

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE ÇEVRESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN
BAZI SALEP ORKİDELERİNİN FARKLI BESİN
ORTAMLARINDA *IN VITRO* ÇOĞALTIMI

Yasemin KEMEÇ

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 10/07/2015

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Cüneyt AKI

ÇANAKKALE

Yasemin KEMEÇ tarafından Prof. Dr. Cüneyt AKI yönetiminde hazırlanan ve 10/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “Çanakkale Çevresinde Yayılış Gösteren Bazı Salep Orkidelerinin Farklı Besin Ortamlarında *In Vitro* Çoğaltımı” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Cüneyt AKI

.....

Başkan

Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

.....

Üye

Yrd. Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŞ

.....

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Yasemin KEMEÇ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen, tüm sabır ve özverisi ile bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Cüneyt AKI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın başından sonuna kadar yöntem bölümünde bana yardım eden Svante MALMGREN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca örneklerim için bana yer sunan, birçok konuda yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN'a ve arkadaşlarım Dr. Biyolog Fatih SEZER ve Uzm. Biyolog Aslıhan ÖZBİLEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunmamda jürimde yer alan olumlu ve yapıcı görüşlerini, çalışmanın geliştirilmesi konusunda fikirlerini paylaşan Yrd. Doç. Dr. Sefer DEMİRBAŞ teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda gerektiğinde bana yardımcı olan, bilgisini paylaşan değerli hocam Arş. Gör. Dr. Nurşen ÇÖRDÜK'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın istatistik analizlerinde bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Mehmet MENDEŞ'e ve Arş. Gör. Altan ŞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her alanında yanımda olan ve beni her konuda destekleyen Dr. Biyolog Kaan HÜRKAN'a sonsuz teşekkürler.

Bütün öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi açıdan beni destekleyen, güvenen ve her zaman yanımda olan annem Sultan KEMEÇ'e ve babam Ali KEMEÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yasemin KEMEÇ

Çanakkale, Temmuz 2015

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
nm	Nanometre
°C	Celcius derece
pH	Asitlik derecesi
MS	Murashige Skoog
KC	Knudson C
KC-N	İnorganik azot ilave edilmemiş Knudson C
VW&DB	Van Waes&DeBergh
ORC	Orchimax
GA3	Giberellik asit
NaClO	Sodyum hipoklorit
IUCN	International Union for Conservation of Nature
WCMC	World Conservation Monitoring Centre
EN	Tehlikede
VU	Zarar görebilir
LR	Az tehtit altında
Cd	Koruma önemi gerektiren
Nt	Tehdit altına girebilir
Ic	En az endişe verici

ÖZET

ÇANAKKALE ÇEVRESİNDE YAYILIŞ GÖSTEREN BAZI SALEP ORKİDELERİNİN FARKLI BESİN ORTAMLARINDA *IN VITRO* ÇOĞALTIMI

Yasemin KEMEÇ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Prof. Dr. Cüneyt AKI

10/07/2015, 57

Orkideler, kutuplar haricinde dünyanın hemen her bölgesinde yayılış gösterebilen ve tür çeşitliliği açısından zengin olmasına rağmen hızlı bir şekilde tahrip edilmekte ve dünya genelinde çeşitli resmi anlaşmalarla korunmaktadır. Orkidelerin bununla birlikte şehirleşme, tarımsal faaliyetler ve özellikle ülkemizde gıda hammaddesi olarak kullanılmaları nedeniyle daha etkin korunmaları için yeni ve gelişmiş tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu nedenle, bu tez çalışmasında salep orkidelerinin *in vitro* koşullarda doku kültürü yöntemi ile çoğaltılarak tekrar doğaya kazandırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich, *Anacamptis morio* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase subsp. *morio*, *Dactylorhiza romana* (seb.) Soo ve *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase. olmak üzere dört farklı salep orkide türü (Nisan ve Mayıs aylarında Çanakkale ilinin farklı lokalitelerinden) toplanmıştır. Bu bitkiler laboratuvar koşullarında saksılara aktarılmış ve *A. morio* subsp. *morio* türü dışındaki türler kendileme yolu ile tohum elde edilmiştir. *A. morio* subsp. *morio* türünün tohumları doğal ortamlarında geliştikleri için direkt toplanmıştır. Tohumlar yüzeysel sterilizasyon sonrasında üç farklı besin ortamında (Svante Malmgren'in bize önermiş olduğu ortam (SV), Knudson-C (KC) ve Orchimax (ORC)) gelişmeye alınmıştır. Bu besin ortamlarının dört salep orkidesi türü üzerindeki çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişimi üzerindeki etkileri ortaya konmuştur.

Çalışma sonucunda çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişimi açısından en iyi besin ortamının dört farklı tür için de SV ortamı olduğu belirlenmiştir. En iyi çimlenen tür %94.00 oranı ile *A. morio* subsp. *morio*, en iyi protokorm oluşturan tür %70.42 oranı ile *A. morio* subsp. *morio* ve en iyi bitki gelişimi olan tür %55.87 oranı ile *A. morio* subsp. *morio* olarak saptanmıştır. *In vitro* ortamda başarılı bir şekilde protokormdan yumru geliştiren *A.*

pyramidalis, *A. morio* subsp. *morio* ve *D. romana* türlerinin yumruları aklimatizasyon sonucunda kendi yetiştikleri bölgeden alınan toprağın içine %25'er oranda kuartz kum ve ağaç kabuğu eklenerek aktarılmışlardır. Yumrular dormansi durumundadır ve bir sonraki yaprak çıkarma zamanı olan Şubat – Mart ayında yaprakları tekrar çıkacaktır.

Anahtar sözcükler: *In vitro* çimlendirme, Orkide, Protokorm, Çanakkale, Doku kültürü.

ABSTRACT

IN VITRO PROPAGATION OF SOME SALEP ORCHIDS IN DIFFERENT GROWTH MEDIUMS WHICH SPREAD IN ÇANAKKALE SURROUNDING

Yasemin KEMEÇ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Animal Science

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Cüneyt AKI

10/07/2015, 57

From tropics to subtropics, except Polar Regions orchids spread almost every place in the world. Orchids interact with two kingdom; plants and fungi. Since being one of the most crowded plant group, orchids have problems systematically.

Orchids need to be protected by new and developed techniques owing to the fact that over exploiting for using as food product, as well as urbanization, agricultural activities, rapid growing population.

In this Master of Science thesis, we aimed to propagate orchids on *in vitro* conditions by tissue culture techniques and to give orchids back to the nature. Four orchid taxa collected from different localities of Çanakkale were used in this study; *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich, *Anacamptis morio* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase subsp. *morio*, *Dactylorhiza romana* (seb.) Soo and *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase and were tried to propagate on three different growing media; KC, ORC and the medium recommended by Svante Malmgren, SV.

According to the results of the study, it is observed that the SV medium is the best medium for all four taxa. In terms of germination test, protocorm generation and plant development, *A. subsp. morio* was the best germinated taxon on the SV medium (94.00%), as well as it was the best protocorm developed taxon on the medium SV (70.42%) and the best developed taxon on the SV medium overall (55.87%). Potted plants are in dormancy status and it is assumed they will develop fresh leaves in the next vegetative period February – March.

Keywords: *In vitro* germination, Orchid, Protocorm, Çanakkale, Tissue culture.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEZ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
BÖLÜM 1 - GİRİŞ.....	1
1.1. Orchidaceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler.....	1
1.2. Salep	3
1.3. Türkiye Orkidelerini Tehdit Eden Faktörler	5
1.3.1. Şehirleşme	6
1.3.2. Aşırı otlatma ve tarımsal faaliyetler.....	6
1.3.3. Salep toplayıcıları	7
BÖLÜM 2 - ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
2.1. Türkiye Orkidelerini Koruma Çalışmaları.....	10
2.1.1. Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak orkidelerin korunması.....	11
2.2. Orkidelerde Simbiyotik ve Asimbiyotik Çalışmalar	14
2.3. Tropikal Orkideler Üzerine <i>In Vitro</i> Çalışmalar	17
2.4. Karasal Orkidelerde <i>In Vitro</i> Çalışmalar	21
BÖLÜM 3 - MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Bitkisel Materyal	27
3.1.1. <i>Anacamptis pyramidalis</i> (L.) L.C. Rich	27
3.1.2. <i>Anacamptis morio</i> (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase subsp. <i>morio</i>	28
3.1.3. <i>Dactylorhiza romana</i> (seb.) Soo	29
3.1.4. <i>Neotinea tridentata</i> (Scop.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase.....	30
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Bitki materyallerinin toplanması, teşhisi ve korunması	31
3.2.2. Orchidaceae familyasına ait tohumların <i>in vitro</i> çimlendirilmesi	32
3.2.2.1. Genel doku kültürü şartları	32
3.2.2.2. Tohumların yüzeysel sterilizasyonu	33

