobilizasyon işleminde kullanılan şekerlerin başarılı bir şekilde tohumlarla bir araya getirilip getirilmediğini anlamak için; bead oluşumunu sağlayan ve beadlerin içinde bulunduğu CaCl_2 çözeltilerinden örnek alınarak standart çözeltiler ile birlikte TLC gerçekleştirilmiştir. TLC sonunda plakalar UV ışık altında incelenmiştir.

TLC sonunda plakalardan elde edilen spot görüntüleri standart çözeltilerdeki şeker miktarının immobilizasyon sıvısına kıyasla çok daha yoğun şeker içerdiği ve immobilizasyon işleminin çok az şeker kaçağı ile sonuçlandığını göstermektedir.



Şekil 4.12: TLC sonunda elde edilen görüntüler.

Şekil 4.12’de görüldüğü gibi K ile kodlanan kısımlara standart çözeltiler yüklenmiştir. F, M, L, G ve S ile kodlanan noktalara ise immobilizasyondan elde edilen sıvılar yüklenmiştir. K ile kodlanan noktadaki belirgin spotun örneklerde olmadığı görülmektedir. Standarda göre örnek yüklenen noktada ve noktanın hizasında belirgin bir spot görülmemektedir. TLC sonunda elde edilen bu görüntülere göre; fruktoz, mannitol, laktoz, glukoz ve sükrozun immobilizasyon işlemi kaçaksız bir şekilde gerçekleşmiştir.

4.4 İmmobilize Edilmiş Salep Tohumlarının Çimlenme Performansı

İmmobilizasyon işlemi ile tohumlarla çeşitli karbonhidrat kaynakları başarılı bir şekilde bir araya getirilmiştir. İmmobilizasyon sonucu elde edilmiş beadlerin ekildiği kâğıt bardaklardan söküm işlemi; ön işlemden geçmemiş tohumlar için 20.04.2017 tarihinde, ön işlemden geçmiş tohumlar için 20.05.17 tarihinde başlanılmıştır. Ekim yapılmış tüm bardaklar tek tek incelenmiştir.

Söküm işlemi sonunda oluşturulan gruplar için herhangi bir çimlenme ya da bir protokorm oluşumu gözlemlenememiştir. Sökümler sırasında vermikompost içinde çözünmemiş beadlere de rastlanılmamıştır. Beadlerin yerinin kolayca belirlenebilmesi

için yerleştirilen küçük tahta çubuklar dahi süre sonunda vermikompost içinde çözülmüş ve sökümler sırasında bu tahta çubuklara da rastlanılmamıştır.

Çizelge 4.2.: İmmobilize tohumların çimlenme durumları (- : Çimlenme gözlemlenmedi.).

İmmobilize Tohum Grupları	Çimlenme Durumu	İmmobilize Tohum Grupları	Çimlenme Durumu
HİS-I	-	HİS-I/4	-
HİS-II	-	HİS-II/4	-
HİS-III	-	HİS-III/4	-
HİS-IV	-	HİS-IV/4	-
HİS-V	-	HİS-V/4	-
HİS-VI	-	HİS-VI/4	-
HİS-VII	-	HİS-VII/4	-
HİS-IX	-	HİS-IX/4	-
HİS-X	-	HİS-X/4	-
HİS-KONTROL	-	HİS-KONTROL/4	-
HİS-I/1	-	HİS-I/5	-
HİS-II/1	-	HİS-II/5	-
HİS-III/1	-	HİS-III/5	-
HİS-IV/1	-	HİS-IV/5	-
HİS-V/1	-	HİS-V/5	-
HİS-VI/1	-	HİS-VI/5	-
HİS-VII/1	-	HİS-VII/5	-
HİS-IX/1	-	HİS-IX/5	-
HİS-X/1	-	HİS-X/5	-
HİS-KONTROL/1	-	HİS-KONTROL/5	-
HİS-I/2	-	HİS-I/6	-
HİS-II/2	-	HİS-II/6	-
HİS-III/2	-	HİS-III/6	-
HİS-IV/2	-	HİS-IV/6	-
HİS-V/2	-	HİS-V/6	-

HİS-VI/2	-	HİS-VI/6	-
HİS-VII/2	-	HİS-VII/6	-

Çizelge 4.2.: (Devam) İmmobilize tohumların çimlenme durumları (- : Çimlenme gözlemlenmedi.).