3.2.2.3. Bitkilerin dış koşullara alıştıırılması (Aklimatizasyon).....	34
3.2.2.4. İstatistiki analiz.....	35
BÖLÜM 4 - ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	36
4.1. Araştırma Bulguları	36
4.1.1. Çimlenme oranı.....	36
4.1.2. Protokorm oranı	39
4.1.3. Bitki gelişim oranı.....	43
4.2. Tartışma	46
BÖLÜM 5 - SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Türkiye’de salep eldesi amacı ile orkide sökümünün yapıldığı bölgeler	5
Şekil 1.2. Şehirleşmenin orkidelerin yayılış alanlarına etkileri	6
Şekil 1.3. Otlatmanın orkideler (<i>Dactylorhiza osmanica</i>) üzerine etkileri	7
Şekil 3.1. <i>Anacamptis pyramidalis</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri	28
Şekil 3.2. <i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>morio</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri	29
Şekil 3.3. <i>Dactylorhiza romana</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri	30
Şekil 3.4. <i>Neotinea tridentata</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri	31
Şekil 3.5. <i>Ophrys lutea</i> subsp. <i>minor</i> türüne ait polinaryumlar	32
Şekil 3.6. Ependorflarda steril edilen orkide tohumları	33
Şekil 3.7. Orkidelere ait tohumlar ve kapsülleri	34
Şekil 3.8. <i>Anacamptis pyramidalis</i> türüne ait steril edilmiş tohum fotoğrafı	34
Şekil 3.9. Toprağa aktarılan <i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>morio</i> ve <i>Dactylorhiza romana</i> türleri	35
Şekil 4.1. Türlerin ekimden sonraki çimlenme fotoğrafları	37
Şekil 4.2. <i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>morio</i> türünün ekimden sonraki protokorm fotoğrafları	40
Şekil 4.3. <i>Dactylorhiza romana</i> türünün ekimden sonraki protokorm fotoğrafları	41
Şekil 4.4. <i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>morio</i> türüne ait bitkicik fotoğrafları	43
Şekil 4.5. <i>Dactylorhiza romana</i> türüne ait bitkicik fotoğrafları	44
Şekil 4.6. <i>Dactylorhiza romana</i> türüne ait bitkicik fotoğrafları	44
Şekil 4.7. <i>Dactylorhiza romana</i> türüne ait bitkicik fotoğrafları	45
Şekil 4.8. <i>Anacamptis pyramidalis</i> türüne ait bitkicik fotoğrafları	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Karasal orkidelerin Avrupa'daki kullanımları.....	4
Çizelge 1.2. 1kg ve 1 ton salep yumrusu sayısı	8
Çizelge 1.3. Salep toplanma miktarları	9
Çizelge 2.1. Türkiye'de tehlike altında olan endemik orkide türleri	11
Çizelge 4.1. Farklı orkide türlerinin kendi aralarında çimlenme oranı	38
Çizelge 4.2. Farklı besin ortamlarının kendi aralarında çimlenme oranına etkisi	38
Çizelge 4.3. Tür ve Besin ortamı arasındaki ilişkinin çimlenme oranı üzerine etkisi.....	39
Çizelge 4.4. Farklı orkide türlerinin kendi aralarında protokorm oluşturma oranı.....	40
Çizelge 4.5. Farklı besin ortamlarının kendi aralarında protokorm oluşumu üzerine etkisi	42
Çizelge 4.6. Tür ve Besin ortamı arasındaki ilişkinin protokorm oranı üzerine etkisi ...	42
Çizelge 4.7. Türlerin bitki gelişim oranları	46

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Orkideler, bitkiler alemindeki eşsiz güzellikleri, üstün mimikri yetenekleri, merak uyandıran tozlaşma yetenekleri ile sadece polinatörlerini değil, insanların dikkatlerini üzerine çeken oldukça zengin bir bitki grubudur. Orkideler, tıbbi, ekonomik, gıda hammaddesi olarak kullanımlarının yanı sıra yaklaşık seksen milyon yıldan beri biyoçeşitliliğe katmış olduğu zenginlikten dolayı bitkiler aleminin en karizmatik üyesi olmayı hak eden ve ilgileri her zaman üzerine çeken bir grup olmuştur.

Tropik bölgelerden subtropik bölgelere, deniz seviyesinden neredeyse 5 bin metre yüksekliğe kadar açık denizler ve çöller hariç dünyanın hemen her bölgesinde yayılış gösterebilen, mantarlar ve hayvanlar alemi ile etkileşimde olan, tür çeşitliliği açısından zengin olmasından dolayı sınıflandırma problemleri olan orkideler hem dünyada hem de ülkemizde çeşitli resmi anlaşmalarla korunmaktadır. Fakat global düzeydeki şehirleşme, tarımsal faaliyetler, hızla artan nüfuz, özellikle ülkemizde gıda hammaddesi olarak aşırı bir şekilde tahrip edilen orkidelerin daha etkin korunmaları ve sürdürülebilir kullanımları için yeni ve gelişmiş tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bahsedildiği gibi çeşitli nedenlerle tahrip edilen orkideleri korumak amacı ile çalışmamızda, orkidelerin toplandığı yerlerin koordinatları verilmemiştir.

1.1. Orchidaceae Familyası Hakkında Genel Bilgiler

Yeryüzünde yayılış gösteren çiçekli bitkiler grubunun en zengin familyası olan orchidaceae 1000 cins ve en az 25.000 tür içerir (Harrap ve Harrap, 2009). Taksonomik olarak tek çenekliler içinde yer alan orkideler Türkiye’de 24 cins ve 170 takson ile temsil edilmektedir (Kreutz, 2009).

Orkidelerin yaklaşık %70’i epifit, %25’i toprakta yaşar. Geriye kalan %5’i ise toprak altında, kayalar üzerinde ve çürümekte olan bitkiler üzerinde yaşamını sürdürür (Arditti, 1979; Renz ve Taubenheim, 1984). Tropik ormanlarda yayılış gösteren orkidelerin çoğu epifittir. Epifit orkidelerin gövdeleri su ihtiyacını karşılayabilmek için yalancı bir soğan halinde şişmiş ve şerit şeklinde hava kökleri oluşmuştur. Hava köklerinin üzerinde suyu emebilen bir tabaka bulunmaktadır (Sezik, 1984). Epifit orkidelerin bazılarını örnek olarak; *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Cattleya* ve *Phalaenopsis* sp. türü verilebilir. Bu orkideler çeşitli yöntemler ile üretilip süs bitkisi olarak ticareti yapılmaktadırlar. Toprakta yaşayan ve daha küçük çiçek yapısına sahip olan orkidelere “ılıman kuşak orkideleri” veya

“karasal orkideler” adı verilmektedir. Karasal orkidelere “orta kuşak orkideleri” olarak da bilinirler. Orta kuşak orkideleri Avrupa, Akdeniz Havzası, Kafkasya ve Ön Asya’da yayılım gösterir ve 600 civarında tür ve alttüre sahiptirler (Gümüş, 2009).

Türkiye’deki orkideler de orta kuşak orkidelerindedir. Türkiye bitki örtüsü bakımından Avrupa ile Yakın Doğu arasında bir geçiş bölgesinde bulunup, Afrika, Asya ve Avrupa kıtalarının ortak etkisini yansıtır (Kreutz, 2009). Ülkemizde 30 endemik orkide taksonu bulunmaktadır (Kreutz, 2009).

Orkide tohumları 0.25-1.2 mm uzunluğunda ve 0.09-0.27 mm genişliğindedir, ağırlıkları ise 0.3-1.4 µg’dır (Arditti, 1967). Orkide tohumları çimlenebilmek için diğer bitkilerin de ihtiyaç duyduğu uygun sıcaklık, ışık, nem ve oksijenin yanı sıra “mikorhizal fungus” ile mutualiz bir ilişkiye ihtiyaç duymaktadır. Rasmussen (1995)’e göre, dormant durumda olmayan orkide tohumlarının uygun havalanma ve sıcaklık koşullarında çimlenmeye başlaması için ortamda su bulunması yeterlidir, fakat bitki heterotrofik ise ortamdaki su haricinde diğer bazı maddeleri de alması gerekmektedir. Bu heterotrofik türler doğada çimlenebilmek için endofitlerle veya bazı mantarlarla ilişkili olmak zorundadırlar. Endosperma taşımayan orkide tohumlarının düştüğü yerde çimlenmesi için gerekli olan funguslar genellikle *Rhizoctonia* cinsinin değişik türleridir (Sezik, 1984). Bu fungus, bulunmuş olduğu ortamdaki organik humusu parçalar ve bu parçalanma sonucunda oluşan nişastayı ve benzeri bileşikleri suda çözünen şekerlere dönüştürür ve orkide bitkisine gönderir. Yeni bitki, henüz çimlenmeyi sağlayacak endosperma taşımadığı için, mikorizomun (orkide tohumu ve fungusun oluşturduğu yapı) büyümesi çok yavaştır. Mikorizom fungusları, daha çok humuslu topraklarda bulunurlar ve *Fagus* sp., *Quercus* sp., *Betula* sp., *Pinus* sp. gibi pek çok ağacın ve fundalıkların köklerinde yaşarlar. Yumrulu cinsler, fungustan ayrılıp bağımsız yaşamaya meyillidirler ve hayatlarının ileri devrelerinde genellikle fungusa rastlanmaz. *Cephalanthera* türleri ve *Goodyera repens* gibi, humuslu topraklarda yaşayan, şişkin kök sistemine sahip orkidelerin köklerinde mikorizom fungusuna ömürleri boyunca rastlanır (Sezik, 1984).