HİS-IX/2	-	HİS-IX/6	-
HİS-X/2	-	HİS-X/6	-
HİS-KONTROL/2	-	HİS-KONTROL/6	-
HİS-I/3	-	HİS-I/7	-
HİS-II/3	-	HİS-II/7	-
HİS-III/3	-	HİS-III/7	-
HİS-IV/3	-	HİS-IV/7	-
HİS-V/3	-	HİS-V/7	-
HİS-VI/3	-	HİS-VI/7	-
HİS-VII/3	-	HİS-VII/7	-
HİS-IX/3	-	HİS-IX/7	-
HİS-X/3	-	HİS-X/7	-
HİS-KONTROL/3	-	HİS-KONTROL/7	-

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Salep orkideleri pek çok tür bakımından Türkiye’de endemik olarak yetişen ve ticari getirisi oldukça fazla olan önemli bir gen kaynağıdır. Salep, orkidelerinin kültüre alınması açısından bazı zorluklarla karşılaşılan, kültürü yapılsa dahi yumru oluşumu için toprağa şaşırtma ekimi yapılırken kayıpların yaşandığı ve doğadan toplanarak elde edildiği için de bazı türlerin nesli tehlike altına girmiştir. Bu nedenle salep orkideleri için yeni yetiştirme metotlarının bulunması ve kültüre alma çalışmaları oldukça önemlidir. Biz gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada salep orkidelerinin kültür ortamlarında değil, doğal olarak yetiştikleri ortama çok daha benzer bir ortamda yetiştirilmeleri için yeni bir bakış açısı ile yaklaşılmıştır. Çalışmanın temelinde salep orkidesi tohumlarının endosperm dokusunun var olmamasından yola çıkılarak, tohumlara yapay bir endosperm oluşturulması hedeflenmiştir. Bu bağlamda farklı karbonhidrat kaynakları ile tohumlar immobilizasyon metodu ile bir araya getirilmiştir. Denemeler sonunda immobilizasyon işleminde başarıya ulaşıldığı fakat çimlenmenin gerçekleşmediği görülmüştür.

Salep orkidelerinin tohumlarının çimlenmelerinin büyük ölçüde mikorizal funguslara bağlı olduğu konunun uzmanları tarafından benimsenmiştir. Salep orkidelerindeki mikorizal fungusların izolasyonu ve tanımlanması ile ilgili birçok çalışma literatüre kazandırılmıştır. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada başarılı olamayışımızın yegâne sebeplerinden biri bu funguslardan yararlanmamış olmamız olabilir. Konu ile ilgili ileride yapılacak çalışmalarda tohumlara eklenen karbonhidratların yanında bu mikorizal funguslara da yer verilmesi tohumların çimlenme ihtimalini yükselteceği düşünülmektedir.

Salep orkidesi tohumlarının oldukça küçük olması nedeniyle çimlenmeyi in-situ ortamda gözlemlemek oldukça zordur. Konu ile ilgili birçok çalışma in-vitro koşullarda yürütülmüştür. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada tohumlar ile karbonhidrat kaynakları immobilizasyon ile bir araya getirilmiş ve oluşan beadler ile tohumlar daha elle tutulur bir hal almıştır. Fakat oluşan beadlerdeki tohum miktarı ve bu tohumların

içinde embriyo olup olmadığı (sadece tohum kabuğu olup olmadığı) belirlenememiştir. Çalışmada bardaklara ekim sırasında özellikle beadlerin dışında tohum olup olmadığı incelenmiş ve üzerinde belirgin bir şekilde tohum görünen beadler denemeye alınmıştır. Yine de tohumların çok küçük boyutta olması beadlerin vermikompost içinde çözünmesinden sonra gözlenmesi açısından sıkıntı yaratmıştır.