Karasal orkidelerin toprak altı organları; yumru (tuber), rizom ve kök olarak farklılık göstermektedir. Yumrulu bitkilerde genellikle birbirine yapışık iki tane yumru bulunur. Eski olarak adlandırılan buruşmuş ve içi boşalmış olan yumru mevcut bitkiyi oluşturan, şişkin olan genç yumru ise bir sonraki sene yeni bitkiyi vermek için gerekli içeriğe sahip olan yumrudur (Sezik, 1984). Salep yapımı için genellikle genç yumru kullanılır.

Orkidelerde, tohum toprağa düştüğü andan sonra yumru ve yaprakların gelişmesi çok uzun yıllar alır. Yaprak ve yumrular en erken ortalama 2-4 yıl sonra oluşmaktadır. *Orchis*, *Ophrys* ve *Dactylorhiza* türlerinde bitkinin ilk yaprakları ortalama 4, *Epipactis* ve *Cephalanthera* türlerinde 2-3 yıl sonra; *Spiranthes aestivalis* türünde ise ilk yumru ancak 9. yılda, *Neottia* türlerinde ilk çiçek 9-12 yıl sonra oluşmaktadır. *Listera* türlerinde ilk yaprak 4. yılda meydana gelirken, ilk çiçeği ise tohum toprağa düştüğü andan itibaren 15 yıl sonra açar. *Cypripedium* türlerinde ise, ergin bir bireyin meydana gelmesi için 16 yıl veya daha uzun süre beklemek gerekmektedir (Gümüş, 2009).

1.2. Salep

Salep, orkide yumrularının toz haline getirilerek süt ile karıştırılıp içilen sıcak bir içecektir.

Orkideler genellikle yöresel olarak salep veya sahlep diye adlandırılmaktadır. Salep kelimesi Arapça'dan dilimize geçmiş olup “tilki” demektir. Eski eserlerde *Tubera salep* karşılığı olarak “Husyet-ül sal'eb” veya “Husyet-ül kelb” kelimeleri kullanılmaktadır. Bunların manası “tilki testisi” ve “köpek testisi” dir. Zamanla ilk kelimeler düşmüş ve sadece “Salep” kelimesi kullanılmıştır (Sezik, 1984). Salepte etkili madde veya salebin asıl kullanılma sebebi olan madde glikomannanlardır (Sezik, 1967). Glikomannan, süt veya su ile şişer akıcı bir çözelti meydana getirir (Sezik ve ark., 2007). Salep eldesinde yumrulu orkideler kullanılmaktadır; fakat tüm yumrulu cinsler salep eldesi için uygun değildir. Türkiye’de *Aceras*, *Anacamptis*, *Barlia*, *Comperia*, *Dactylorhiza*, *Himantoglossum*, *Neotinea*, *Ophrys*, *Orchis* ve *Serapias* cinslerine ait 120 civarında yumrulu orkide salep elde etmek amacı ile kullanılmaktadır (Sezik ve ark., 2007).

Orkideler estetik güzelliğinin yanı sıra; yiyecek-içecek, bitkisel ilaç (drog), dekoratif öge veya afrodizyak gibi oldukça farklı şekillerde kullanılmıştır. Salep, Dioscorides zamanından beri tıbbi drog olarak kullanılmış ve “Materia Medica” adlı meşhur kitabında, orkidelerin yaprak ve çiçekleri hakkında bilgi vermektedir (Sezik, 1984). Saleple ilgili geniş bilgiler; İbn-i Sina'nın “Kanun” adlı eserinin 2. cildinde (Edviyei Müfrede) Hüssa-el sal'eb ve Hüssa-el kelb başlıkları altında belirtmektedir ve bu drogu afrodizyak, iştah açıcı, felç giderici olarak tavsiye etmektedir (Sezik, 1984). İbn-i Sina'nın “Kanun” adlı eserinin 5. cildinin (Edviyei Mürekkebe) macunlar faslında, nefsi kuvvetlendirici, ferahlatıcı, iştah ve zihin açıcı ve afrodizyak olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Sezik, 1984). Osmanlı Sarayı'nın Helvahanesinde padişahlar için pişirilen macunların kaydedildiği defterde de salepten bahsedilmiştir (Sezik, 1984).

Amerika’da orkidelerden elde edilen en önemli içerik *Vanilla planifolia* türünden elde edilen vanilyadır. Salebin tam tersi vanilyanın tarımı yapılabilmekte ve aroma maddesi olan vanilya günümüzde sentetik olarak üretilmektedir. Aztek’ler vanilyayı birçok alanda kullanmışlardır. Vanilya günümüzde Alzheimer hastalığının tanısında kullanılmaktadır; bu hastalar vanilyanın kokusunu alamamaktadırlar (Bullpit, 2005). Orkidelerin Avustralya’da Aborjinler tarafından halkalı solucana, dizanteri ve ağız yaralarına ve ağrılara karşı kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca Avustralya’da yetişen *Liparis reflexa* türünün soğanları toksik alkaloidler içermektedir (Bullpit, 2005). Brian Morris tarafından 12 orkide türü Malawi’de bitkisel ilaç olarak tanımlanmıştır (Bullpit, 2005). *Cyrtorchis arcuata* türü cilt enfeksiyonlarında, diyabet hastalığına karşı kullanılmaktadır, ayrıca *Eulophia cucullata* türünün ise epilepsi önleyici etkisi olduğu bilinmektedir (Bullpit, 2005). Görüldüğü gibi orkideler gerek ülkemizde gerekse dünyada tıbbi ve gıda hammaddesi olarak kullanılmıştır (Çizelge 1.1). Şuanda sadece gıda hammaddesi olarak kullanılmaktadır.

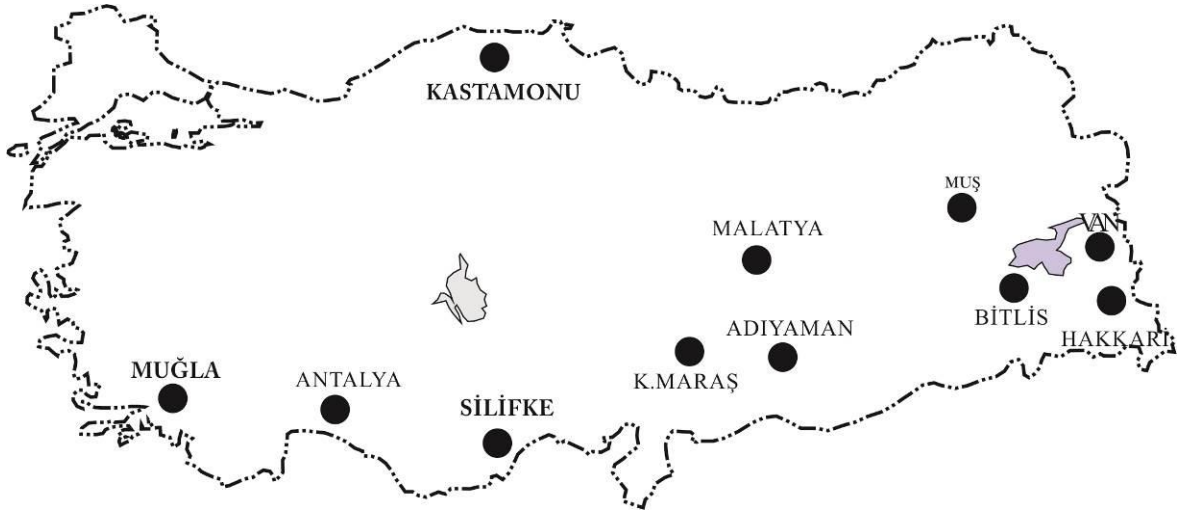
Çizelge 1.1. Karasal orkidelerin Avrupa’daki kullanımları (Bullpit, 2005’ten değiştirilerek)

Yazar	Yıl	Kullanımı	
		Hazırlanışı	Endikasyonu ve Kullanım Alanları
Turner W	1568	Taze tüber ve süt	Afrodizyak.
		Kuru tüber	Antiafrodizyak, Antiseptik, Şarabın neden olduğu gastrointestinal problemler.
Langham W	1579	Tüber	İltihap sökücü, tüberkiloz ve ishali tedavi edici.
Parkinson J	1640	Tüber (Salep)	Afrodizyak, Dondurma yapımı, Balkanlarda içecek ve İran’ da parfüm.

Anadolu’da beş ana salep bölgesi bulunmaktadır (Sezik ve ark., 2007).

- 1) Kuzey Anadolu: Kastamonu ve civarı. Bu bölgeden elde edilen salep İstanbul piyasasında “Kastamonu salebi” adı altında bulunur.
- 2) Güney Batı Anadolu: Muğla ve çevresinden elde edilen salep piyasada “Muğla salebi” adı ile bulunur.
- 3) Güney Anadolu: Elmalı’dan Silifke-Gülnar civarına kadar olan bölgede de salep elde edilmektedir. Bu bölgeden ticari mal olarak 2 cins salep çıkar:
 - a) Antalya salebi b) Silifke salebi
- 4) Güney Doğu Anadolu: Maraş, Adıyaman ve Malatya civarından elde edilir. Bu bölgede ticari mal olarak 2 cins salep bulunur:
 - a) Maraş salebi b) Çayır salebi
- 5) Doğu Anadolu: Van, Muş, Siirt, Hakkari ve Bitlis civarından elde edilen saleptir. Ticari mal olarak “Van salebi” olarak isimlendirilir.

Türkiye’de salep elde etmek amacı ile orkide sökümlerinin en çok gerçekleştirildiği bölgeler Muğla, Kastamonu, Antalya, Silifke, Kahramanmaraş, Malatya, Adıyaman, Muş, Bitlis ve Hakkari bölgeleridir (Şekil 1).