Bozdemir (2016)'in yaptığı çalışmalara göre *O. sancta* türünü in vitro'da çimlendirme, protokorm oluşumu ve sürgün gelişimi açısından çalışmada kullanılan beş şeker tipi arasından en iyi performans veren şekerleri ve bu şekerlerin konsantrasyonlarını belirlemiştir. Çimlendirmede, çalışmada kullanılan beş şeker tipi arasından en iyi performans maltoz, arkasından sükrozdan almıştır, protokorm oluşumu için sükroz ve sürgün oluşumunda öncelikle fruktoz, sonrasında sükroz, en son glukoz performans gösteren şekerler olmuştur. Dozlar açısından bakıldığında ise 20 ve 40 g/l olan düşük şeker dozlarının çimlenme ve protokorm gelişimine olumlu etki yaptığı gözlemlenmiştir. Yapılacak olan başka çalışmalarda şeker konsantrasyonu olarak 20 ve 40 g/l dozlar önerilmiştir. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada damlatma sıvısı olarak kullanılan 50 ml'lik çözelti içine 4 gr karbonhidrat kaynakları kullanılmıştır. Kullandığımız oran Bozdemir'in yapmış olduğu deneylerin sonucuna göre çoğu şeker için çimlenmeyi engelleyen bir doz olduğu görülmektedir. Denemeler sonucunda herhangi bir çimlenmenin gözlemlenmemiş olması da bu yüksek şeker konsantrasyonundan da kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bozdemir'in (2016) yaptığı çalışmanın belirli bir türü kapsadığı da göz önünde bulundurularak; denemelerin daha düşük şeker dozuyla kurulursa bizim kullandığımız türler üzerinde de başarıya ulaşılabileceği düşünülmektedir.

Kullandığımız immobilizasyon yöntemi asıl olarak bakteri immobilizasyonu işleminde kullanılmaktadır. Kullanılan metodun bakteri immobilizasyonunda başarılı olması ve bakterilere herhangi bir zarar vermiyor oluşu yaptığımız deneylerde bu metodun kullanılmasına olanak sağlamıştır. Deney sonucunda herhangi bir çimlenmenin gözlemlenmemiş olmasının immobilizasyon yöntemi ile ya da immobilizasyon işleminde kullanılan çözeltiler ile ilgili olmadığını göstermektedir.

Bardaklara ekimi gerçekleştirilmiş olan tohum ve şeker kaynağı içeren beadler ekimden yaklaşık 4 ay sonra sökülmüştür. Geçen bu 4 ay yapılan literatür araştırması sonucunda

yaklaşık olarak tespit edilmiştir. Salep orkidelerinin çimlenme süresi türden türe fark göstermektedir. Çoğu tür için çimlenme 3-9 ay içerisinde gerçekleşmekte fakat ergin bir bitki oluşumu yıllar almaktadır.

Araştırma için doğadan toplanan salep orkidelerinin tür analizi yapılmamıştır. Tür analizi yapılmadığı için yaklaşık çimlenme zamanı literatürde yapılan araştırmalar sonucunda belirlenmiştir. Yaklaşık olarak tespit edilen süre ortalama bir değer olarak uygun olsa da ileriki çalışmalar için tür için spesifik çalışmalar yapılması daha uygun görülmektedir.

Literatürde yapılan araştırmalar sonucunda karbonhidrat immobilizasyonu ile ilgili herhangi bir kaynağa ulaşılamamıştır. Yaptığımız çalışma sonucunda çeşitli şeker kaynaklarının immobilizasyonunun mümkün olduğu görülmüştür. Bu sayede literatüre yeni bir araştırma konusu kazandırılmıştır.

Çalışma sonunda kontrol amaçlı gerçekleştirilen TLC ile oluşan beadlerden herhangi bir şeker sızıntısı olmadığı, şeker sızıntısı olsa dahi çok küçük miktarlarda olduğu görülmüştür. Bu da seçilen yöntemin şeker tutuklamadaki başarısını göstermektedir.

İn vitro ve tohumla yapılan çalışmalarıyla salep orkidelerinin çoğalmasını sağlamanın yanında salep orkidelerinin doğal yetiştirme alanlarında yaşayan halkın bilgilendirilmeleri ve bitkinin doğal alanlarından sökülmesinin önlenmesi de salep orkideleri için büyük önem taşımaktadır.

Sonuç olarak salep orkideleri hakkında gerçekleştirilen her çimlendirme ve çoğaltma çalışması ile verimin elde edildiği her metot, önce laboratuvar, devamında doğal habitata adaptasyon aşamasında, tür devamlılığı için kilit görevindedir. Bu tip çalışmaların gerçekten üretime ve çoğaltmaya yönelik başarı ile sonuçlanması için sadece laboratuvar ortamında sınırlı kalmayıp, özellikle dışarıya adaptasyon sorununun çözülmesi konusunda durulmalı ve bu tip çalışmaların artırılması yönünde çalışmalar çoğaltılmalıdır. Bitki elde edilen türlerde daha ucuz ve basit ortamlarda başarı durumunun incelenerek artırılması, böylece ticari olarak uygulanabilme potansiyelinin yükseltilmelidir. Konuya ticari olarak bakıldığında, üretim miktarı kadar, kısa zamanda seri üretimin de önemli olduğu gerçeği bilinmektedir. Bu bilgiler ve uygulamalar ışığında salep orkideleri doğada varlıklarını ve ticari değerini sürdürebilirler.



6. KAYNAKLAR

- Ackerman, E., 2006. Functionalized nanopores promote enzymatic activity. Pacific Northwest National Laboratory. US. LabTalk.
- Aewsakul, N., Maneesorn, D., Serivichyaswat, P., Taluengjit, A. and Nontachaiyapoom, S., 2013. Ex vitro symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates. *Scientia Horticulturae*, Volume 160, Pages 238-242.
- Arancon, N. ve Edwards, C.A., 2005. Effects of vermicomposts on plant growth. International Symposium Workshop on Vermitechnology. Philippines.
- Arditti, J., 1967. Factors affecting of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33,1-97.
- Arditti, J. ve Harrison, C.R., 1977. Vitamin requirement and metabolism in orchids. 6. *Orchid Biology: Review and Respectives*. Cornell University Press, 160-175 pages, Ithaca, NY.
- Arı, E., 2000. Orkideler Türkiye'deki Mevcut Durum. *Derim*, 17(3): 136-152.
- Arslan, N., 2011. Ankara ve Civarı Orkidelerinin Sistematik ve Korolojik Yönden İncelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Osmangazi Üniversitesi. Eskişehir.
- 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. Samsun.
- Azarmi, R., Giglou, M.T. ve Talesmikail R.D., 2008. Influence of vermicompost on soil chemical and physical properties in tomato (*Lycopersicum esculentum*) field. *African Journal of Biotechnology*, 7 (14), 2397-2401.
- Barley, K.P., 1961. Plant nutrition levels of vermicast. *Advences in Agronomy*, 13, pp.251.
- Barroso, J., Fevereiro, P., Oliviera, M.M. ve 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.
- Baytop, T. ve Sezik, E., 1968. Türk Salep Çeşitleri Üzerinde Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 4: 61.
- Bickerstaff, G.F., 1997. Immobilization of Enzyme as the 21 st Century Begins. *Immobilization of Enzyme and Cells*, Humana Press, Vol.1; pp.1-13. Totowa, New Jersey.
- Bozdemir, H., 2016. *Orchis Sancta* L. Türünün In Vitroda Çoğaltılması Üzerine Farklı Konsantrasyonlardaki Karbon Formlarının Etkisi. (Doktora Tezi), Siirt Üniversitesi. Siirt.
- Bozkurt, N., 2012. Orkide Salepgiller. Türkiye Orkideleri. Faruk Akbaş, Say Yayınları, 96-110. İstanbul.
- Brena, B.M. ve Batista-Viera F., 2006. Immobilization of enzymes. *Methods in biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*. Second edition edited by: J. M. Guisan. Humana Press Inc., Vol.2; pp.15-30. Totowa, NJ.