Şekil 1.1. Türkiye’de salep eldesi amacı ile orkide sökümlerinin yapıldığı bölgeler

1.3. Türkiye Orkidelerini Tehdit Eden Faktörler

Türkiye coğrafyasının hemen her yerinde yayılış gösteren orkide türlerinin tamamı, şehirleşme, sanayileşme, aşırı otlatma, tarım alanlarının genişletilmesi, tarımsal faaliyetler, turizm faaliyetleri, yangınlar, yurtdışı ve yurtiçi kullanım amacı ile doğadan sökülerek

nesli tükenme tehlikesi altına girmektedir. Türkiye orkideleri, salep olarak kullanılmak amacı ile asırlardır gerek yurt içine gerekse yurt dışına ticareti yapılarak doğadan sökülmesiyle tahrip edilmiştir. Doğadan sökümlerin mevcut hızla devam etmesi bile özellikle nadir ve endemik türlerimizin yok olmasına yakın gelecekte sebep olacaktır.

1.3.1. Şehirleşme

Son 20 yılda birçok şehirde nüfus mevcut sayının iki katının üzerine çıkmıştır. Yeni yapılan çoğu konutlar büyük siteler şeklinde inşaa edilmiştir. Hepsinden önce Ege ve Akdeniz kıyılarına yabancı turistlere yönelik yapılan tesisler ve devasa oteller şimdiden çevreye ölçülmez boyutlarda zararlar getirmiştir. Ülkemizin özellikle batı ve güney kıyılarında turizm amaçlı taşıt trafiği için inşaa edilen yollar çevreye ve habitata büyük boyutlarda zararlar vermiş ve vermeye devam edeceği açıkça görülmektedir. Yapılan karayolları orkidelerin ilk defa tanımlandığı birçok önemli alanın yakınından geçerek bu canlıların doğrudan yok olmalarına da neden olmuştur. Yolların yakınında yaşayan çok sayıda orkidelerin doğal yetişme ortamları hiç dikkate alınmadan yok edilmiştir (Kreutz, 2009). Şehirleşmenin orkide yayılış alanlarına etkisi örneklendirilmiştir (Şekil 1.2).

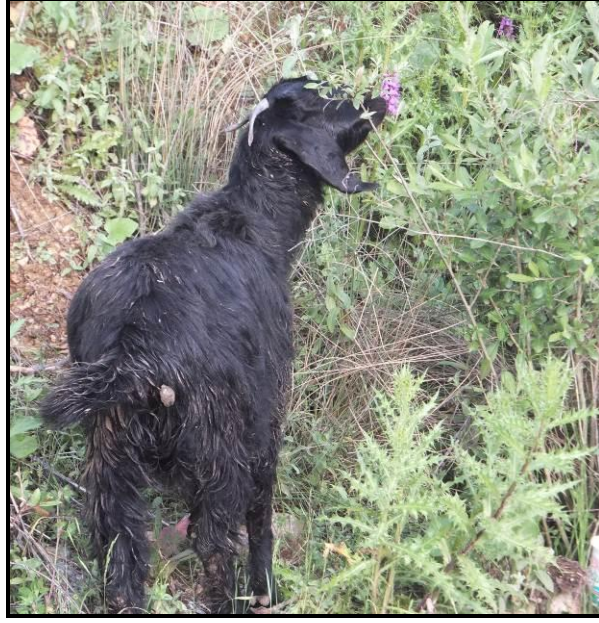


Şekil 1.2. Şehirleşmenin orkidelerin yayılış alanlarına etkisileri

1.3.2. Aşırı otlatma ve tarımsal faaliyetler

Ülkemizde ne yazık ki Milli parklar dahi her karış verimli toprak, yoğun olarak tarımsal amaçlı kullanılmış ve halen de kullanılmaktadır. Birkaç yıl öncesine kadar zengin

orkide popülasyonlarına sahip ıslak alanlar kurutulmuş ve tarlaya dönüştürülmüştür ve böylelikle bu yerlerde orkidelerden hiçbir iz kalmamıştır. Yalnızca işlenmiş olan parsellerin çevrelerinde birkaç örnek bulunabilmektedir. Orkideler için en büyük tehlike hızla büyüyen nüfus, bununla bağlantılı olarak sürekli artan koyun ve keçi sürüleridir. Bu hayvanlar geçtikleri her yerdeki işlerine yaramayan bitkileri dahi yok etmektedirler. Göçebelerin kıyıda kışın konakladıkları bölgeler de otlatmayla bütünüyle çıplaklaştırılmıştır (Kreutz, 2009). Otlatmanın orkidelere etkileri örneklendirilmiştir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Otlatmanın orkideler (*Dactylorhiza osmanica*) üzerine etkileri

1.3.3. Salep toplayıcıları

Ülkemizde orkidelerin tahrip edilmesindeki en önemli neden yumruların sökülerek salep elde etmek amacı ile toplanmasıdır. Bu durum orkidelerin tohum oluşturup bir sonraki sene yeni bir bitki vermesini engellemektedir. 1 kg ve 1 ton salep elde etmek için gerekli olan yumru sayısı belirtilmiştir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. 1 kg ve 1 ton salep yumrusu sayısı (Sezik, 1984)

Ticari Salep	Ortalama Yumru Ağırlığı	1kg'daki Yumru Sayısı	1000 KG (1 TON)'daki Yumru Sayısı
Muğla Salebi	0.23	4.348	4.348.000
Kastamonu Salebi	0.50	2.000	2.000.000
Silifke salebi	0.35	2.857	2.857.000
Antalya Salebi	0.21	4.762	4.762.000
Maraş salebi	1.60	625	625.000
Van salebi	1.00	1.000	1.000.000

İhracatı en çok yapılan Antalya Salebi, Muğla Salebi, Silifke Salebi ve Kastamonu Salebi elde etmek için doğadan milyonlarca orkide yumrusu söküldüğü çizelge 1.2.de görüldüğü şekildedir. Salep ihracatı özellikle Suriye, Yunanistan, Ürdün, Lübnan, İsrail, S.Arabistan ve Kıbrıs'a yapılmıştır. İhracat miktarı bazı yıllarda 15 tona kadar çıkmıştır. Türkiye'den yurtdışına salep yumrularının satışı, asırlarca devam etmiş fakat doğadan yumru sökümünün “tahribat” boyutlarına ulaşması sonucunda 1974 yılında Tarım Bakanlığı, uyarıları dikkate alarak ihracatı yasaklamıştır. Dondurma yapımında ve sıcak içecek olarak kullanılan salebe talep fazla olduğundan ihracatçılar orkide yumrusunu toz olarak ihraç etmişlerdir. 1995 yılına kadar devam eden toz salep ihracatı aynı yıl içerisinde yasaklanmıştır (Sezik 1984). Ancak bu yasaklamalara rağmen günümüzde tahribat devam etmektedir ve yılda 40 ton salep elde edilmektedir.

Türkiye'nin belli başlı salep toplanma bölgelerinde yıllık asgari ve azami toplanma miktarları kg cinsinden verilmiştir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Salep toplanma miktarları (Sezik, 2007)

Ticari salep	en düşük miktar/ kg	en yüksek miktar/kg
Antalya	500	1.000
Muğla	6.000	7.000
Kastamonu	3.500	4.000
K.Maraş	500	700
Akdağ Madeni	6.500	7.500
Van	700	1.000
Hakkari	6.000	7.000
Siirt	2.500	3.000
Aydın ve civarı	2.500	5.000
Tokat ve civarı	2.000	2.500
TOPLAM	30.700	38.700

Bu tez çalışmasının amaçlarından biri; Çanakkale ili sınırları içerisinde doğal olarak yayılış göstermekte olan dört salep orkidesi türünde *in vitro* çoğaltım yöntemlerinin geliştirilmesi, üç farklı besin ortamının (KC, ORC ve SV) çimlenme, protokorm oluşturma, vejetatif organların elde edilmesi üzerine etkilerinin incelenmesi oluşturmaktadır.

Diğer amaç ise, salep elde etmek için doğal ortamlarından aşırı bir şekilde sökülerek yok olma tehlikesi ile karşı karşıya kalmış olan salep orkidelerinin, bu yok oluşlarının engellenmesinde doku kültürü yöntemi ile elde edilen bitkilerin doğal ortamlarına aktarımlarının yapılarak biyolojik çeşitliliklerinin garanti altına alınması sağlanmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Türkiye Orkidelerini Koruma Çalışmaları

Orkide tahribatı tüm Türkiye’de devam ederken, bu tahribat yasal sınırlamalar ile kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. 2004 yılında orkidelerin doğadan sökülmelerini sınırlayan “Doğal Çiçek Soğanlarının Sökümü, Üretimi ve Ticaretine İlişkin Yönetmelik” yürürlüğe girmiştir. Bu yönetmelik “Nesilleri Tehlikede Olan Doğal Bitki ve Hayvan Türlerinin Uluslararası Ticaretinin Düzenlenmesine Dair Anlaşma” CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) hükümlerine uyarlanmıştır. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı’nın, Doğal Çiçek Soğanlarının 2006 yılı İhracat Listesi Hakkındaki 2005/44 no’lu tebliği ile numaraları belirtilen *Orchidaceae* (salep) türlerinin yumru ve droglarında (toz, tablet) ve her türlü formdaki ihracatı yasaklanmıştır. Bu yasal hükümlere rağmen her yıl 30-50 milyon adet arasında orkidenin sökülmünün yapıldığı bilinmektedir (Sezik, 1984).

Avrupa Konseyi 1974 yılında doğayı korumak amacıyla bazı önlemler almıştır ve bu önlemler doğrultusunda Avrupa ülkeleri için yaklaşık 1.500 bitki türünü kapsayan "RED DATA BOOK" listesi yayınlanmıştır. Bu liste Avrupa Florası’nın yayınlanmasından sonra 1983 yılında güncelleştirilerek yeniden yayınlanmıştır. Bu listede Türkiye bitkilerinden endemik olanlar sadece Türkiye Florasından alınmış ve sınıflandırma yapılmadan verilmiştir. 1994 yılında IUCN (International Union for Conservation of Nature), sınıflandırma sistemini uluslararası ve daha kullanılabilir hale getirebilmek için yeni bir yöntem belirlemiştir. IUCN'nin yan kuruluşu olan WCMC (World Conservation Monitoring Centre) 1998 yılında dünyada tehdit altında olduğunu düşünülen yaklaşık 33.000 bitki türünün bilgilerini yayınlamıştır (Ekim, 2000). Ülkemizde ise, 1989 yılında "Türkiye'nin Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitkileri" adlı eser, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği tarafından yayınlanmıştır (Ekim, 1989). 2000 yılında Ekim ve ark., Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van 100. Yıl Üniversitesi desteği ile bu eseri gözden geçirip "Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı" adı ile yayınlamışlardır (Ekim, 2000). Türkiye’de tehlike altında olan endemik orkide türleri Ekim (2000) tarafından hazırlanmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Türkiye’de tehlike altında olan endemik orkide türleri (Ekim, 2000)

TÜRLER	KATEGORİ
<i>Cephalanthera kotschyana</i> Renz&Toub.	LR(Ic)
<i>Dactylorhiza chuhensis</i> Renz&Toub.	LR(cd)
<i>Dactylorhiza meschandorum</i> H.Baumonn & Künkele	LR(Ic)
<i>Doctylorhiza osmanica</i> (KL.) Soo var <i>anatolica</i> (Nelson) Renz&Toub.	LR(nt)
<i>Dactylorhiza osmanica</i> (Q.) 506 var <i>osmanica</i> (Nelson) Renz&Toub.	LR(Ic)
<i>Epipactis pontica</i> Taub.	LR(Ic)
<i>Ophrys bornmuelleri</i> M. Schulze ex Burnm. subsp. <i>carduchorum</i> Renz&Taub.	LR(nt)
<i>Ophrys cilicica</i> Schlechter	IR(Ic)
<i>Ophrys holoserica</i> (Burnm.f il) Greuter subsp. <i>heterochila</i> Renz&Taub.	VU
<i>Ophrys isaura</i> Renz&Toub.	EN
<i>Ophrys lycia</i> Renz&Taub.	EN
<i>Ophrys phrygla</i> Fleischm. & Bornm.	LR(Ic)
<i>Orchis reinholdii</i> Spruner ex Flischm. subsp. <i>Leucotaenia</i> Renz&Taub.	VU
<i>Ophrys transhyrcana</i> Czernjak subsp. <i>amanuensis</i> Nel. ex Renz&Toub.	LR(cd)

EN: Tehlikede **VU:** Zarar Görebilir **LR:** Az Tehtit Altında **cd:** Koruma Önemi Gerektiren **nt:** Tehtit Altına Girebilir **Ic:** En Az Endişe Verici

Toplanmalarının yasak olduğu orkide yumruları, denetimlerin yetersiz oluşundan ne yazık ki tahrip edilmeye devam edilmektedirler. Ticareti yapılmaya devam eden orkide türlerinin doğadaki sayısı gittikçe azalmıştır ve ülkemizde de ticari olarak salep elde etmede kullanılan orkidelerin sayılarının azaldığı çeşitli araştırmacılar (Karel, 2009; Sezik, 1984) tarafından belirtilmiştir.

2.1.1 Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak orkidelerin korunması

Türkiye orkidelerinin korunması için bitki biyoteknolojisinin sunduğu fırsatlardan yararlanarak özellikle EN, VU ve CR kategorilerindeki orkidelerin korunmaları sağlanabilir. Günümüzde özellikle nesli tükenme tehlikesi altında olan türler, çoğalmasında sorun olan türler, gıda ve ilaç hammaddesi açısından değerli olan türler ve endemik olan türler birçok biyoteknolojik yöntemler kullanılarak çoğaltımları sağlanmaktadır.

Dünya’da orkideler ile ilgili çalışmalar sayılamayacak kadar çok olup, ilk doku kültürü çalışmaları 1800’lü yıllarda orkide tohumları ile başlamıştır (Ar, 2000).

Orkide mikroçoğaltımındaki yeni metodların geliştirilmesi her zaman biyoteknolojinin ön planında olmaya değer bir durumdur. Orkide tohum çimlendirmesindeki ilk yöntem, 155 yıl önceki ilk çimlendirilen tohumlarda radikal bir gelişimdi. David Moore’un (1807-1879) yaklaşımı yaratıcı, biyolojik ve tarımsal açıdan büyük bir ilerlemeydi. Moore’un buluşundan yarım yüzyıl sonra, Noel Bernard (1874-1911) başka bir kuantum atlaması yaparak orkide tohumlarının *in vitro* olarak çoğaltılmasında mikorhizal funguslarla birlikte simbiyotik çimlenme methodu geliştirdi. Onun bu metodu büyük ihtimalle herhangi bir bitkinin *in vitro* çoğaltımındaki ilk yöntemdi. Modern ve gelişmiş mikrobiyolojik işlemleri, faydalı hale getirmiştir. Bernard ayrıca orkide yetiştiricilerinin, ileride laboratuvarlara sahip olacaklarını da öngörmüştür. Bu durum sadece orkideler için değil, aynı zamanda diğer bitkiler için de geçerli olacaktır.

Lewis Knudson’un (1884-1958) orkide tohumlarını asimbiyotik olarak fungus olmadan farklı mineraller ve sakkaroz içeren basit bir besin ortamında çimlendirme yöntemi, saf kültürde *in vitro* olarak herhangi bir bitkinin geliştirildiği ilk yöntemdi. O’nun yöntemi önemli ölçüde modern teknolojiye büyük bir yenilikti (Arditti, 2008). Knudson’un o zamanın teknolojiyle *in vitro* koşullarda asimbiyotik olarak yapmış olduğu bu çalışma özellikle *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum* ve diğer pek çok orkidenin çimleneceğini gösteren bir çalışmaydı ve bu çalışma ile orkide dünyasına büyük etki yaratmıştır (Pierik 1987). Arditti (1979)’ye göre, orkide bitkisinin tohumlarının *in vitro* olarak çimlenmesi üzerinde hormon uygulamalarının çok ciddi etkilerinin bulunmadığına dikkat çekmiştir. Ayrıca Arditti ve Ernst (1984)’de GA₃ bitki büyüme düzenleyicisinin orkide bitkisinin tohumlarında çimlenmeyi inhibe edici etkilerinin bulunduğunu belirtmiştir. Ülkemizde de birçok araştırmacı (Özkoç ve Dalcı, 1991; Özkoç ve Dalcı, 1992; Özavcı, 1995; Vakkasoğlu, 1995; Gönülşen ve ark., 1996; Çağlayan ve ark., 1997; Çağlayan ve ark., 1998; Önal, 1999; Aybeke, 2002; Sazak, 2004; Gümüş, 2009; Gümüş ve ark., 2010) orkidelerin *in vitro* çoğaltımları üzerine araştırma yapmışlardır. Fakat orkidelerin seri bir şekilde üretilmelerini sağlayan olumlu sonuçlar alınamamıştır. Bu nedenle orkidelerin doğadan sökümlerinin engellenmesi amacı ile *in vitro* olarak üretimlerinin seri olması için çalışmaların daha fazla yapıp bir sonuca varılması şarttır.

Yumrulu bitkiler içerisinde yer alan orkideler, ne yazık ki diğer yumrulu bitkiler kadar şanslı değiller. Çünkü geçmiş yıllarda yoğun tahribat altında bulunan kardelenlerin tahribini önlemek için, ciddi çalışmalar yürütülmüştür. Sonuç olarak kardelenlerin

üretimleri yapılarak yenileri yerlerine konulabilmektedir. Ancak kardelenler için sevindirici olan bu durum, ne yazık ki orkideler için geçerli değildir (Ar, 2000). Yok olma tehlikesi altında olan bu doğal varlıklarımızın rejenerasyon sorunlarının en kısa zamanda çözülmesi gerekmektedir. Bu çözüm ya doğal yolla ya da *in vitro* yolla sağlanmalıdır. Doğal yolla rejenerasyonlarının sağlanabilmesi için, bitki genetik kaynaklarını muhafaza yöntemlerinden yararlanılmalı, bunun için de her bir türün kendi doğal yaşam ortamları ayrıntılı olarak değerlendirildikten sonra *in-situ*, *ex-situ* ve *in vitro* muhafaza yöntemlerinden biri ile korunmaya alınmalıdır (Karagüzel ve ark., 1999).