- Bryan, H.H. ve Lance C.J., 1991. Compost trialson vegetables and tropical crops. *Biocycle*, 32, 36-37.
- Campbell, K.L., McIntyre, I.W. ve Macarthur, R.A., 1999. Fasting metabolism and thermoregulatory competence of the star nosed mole. *Condylura cristata*. *Comp. Biochem. Physiol*, 123A, 293-298.
- Chen, L. G., Liu, Z.L. ve Zhuo R.X., 2005. Synthesis and properties of degradable hydrogels of konjac glucomannan grafted acrylic acid for colon-specific drug delivery. *Polymer*, 46: 6274-6281.
- Clements, M.A., Muir, H. ve Cribb, P.J., 1986. A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bulletin*, 41(2): 437-445.
- Costa, S.A., Azevedo, H.S. ve Reis, R.L., 2004. Enzyme immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications. *Crc Press*, pp.301–324.
- Çağlayan, K., Özavcı, A. ve Eskalen, A., 1998. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaygın olarak yetişen bazı salep orkidelerinin embriyo kültürü kullanılarak in vitro koşullarda çoğaltılmaları. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22, 187-191.
- Çığ, A. ve Yılmaz H., 2014, Bazı Orkide Türlerinde Farklı Yöntemlerle İzole Edilen Funguslar. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 1(1), 24 – 28.
- Dickerson, G.W., 2004. Vermicomposting. Cooperative Extension Service. College of Agriculture and Home Economics. New Mexico State University. http://aces.nmsu.edu/pubs/_h/H164.pdf, (27.05.2018).
- Demir, P., 2004. Türkiye'de Ağaçlandırmada Kullanılan Bazı *Juniperus* Türlerinin Çimlenme Sorunlarına Pratik Çözüm Yöntemleri Konusunda Bir Araştırma. (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi. Ankara.
- Doğan, M. ve Kayacı, A. 2004. Rheological properties of reconstituted hot salep beverage. *International Journal of Food Properties*, 7(3), 683-691.
- Edwards, C.A., 1988. Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms. *SPB Academic Publishing*, 21-31.
- Edwards, C.A. ve Bohlen, P.J., 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. 3rd. Edition Chapman and Hall, 39-40. New York.
- Erdem, H.E., 2004. Biyolojik çeşitliliğinin ekonomik değerinin belirlenmesi, yabancı orkide örneği. (Yüksek Lisans Tezi), Ege Üniversitesi. İzmir.
- Ernst, R. ve Arditti, J., 1990. Carbohydrate physiology of orchid seedlings, III. Hydrolysis of maltooligo saccharides by *Phalaenopsis (Orchidaceae)* seedlings. *American Journal of Botany*, 77(2), 188-195.
- Erzurumlu, G.S. ve Doran, İ., 2011. Türkiye'de salep orkideleri ve salep kültürü. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(1), 29-34.
- Farhoosh, R. ve Rıazi, A., 2007. A compositional study of two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. *Food Hydrocolloid*, 21, 660–666.
- Galleger, A.V. ve Wollenhaupt, N.C., 1997. Surface alfalfa residue removal by earthworms *L. Terrestris* in a no-till agroecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 29, 419-471.
- Gezgin, Y., 2004. Çeşitli salep orkide türlerinde mikoriza oluşturan fungusların izolasyonu ve tanımlanması ile inokulant olarak kullanım olanaklarının incelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Ege Üniversitesi. İzmir.