Kısaca; Türkiye'nin ekonomik değere sahip diğer bitki türleri gibi orkide türlerinin de neslini devam ettirebilmesi için, onları çok iyi tanımak, yeni biyoteknolojik yöntemler geliştirerek üretimlerini sağlamak ve gen kaynağı olarak korumak ile gerçekleştirilebilir.

Türkiye'deki orkideler üzerine yapılan ilk çalışma 1883 yılında, E. Boisser'in "Flora Orientalis" adlı eserinde rastlanmaktadır. Bu çalışmayı Ekrem Sezik'in 1967 yılında hazırladığı "Türkiye'de bulunan orkidelerin ilk listesi" izlemiştir (Sezik, 1984). Daha sonra Davis'in Türkiye florasını belirlemek amacıyla yaptığı çalışmalarda (Davis, 1984) ve (Sezik, 1984)'in yurt genelinde yaptığı araştırmalarda 24 cinse ait 100 kadar tür olduğu saptanmıştır.

Sezik (2002), *Anacamptis*, *Aceras*, *Barlia*, *Dactylorhiza*, *Comperia*, *Himantoglossum*, *Orchis*, *Neotinea* ve *Serapias* cinsleri ile ilgili isimlendirmenin yanı sıra taksonomi konularına ilave olarak; salep elde edilmesini de bu çalışmasında açıklamıştır.

Sezik ve ark. (2007)'nin yapmış olduğu çalışmada; *Aceras*, *Anacamptis*, *Barlia*, *Comperia*, *Dactylorhiza*, *Himantoglossum*, *Neotinea*, *Ophrys*, *Orchis*, *Serapias* cinslerine ait 120 orkide türü Anadolu'nun değişik bölgelerinde salep elde edildiği belirtilmiştir. Aynı araştırmacılar; son otuz yılda, ulaşımın kolaylaşması, orkidelerin yetiştiği bölge ve alanlarda turistik tesislerin ve şehirleşmenin aşırı bir şekilde artması, nüfus artışı ve dolayısıyla salep kullanımının artması gibi sebeplerden dolayı orkidelerin aşırı bir şekilde tahrip olduğunu belirtmişlerdir. Orta kuşak orkidelerinin doku kültürü çalışmalarının çok eksik olduğunu, başarılı sonuçların henüz alınmadığını, çalışmaların hiçbirinde kullanılan yöntemlerin ekonomik olup olmadığının dikkate alınmadığını, sadece bitkiyi üretmenin hedeflendiği Sezik ve ark. tarafından belirtilmiştir.

2.2. Orkidelerde Simbiyotik ve Asimbiyotik Çalışmalar

Arditti (1967)'ye göre, 1899 yılında Noel Bernard isimli bir araştırmacı ilk defa orkide tohumlarının mikorhizal funguslarla beraber simbiyotik olarak *in vitro* koşullar altında çimlendirildiğini belirtmiştir.

Rasmussen ve ark., (1990), *Dactylorhiza majalis* türünde *in vitro* koşullarda, mikorizalı ve mikorizasız ortamda çimlenme ve fide gelişiminin, değişik sıcaklıklardaki durumunu araştırmıştır. *Rhizoctonia* fungusunun varlığında *D.majalis* tohumlarının *in vitro* ortamda çimlenmesi ve gelişmesi sıcaklıkla ilişki olarak seyretmiştir. Çimlenme yüzdesinde, 23-25°C sıcaklıklarda önemli bir düşüş ortaya çıkmıştır. 6 haftalık fideler, 4 hafta boyunca 10°C'den 28°C'ye değişen sıcaklıklarda yetiştirildiğinde fide büyümesindeki artış oranı en yüksek 23-24.5°C'de olmuştur. 26°C'de yetiştirilen fideler, daha düşük sıcaklıklarda yetiştirilenlerden daha az nişastaya sahip olmuştur. *Rhizoctonia* fungusunun varlığında 23-24.5°C'de tohum çimlenmesi fungusun yokluğuna göre iki kat fazla olmuş ve fide uzunluğu fungus yokluğunda haftada %30 artarken, fungusun varlığında %45 artmıştır. Çimlenme yüzdesinde önemli bir düşüş ortaya çıkmıştır. 6 haftalık fideler ilave olarak 4 hafta 10°C'den 28°C'ye değişen sıcaklıklarda yetiştirildiğinde fide büyümesindeki artış oranı en yüksek 23-24.5°C'de olmuştur. 26°C'de yetiştirilen fideler, daha düşük sıcaklıklarda yetiştirilenlerden daha az nişastaya sahip olmuştur. *Rhizoctonia* fungusunun varlığında 23-24.5°C'de tohum çimlenmesi fungusun yokluğuna göre iki kat fazla olmuş ve fide uzunluğu fungus yokluğunda haftada %30 artarken, fungusun varlığında %45 artmıştır.

Rasmussen ve ark., (1991) yılında *Listera ovata* türünün olgunlaşmamış embriyoları ve tohumlarının simbiyotik *in vitro* kültürünü çalışmışlardır. Ayrıca *L.ovata* türünün olgunlaşmamış embriyolarını simbiyotik bir fungus (*Epulorhiza* sp.) ile başarılı bir şekilde inokule edilebildiğini göstermişlerdir. Çalışmanın bütün safhalarında embriyolardan simbiyotik protokormlar geliştirilmiştir, fakat asimbiyotik kültürdeki embriyolardan, yalnızca kapsüllerin olgunlaşmaya yakın bir dönemde alındığı durumda başarı elde edilmiştir. Simbiyotik kültürde olgun tohumların çimlenme yüzdesi, asimbiyotik kültürden daha fazla olmuş ve simbiyotik protokormlar daha hızlı gelişmiştir. Olgunlaşmamış embriyoların inokulasyonu, zor çimlenen orkide türlerinin üretimi ve aynı zamanda fungus uygunluk testi için uygulanabilir bir yöntem olarak görülmüştür.

Özkoç (1991), *Orchis laxiflora* ve *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* türlerini asimbiyotik ve simbiyotik olarak çimlendirme çalışmasında, yulaf ortamının simbiyotik kültürler için en uygun ortam olduğunu belirtmiştir. VWD-N ortamında *Serapias*

vomeracea subsp. *laxiflora* tohumlarının ve 30 dakika sterilizasyon için %10 oranında sodyum hipoklorit uygulamasında %21.7 oranı ile en yüksek çimlenme; 5 dakika sterilizasyon uygulamasında %20'lik sodyum hipoklorit %50.03; %30'luk sodyum hipoklorit ile 10 dakika uygulamasında %25.4 çimlenme elde edildiğini belirlemiştir. Fungal izolatlarla yapılan çalışmada yulaf ortamında %30.6 oran ile en iyi çimlenme; modifiye yulaf ortamında ise %9.1 oranı bulunmuştur. *In vitro* tohum çimlendirme çalışmalarında inorganik azot içermeyen MS, Knudson ve VWD ortamları arasında en yüksek çimlenme oranı olduğunu belirtmiştir. Bu ortamlarda çimlenmede iyi sonuç alınırken, protokormlarda epidermal tüy gelişmemiştir. En iyi çimlenme sonucu %53.8 oran ile MS-N ortamında olduğu belirtilmiştir. *Orchis laxiflora* ile yapılan çalışmada ise %30'luk sodyum hipokloritde 15 dakikalık sterilizasyon yapılmış ve %13.4 oranı ile VWD-N ortamında çimlenme elde edilmiştir.

Beyrle ve Smith (1993), *Orchis morio* türünün tohumlarını *in vitro* çimlendirmeye almışlardır, fakat aynı zamanda simbiyotik çimlenme olabilmesi için ortama mikorhiza mantarları da ilave etmişlerdir. Simbiyotik çimlenme, sıvı besin ortamındaki *O. morio* tohumlarında başarıyla gerçekleşmiş, ve aynı zamanda protokorm oluşumu, kök ve yaprakların oluşumu 6 hafta içerisinde hızla tamamlanmıştır. Gün ışığında protokormlar klorofil oluşturarak yeşillenmiştir. Besin ortamına %1 oranında nişasta veya sakkaroz eklenmesiyle daha uzun kökler oluşmuş, fakat buna karşılık ışığın teşvik ettiği klorofil oluşumunda azalma ortaya çıkmıştır. Mikorhizal fungusların karbonhidrat havuzundan heterotrofik olarak beslenen orkidelerin bu yüzden gelişmelerinin daha güçlü ve çabuk olabileceği anlatılmaktadır.

Özkoç ve Dalcı (1993), *Orchis laxiflora* tohumlarının iki farklı besin ortamında çimlendirme ve bitki gelişimi üzerine bazı fungusların etkisini araştırmış ve farklı ülkelerden temin edilen 11 mikorizal fungal izolatı yulaf ve modifiye yulaf ortamında karşılaştırmışlardır. Her iki ortamda da en iyi tohum çimlenmesi ve fide gelişimi No. 624 ve F 418 yabancı izolatlarda olmuş, bunu F 397 izlemiştir. İki Türk izolatı ise etkisiz bulunmuştur.

Aytaş (1994), *Ophrys apifera* ve *O. sphegodes* türlerinin köklerinden elde edilen ve yurtdışından getirilen fungal izolatlarla çimlendirme denemeleri yapmıştır, fakat simbiyotik çimlenmeler başarısız olmuştur. Değişik konsantrasyonlardaki sodyum hipokloritin farklı sürelerdeki uygulamalarının çimlenme oranı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Tohumları %0.5'lik çamaşır suyunda 5 dakikadan fazla tutmak yeterli gelmiştir. %1 çamaşır suyunda en çok 10 dakikada %9 çimlenme, %1.5'ta ise 15 dakikada

en çok %10.7 çimlenme gerçekleşmiştir. VWD-N ve VWD-N+Ca ortamlarda en iyi çimlenme sırasıyla %24.7 ve %20.8 olup, tohumların %1.5'lük çamaşır suyunda 15 dakika tutulması ile elde edilmesine karşın temel VWD ortamında %10.7 oranında çimlenme meydana gelmiştir.

Özdener (1994), *Dactylorhiza urvilleana* ve *D.iberica* türlerinin köklerinden fungus izolasyonu yaparak asimbiyotik ve simbiyotik kültür ortamlarında çimlendirme ve bitki geliştirme üzerine bir araştırma yapmıştır. Çalışmanın sonucunda simbiyotik kültür çalışmalarında fungal izolatların etki derecelerinin kültür ortamının besinsel içeriğine göre değişebileceğini ortaya koymuştur. Asimbiyotik çimlendirme çalışmasında seyreltik ve konsantre kültür ortamları kullanmıştır ve seyreltik kültür ortamına eklenen şekerin çimlenme üzerine olumsuz etki yaptığını belirlemiştir. Konsantre VWD kültür ortamının şeker ve inorganik azotun fide gelişimi için gerekli olduğu belirlenmiştir.

Beyle ve ark., (1995) tarafından, *Dactylorhiza maculata* türü tohumlarının çimlenmesine yardımcı olması için orkide köklerinden izole edilmiş *Rhizoctonia stahlia* fungusu kullanılmıştır. Bu uygulama sonrasında olumlu etki elde edilmiş, iki hafta içinde protokorm oluştuğu ve soğuk uygulaması yapıldığında daha hızlı bir gelişme sağlandığı kaydedilmiştir.

Vakkasoğlu (1995), Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki salep orkidelerinde mikorhizal fungusların izolasyonunu ve bu fungusların salep tohumlarının çimlenmesi ve gelişimi üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışmanın sonucunda *Ophrys vernixia*, *Orchis coriophora* tohumları *Rhizoctonia solani* türünün var olduğu ortamda fide oluşturmuş; *Orchis anatolica* türünde ise sadece protokorm elde edilebilmiştir.

Gezgin (2004), Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde yetişen ve salep elde edilmesinde kullanılan orkidelerin kök ve yumrularından *Fusarium*, *Rhizoctonia* ve *Papulaspora* cinslerine ait fungus izolatları elde etmiş, toplam 47 fungus izolatının 44'ünün *Fusarium* cinsine; 2'sinin *Rhizoctonia* ve bir tanesinin de *Papulaspora* cinsine ait olduğunu belirlemiştir. Aynı zamanda araştırmacı funguslarla ilgili propagül boyutu, biyoformasyon gibi konularda da detaylı çalışmalar yapmıştır.

Sazak (2004), Yurt dışından temin edilen fungal izolatlar ile Türkiye'de yayılış gösteren orkidelerin yumrularından izole edilmiş izolatların *D. romana* subsp. *romana*, *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* ve *Spiranthes spiralis* türlerinde tohum çimlendirme ve bitki gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. 624 kodlu fungal izolatın en etkili izolat olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bitki gelişimi için inorganik azotun önemli olduğunu

vurgulamıştır.

Magrini ve ark. (2011) tarafından yapılan bu çalışma, Akdeniz'de geniş bir yelpazede yayılış gösteren nesli tükenme tehlikesi altında bulunan karasal orkidelerini korumak adına yapmışlardır. Tehdit altında olan türlerden *Anacamptis palustris* ve yaygın olarak bulunan bu üç tür *A. laxiflora*, *A. morio* ve *A. papilionacea* ile *in vitro* çimlenme yetenekleri, orkide dağılımı ve korunması üzerine çalışma yapmışlardır. Asimbiyotik çimlenme için BM-1 ortamına olgun tohumları ekmişlerdir. *In vitro* tohum gelişimi ve protokorm oluşumu aşamaları ekimden 20 boyunca değerlendirilmiştir. Fide gelişiminde farklı türler arasında önemli bir fark olduğu tespit edildi ve aynı zamanda nadir türler arasında bir korelasyon olduğu açıkça tespit etmişlerdir.

Çığ (2012), yapmış olduğu araştırmada Doğu Anadolu Bölgesi salep orkidesi türlerinden olan *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C.M. Richard, *Dactylorhiza iberica* (Bieb. ex Willd.) Soó, *Dactylorhiza romana* (Seb.) Soó subsp. *georgica* (Klinge) Soó ex Renz & Taub., *Dactylorhiza umbrosa* (Kar. et. Kir.) Soó, *Orchis palustris* Jacquin ve *Ophrys straussii* (Fleischm & Bornm.) Nelson tohumları *in vitro* ve *in vivo* koşullarda simbiyotik (YO-yulaf ortamı, MYO-modifiye yulaf ortamı, PDA-potato dekstrose agar) ve asimbiyotik (VWD-Van Waes & Debergh, KC-Knudson-C, MS-Murashige & Skoog, ½ MS ve 1/10 MS ortamı) kültüre alınarak çimlenme, protokorm ve sürgün elde ettiği belirtilmiştir. Simbiyotik kültürlerde bitkilerin kendi yumrularından izole edilen *Rhizoctonia solani* ve binükleik *Rhizoctonia* funguslarını kullanmıştır. Yapmış olduğu çalışmanın sonucunda *in vitro* koşullardaki *Rhizoctonia solani* ve PDA kültürleri ile *in vivo* koşullardaki kültürlerin hiçbirisinden sonuç alınamamıştır. Simbiyotik kültürde sadece *D. iberica*, *D. umbrosa* ve *O. palustris* türlerinde sürgün oluşmuş, ancak yumru ve kök oluşumu sağlanamamıştır. Asimbiyotik kültürde ise oluşan sürgünlerde en yüksek köklenme oranı ½ MS'te gelişen *D. umbrosa* (% 100); en yüksek yumru oluşum oranı VWD'de gelişen *O. straussii* (% 71.03) türlerinde elde edilmiştir. Yeterli büyüklüğe ulaşan köklü ve yumrulu sürgünler viyollere aktarıldıktan bir süre sonra canlılıklarını yitirmişlerdir.

2.3. Tropikal Orkideler Üzerine *In Vitro* Çalışmalar

Orkideler üzerine *in vitro* çalışmalar başta tropikal orkideler olmak üzere çok sayıdaki orkide türünde tohumların çimlenmesi üzerine farklı besin ortamlarının, büyüme düzenleyicilerinin, besin ortamlarının fiziksel özelliklerinin etkileri araştırılmıştır (Olivia ve Arditti 1984, Jong ve Sin 1985, Singh ve Prakash 1985).

Tay ve ark., (1988), *Paphiopedulum sukhakuli* ve onun *P.nevium* (*P.niveum*), *P.acmodontum* ve *P. bellatum* (*P. bellatulum*) ile olan türler arası melezlerinin tohumlarını *in vitro* çimlendirmeye almışlardır. 6 hafta veya daha fazla karanlıkta bekletilen kültürlerde ve Norstog besin ortamında en yüksek çimlenme oranı elde edilmiştir. Ancak karanlık koşullar devam ettiğinde protokormlardan sürgün ve kök gelişmemiştir. Burgeff EG-1 ortamında tohumlar zayıf bir çimlenme göstermiş, ancak tüm ortamlardan elde edilen protokormlar ışıklı koşullara transfer edildiğinde hızlı bir şekilde yapraklar ve kökler oluşmuştur. Genel olarak en iyi sonuçlar, karanlıkta Norstog ortamında tohum çimlendirme ve bunun ardından protokormların 0.5-1.0 mm çapa ulaştığında Burgeff EG-1 ortamına transfer edilerek aydınlık koşullarda kültürün devam etmesi yoluyla elde edilmiştir.

Das ve Goshall (1989), Bengal vadisinde yetişen bazı orkidelerin olgun tohumlarının *in vitro* ortamda çimlenme kabiliyetleri konusunda denemeler yapmışlardır. Farklı tropikal orkide türlerine ait tohumların, değiştirilmiş Knudson C ve Burgeff Eg-1 ortamında *in vitro* koşullarda çimlenmesi incelenmiştir. Burgeff Eg-1 ortamı, tohum çimlenmesi bakımından daha iyi sonuçlar vermiş olup bu ortamda *Dendrobium chrysotoxum*, *D.pierardii* x *D.crepidatum*, *Aerides multiflorum* ve *Cymbidium aloifolium* türlerinin yeşil kapsüllerindeki tohumlar başarılı bir şekilde çimlenmiştir. İkinci gerçek yaprakların oluşumundan sonra fidelerin transfer edildiği besin ortamlarına 1mg/L NAA ilavesi, köklenmenin teşvik edilmesi bakımından olumlu bulunmuştur.