- Gouin, F.R., 1998. Using compost in ornamental horticulture industry. In: Beneficial co-utilization of agricultural municipal and industrial bioproduct. Brown S. Angle J.S., Jacobs L., Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp. 131-138.
- Guisan, J.M., 2006. Method in biotechnology: Immobilization of enzymes and cells. Humana Press, 2nd Ed. 450 pages.
- Güler, N., 1997. Edirne çevresindeki *Orchis L. (Orchidaceae)* türleri üzerinde morfolojik, sistematik, korolojik, karyolojik ve palinolojik araştırmalar. (Yüksek Lisans Tezi), Trakya Üniversitesi. Edirne.
- Gümüş, C., 2009. Batı Karadeniz Bölgesi'nde salep elde edilmesinde kullanılan bazı orkide türlerinin (*Orchidaceae*) çoğaltım yöntemleri üzerinde araştırmalar. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi. Ankara.
- Hartenstein, R. ve Mitchell, M.J., 1978. Utilization of earthworms and microorganisms in stabilization, decontamination and detoxification of residual sludges from treatment of wastewater. Final report, 34. Springfield. Virginia.
- Harvais, G., 1973. Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture. Canadian Journal of Botany, 51, 327-332.
- Ingold, C.T. ve Hudson, H.J., 1993. The biology, Sixth Edition, Chapman Hall, 224. London.
- İşler, S., 2005. Van Salebinin Menşei ve Van Civarının Orkideleri. (Doktora Tezi), Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Van.
- Kamçı, H. ve Karakuş, B., 2015. *Orchis sancta L.* tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlenme, protokorm oluşumu ve bitkiye dönüşümü üzerine araştırmalar. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi (DUFED), 4(1), 24-30.
- Kale, R.D., Mallesh, B.K. ve Bagyarj D.J., 1992. Influence of vermicompost application on the available macro nutrients and selected microbial population in a paddy field. Soil Biology and Biochemistry, 24, 1317-1320.
- Kasperek, M. ve Grimm, U., 1999. European Trade in Turkish Salep with Special Reference to Germany. Economic Botany, 53(4), 396-406.
- Kennedy, J.F., 1995. Handbook of enzyme technology, in principles of immobilization. 3rd Edition, Wiseman, A., Ed., Prentice Hall Ellis Harwood, p. 235, New York.
- Kreutz, C.A.J., 2000. Flora of Turkey and East Aegan Islands. University Press, Vol:11. Edinburgh.
- Kreutz, C.A.J., 2009. Türkiye Orkideleri, Rota Yayın Yapım Tanıtım Ticaret Limited. Şirketi, İstanbul.
- Lauzer, D., St-Arnaud, M. ve Barabe, D., 1994. Tetrazolium staining and *in vitro* germination of mature seeds of *Cypripedium acaule (Orchidaceae)*. Lindleyana: The Scientific Journal of The American Orchid Society, 32(6), 408-412. http://www.academia.edu/13279752/Tetrazolium_staining_and_in_vitro_germination_of_mature_seeds_of_Cypripedium_acaule_Orchidaceae_ (son erişim: 03.05.2018)
- Lauzer, D., Renaut, S., St-Arnaud, M. ve Barabe D., 2007. *In vitro* asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. Ex Willd.) Torr. (*Orchidaceae*). Journal of the Torrey Botanical Society, 134(3), 344-348.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. ve Fernandez Lafuente, R., 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme and Microbial Technology, 40, 1451-1463.

- Mead, J.W. ve Bulard, C., 1975. Effects of vitamins and nitrogen sources on asymbiotic germination and development of *Orchis laxiflora* and *Ophrys sphegodes*. *New Phytologist*, 74(1), 33-40.
- Meyer, W.J. ve Bouwman, H., 1997. Anisopary in Compost Earthworm reproductive strategies (*Oligocheata*). *Soil Biology and Biochemistry*, 29 (3-4), 731-735.
- Mısırlıoğlu, M., 2011. Toprak Solucanları Biyolojileri, Ekolojileri ve Türkiye Türleri. Nobel Yayınları, No: 1636, 92 s, Ankara.
- Mulchandam, A. ve Rogers, K.R., 1998. *Methods in Biotechnology. Enzyme and Microbial Biosensors Techniques and Protocols Humana Press Inc. New Jersey., Vol.6; pp.199–223.*
- Önal, K., 1999. Ege bölgesinde doğal yayılış gösteren *Orchidaceae* familyasına ait bazı türlerin in-vitro koşullarda üretimleri üzerinde araştırmalar. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23, Ek Sayı:5, 1057-1064.
- Özdener, Y., 1994. *Dactylorhiza Urvilleana(Steudel) Bauman* ve Künkele ve *D. İberica (Bieb.Exwild)Soo (Orchidaceae)* türlerinin köklerinden fungusların izole edilmesi, bu türlere ait tohumların simbiyotik ve asimbiyotik kültür ortamlarında çimlenme ve gelişmesi üzerinde bir araştırma. (Doktora tezi), On Dokuz Mayıs Üniversitesi. 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, Samsun.
- Persson, M., Wehtje, E., ve Adlercreutz, P., 2000. Immobilisation of lipases by adsorption and deposition: high protein loading gives lower water activity optimum. *Biotechnology Letters*, 22, 1571-1575.
- Ruglup, A., Chavez, V. ve Martinez, A., 1989. In vitro seed germination and reintroduction of *Bletia urbana (Orchidaceae)* in its natural habitat. *Lindleyana: The Scientific Journal of The American Orchid Society*, 4 (2), 68-73.
- Sandal, G., 2009. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetişen orkideler ve yetiştirme ortamı nitelikleri ile tehdit faktörlerinin araştırılması. (Doktora tezi), Çukurova Üniversitesi. Adana.
- Sazak, A., 2004. Bazı orkide türlerine ait tohumların asimbiyotik ve simbiyotik olarak çimlendirilmesi ve fide gelişimi. (Yüksek Lisans Tezi), On Dokuz Mayıs Üniversitesi. Samsun.
- Sezik, E., 1984. Orkidelerimiz, Türkiye'nin orkideleri. Sandoz Kültür Yayınları, No: 6, 166.
- Sezik, E., 2002. *Acta Pharmaceutica Turcica*. 44, 151-157.
- Sezik, E. ve Baykal, T., 1988. Maraş salebinin menşei ve maraş civarının orkideleri. TÜBİTAK, Temel Bilimler Araştırma Grubu, Proje No: TBAG 664.
- Sezik, E., İşler, S., Güler, N., Orhan, Ç., Aybeke, M., Deniz, İ.G., ve Üstün O., 2007. Salep ve Orkidelerin Tahribi. TÜBİTAK Araştırma Projesi Raporu, TBAG-Ç-SEK/23 (103T008), Ankara.
- Sgarbi, E., Del Prete, C., Ronconi, L., Dallai, D. ve Perini, C., 2001. Wild Italian orchids: From seed to plant experience in a project for in situ reintroduction and ex situ conservation. *Planta Europa Conference III, Pruhonice, Czech Republic.*
- Sheldon, R.A., 2010. Cross-Linked enzyme aggregates (CLEAs) as industrial biocatalysts. *Biocatalysis challenges for Pharmaceuticals and fine chemicals.*

- SCIN HQ, London. Delft University of Technology CLEA Technologies B.V., 2; 1831–2000.
- Schoebitz, M., Ceballos, C. ve Ciampi, L., 2013. Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13 (1), 1-10.
- Sulkowski, E. ve Laskowski, M., 1974. Venom Exonuclease (Phosphodiesterase) Immobilized on Concanavalin-A-Sepharose. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 57, 463-468.
- Süberoğlu, N., 1987. Saleplerin Tohumla Üretilmeleri. (Yüksek Lisans Tezi), Ege Üniversitesi. İzmir.
- Tamer, C. E., Karaman, B. ve Copur, O. U., 2006. A traditional Turkish beverage: salep. *Food Reviews International*, 22, 43–50.
- Tanaka, A. ve Kawamoto, T., 1999. Cell and Enzyme Immobilization. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed: Demain A. L. ve Davies J. E.. American Society for Microbiology. Washington.
- Tekinşen, K.K., 2006. Salep. *Bilim ve Teknik*. (453):76-77.
- Tekinşen, K. K. and Güner A., 2010. Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some Orchidaceae species. *Food Chemistry*, 121, 468-471.
- Telcioğlu, A. ve Kayacıer, A., 2007. The effect of sweeteners and milk type on the rheological properties of reduced calorie salep drink. *African Journal of Biotechnology*, 6(4), 465-469.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 1-305.
- Uludağ, Y., 2000. İmmobilize Glukoamilaz ile Maltodektrinden Glukoz Üretimi. (Yüksek Lisans Tezi), Gebze İleri teknoloji Enstitüsü. Gebze.
- Vahıd, S., Hossein, J. ve Mohammad S.Y., 2011. A comparison of various models for obtaining the intrinsic viscosity of salep gum and sweeteners mixture in dilute solutions. *International Food Research Journal*, 18(4), 1457-1462.
- Valletta, A., Attorre, F., Bruno, F. ve Pasqua, G., 2008. In vitro asymbiotic germination of *Orchis mascula* L. *Plant Biosystems*, 142, 653– 655.
- Vudala, S.M. ve Ribas, L.L.F., 2017. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany*, 108, 1–7.
- Yararbaş, R.T., 2008. Bazı Orkide Türlerinin İn Vitro Koşullarda Çoğaltılması, Çiçeklenmesi. (Doktora Tezi), Ege Üniversitesi. İzmir.
- Zeng, Z. P., 1982. Earthworm Culture. Hubei People's publishing house, Wuhan, 1-146. China.

7. ÖZGEÇMİŞ

İsim: Hatice Nur GİRGIN

Kişisel Bilgiler:

Doğum Tarihi: 07.05.1992

Doğum Yeri: Eskişehir

Gsm : (505) 588 06 92

E-mail : haticenurgirgin@gmail.com

Eğitim:

Yüksek Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, 2015-devam

Tez Konusu: Anadolu'da Yetişen Salep Orkidesi Tohumlarının İmmobilize Edilerek Çimlenebilir Hale Getirilmesi (Gaziosmanpaşa Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenmektedir. Proje No:2016/83)

Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü 2011- 2015 Ortalama: 79,51

Tez Konusu: İmmobilize Bakterilerin Kullanımıyla Zeytin Fabrikaları Atık Suyunun (Zeytin Karasuyunun) Fenolik Bileşiklerden Arındırılması

Önlisans: Atatürk Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi, İş Sağlığı ve Güvenliği, 2016-devam

Katıldığım Kongre ve Seminerler:

- 18th International Biomedical Science & Technology Symposium – Eylül 2012; Gaziosmanpaşa Üniversitesi; Tokat/Türkiye.
- Biyomühendislik Öğrenci Kongresi – Nisan 2013; Gaziosmanpaşa Üniversitesi; Tokat/Türkiye.
- Cerrahların Problemlerine Mühendislerle Ortak Çözüm Arayışları – Ocak-Mayıs 2013; Gaziosmanpaşa Üniversitesi; Tokat/Türkiye.
- II. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi – Mart 2014; Ege Üniversitesi; İzmir/Türkiye (Poster yarışmasında “Pseudomonas Putida İle Patlamamış Mayınların Tespiti” başlıklı poster ile birincilik ödülü).
- PZR Temelli Moleküler Yöntemler Çalıştayı - Mayıs 2016; Amasya Üniversitesi; Amasya/Türkiye.
- Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler Yaz Okulu – Haziran 2016; Hacettepe Üniversitesi; Ankara/Türkiye.

Staj Deneyimlerim:

- 1- Akhisar Özel Doğu Hastanesi – 2013 Yaz Stajı – Biyokimya Laboratuvarı (Gönüllü stajyerlik)
- 2- Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü – 2014 Yaz Stajı – Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı (Doç. Dr. E. Esin HAMEŞ)
- 3- Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü – 2014 Yaz Stajı – Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı (Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY)
- 4- İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü – 2014 Yaz Stajı – Kanatlı Hastalıkları Bölümü
- 5- Anadolu Üniversitesi Biyoloji bölümü – 2017 Şubat – Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı (Gönüllü stajyerlik) (Doç. Dr. Emel ERGENE)

Sınav Bilgileri:

YÖKDİL (YÖK – 07.2017): 65

KPSS (ÖSYM - 05.2016 Kamu Personeli Seçme Sınavı): 73,87

YDS (ÖSYM - 03.2016 Yabancı Dil Sınavı): 56,25

ALES (ÖSYM - 11.2014 Akademik Personel ve Lisansüstü Eğitimi Giriş Sınavı): 72,73

Referanslar:

1- Prof. Dr. İsa KARAMAN (Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Öğretim Elemanı)

Tel: 0530 664 7415 (Dahili: 3032) e-posta: isa.karaman@gop.edu.tr

2- Prof. Dr. İsa GÖKÇE (Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Bölüm Başkanı)

Tel: 0535 594 1204 (Dahili: 2909) e-posta: isa.gokce@gop.edu.tr