Devi ve ark., (1990), *Dendrobium* cinsine ait bazı Kuzeydoğu Hindistan orkide türlerinin tohumlarını *in vitro* koşullarda çimlendirmek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. *D. moschatum*, *D. farmeri*, *D.fimbriatum* var. *oculatum* ve *D. Primulinum* türlerine ait tohumlar 4 farklı ortama (Vacin ve Went, Burgeff, Nitsch ve Nitsch ve Knudson C) ekilmiştir. Çimlenme oranı, *D. farmeri* ve *D. primulinum* türleri için Vacin ve Went ortamında; diğer iki tür için ise Nitsch ve Nitsch ortamında %50-60 değerleri ile diğer ortamlardan daha yüksek olmuştur. Bir sonraki aşamada, aynı türlerin tohumlarının çimlendirilmesi amacıyla Vacin ve Went ve Nitsch ve Nitsch ortamlarına değişik katkı maddeleri ilave edilmiştir. Vacin ve Went ortamına %15 hindistancevizi sütü + %5 muz ekstratı + %5 ananas suyu eklendiğinde çimlenme artmış, *D. farmeri* ve *D. primulinum* türlerinde fidelerin yaprak ve kök gelişimi hızlanmıştır. Benzer tepkiler Nitsch ve Nitsch ortamına %15 hindistancevizi sütü + 1mg/L NAA eklendiğinde *D. fimbriatum* var. *oculatum* türünden de elde edilmiştir.

Sharma ve Tandon (1990), besin ortamına ilave edilen değişik karbon kaynaklarının, bazı tropikal orkide türlerinin tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Ticari orkide yetiştiriciliğinde önemli yeri olan *Cymbidium elegans* ve *Coelogyne punctulata* türlerine ait tohumlar % 2-7 arasında sakaroz, D-glukoz, maltoz, D-fruktoz, D-mannoz, trehaloz, rafinoz, L-glukoz veya L-mannoz içeren veya içermeyen Knudson C ortamına ekilmiştir. 20 veya 30g/L sakaroz, D- fruktoz ve Dglukoz her iki türde de en iyi çimlenme ve fide gelişim sonuçlarını vermiştir. Trehaloz, maltoz, D-mannoz ve rafinozda ise orta derecede bir gelişim elde edilmiş olup L-glukoz ve L-mannoz ya da şeker ilave edilmeyen ortamlarda çimlenme ve fide gelişimi bakımından kabul edilebilir sınırların altında sonuçlar elde edilmiştir.

Lauzer ve ark., (1994), *Cypripedium acaule* türüne ait asimbiyotik koşullarda çimlenemeyen olgun tohumların çimlenmesini teşvik etmek için çeşitli uygulamalar yapmışlardır. Soğuk uygulaması, su altında yıkama, GA3 uygulamaları, *in vitro* çimlenmeyi uyarma konusunda yetersiz kalmıştır (çimlenme oranı %5'in altında kalmıştır). Bununla birlikte sodyum hipoklorit ile yapılan dezenfeksiyon veya ultrason uygulamaları çimlenmeyi sırasıyla %10.4'e ve %29.2'ye yükseltmiştir. Bu uygulamalar tohum kabuğunun yapısını değiştirmiş ve bu türün çimlenme oranının artmasını sağlamıştır. Yine de embriyolar TTC ile boyandığında elde edilen canlılık oranı ile çimlenme oranı hiçbir zaman birbirine yakın olmamıştır. Canlılık bakımından sorun bulunmadığı halde, türün *in vitro* çimlenme oranı genel olarak düşük çıkmıştır.

Malemnganba *et al.* (1994), *Phaius tankervilleae*, *Dendrobium moschatum* ve *D. fimbriatum* var. *oculatum* türlerine ait orkidelerin tohumundan *in vitro* koşullarda bitki elde etme yoluyla yapılacak ticari orkide üretiminin daha düşük bir maliyetle başarılabilmesi amacıyla alternatif besin ortamları üzerinde çalışmışlardır. Bu amaçla ticari gübreler, sofralık şeker (çay şekeri) ve %15'lik hindistancevizi sütünden oluşan bir reçete kullanmışlardır. MS, Knudson C ve Nitsch ortamlarıyla karşılaştırma yapıldığında, kullanılan yeni ve ucuz karışımın çok daha hızlı protokorm oluşturduğu ve sürgüne dönüşüm sağladığı gözlenmiştir. Böylece alternatif besin ortamı kullanımlarıyla maliyetin %70 oranında tasarruf yapılarak azaltılabileceği ortaya konmuştur.

Bhaskar ve Rajeevan (1996), Vanda tipi tropikal orkide çeşitidi olan 'John Club'da tohum çimlendirmeyi amaçlamıştır. Vanda 'John Club' embriyolarının (olgunlaşmamış tohumlar) çimlenmesi, 4 farklı kültür ortamında test edilmiştir. Protokorm üretiminde en iyi sonucu yarı konsantrasyondaki MS ortamı sağlamıştır. 5mg/L BA, 2 mg/L NAA, 2 mg/L 2,4-D, 4g/L aktif kömür ve 15g/L sakaroz kullanıldığında, embriyonun hızlı

proliferasyonu ve kök ve sürgün farklılaşmasının hızlandırılması kolaylaşmıştır.

Miyoshi ve Mii (1998), *Calanthe discolor* Lindl. tohumlarını 7 gün boyunca 1-100 mg/L NAA; 1000 mg/L Ethephon veya 10 ve 100 mg/L BA çözeltisinde bekletmişlerdir. Bu uygulamalardan çıkan tohumlar hormonsuz ortamlara ekildiğinde, kontrol uygulamasına göre 1.5-2.9 kat daha fazla protein oluşumu sağlamışlardır. Ortama ilave edilen GA₃, tohum çimlenmesi ve protokorm oluşumu üzerine olumlu bir etki yapmamıştır.

Sushmita-Bhattacharjee ve ark., (1999), *Phalaenopsis* hibrit tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlenmesi ve bitki elde edilmesi üzerinde çalışmışlardır. Besin ortamı olarak MS, Rosa ve Laneri ve Knudson C kullanmışlardır. Tohum ekiminden itibaren çimlenmeye kadar geçen gün sayısı, fide büyümesi ve gelişimi kaydedilmiştir. En hızlı tohum çimlenmesi ve fide gelişimi Rosa ve Laneri ortamında meydana gelmiş, bunu MS ortamı izlemiştir.

Pedroza-Manrique ve Mican-Gutierrez (2006), Kolombiya'da nesli tehlike altında olan *Odontoglossum gloriosum* orkide türünde etkin bir tohum çimlendirme yöntemi geliştirmek istemişlerdir. Bu amaçla üç besin ortamı MS tuzları; KC tuzları; Hydro-Coljap tuzları), aktif kömür (0 ve %0.5 w/v); NAA (0, 2.68 ve 5.37 µM); 4 ışık rejimi (beyaz ışık, karanlık, kırmızı ışık ve kızılötesi ışık) kullanmışlardır. Çimlenme oranı ve çimlenme zamanı açısından en iyi uygulama Hydro-Coljap tuzları ve 2.68 µM NAA ortamında, kırmızı ışıkta ve 16 saat fotoperiyot koşullarında elde edilmiştir. Aktif kömür ilavesi, ne çimlenme oranı ne de fide gelişimi üzerinde olumlu bir etki yapmamıştır. Bu çalışma; tek bir tohum kapsülünden 40 haftada 330.000'den fazla bitkicik elde edilebileceğini göstermiştir.

Stewart ve Kane (2006), Florida'daki tehlike altında olan bir orkide türünün (*Haberina macroceratitis*) tohumlarından *in vitro* bitkiler elde etmek için araştırmalar yapmışlardır. Altı farklı besin ortamı, 4 farklı sitokinin ve 3 fotoperiyodik düzen içinden çimlenme için en uygun olanını belirlemek amaçlanmıştır. LM ve KC ortamları 8 hafta sonra en yüksek çimlenme oranını vermiştir. Protokorm oluşumu ise MM ortamında 8-16 hafta sonra meydana gelmiştir. Zeatin ve kinetin 1 µM dozunda, çimlenme oranını artırmıştır. %91.17'lik toplam çimlenme oranı (%91.17) ve protokorm oluşumu, tümüyle karanlıkta elde edilmiştir. Ancak fidelerin gelişimi için 8/16 saat fotoperiyot olumlu bulunmuştur.

2.4. Karasal Orkidelerde *In Vitro* Çalışmalar

Hatipoğlu ve ark. (1984) tarafından, *Anacamptis pyramidalis* ve *Orchis sancta* çimlendirilmiş Burgeff, Fast ve Voth besin ortamının modifiye edilmiş halleri kullanılmıştır. Burgeff ortamında tohumlar 20 günde protokorm oluşturduğu ve bundan bir ay kadar sonra intermedica kültür solüsyonuna aktarılan fidelerden yaprak oluştuğu gözlenmiştir. Bu araştırma ile elde edilen bitkilerin aklimatizasyon sürecine kadar olan kısmında başarı elde edildiği belirtilmiştir.

Van Waes ve Debergh (1986); 23 adet Batı Avrupa orkidesinde *in vitro* koşullarda tohum çimlendirmesi üzerinde çalışmışlardır ve çimlenme oranı üzerine etki eden bazı faktörler hakkında bilgi edinmiş ve bunları paylaşmışlardır. Çimlenmede tohum kabuğunun engelleyici bir etkisinin bulunduğu ve sterilizasyonda kullanılan kalsiyum hipoklorit+Tween-80 karışımının ne kadar süreyle uygulandığının, çimlenme üzerinde etkisinin bulunduğu araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Sert kabuklu türlerde sterilizasyon süresinin uzun tutulması, tohum kabuğunu aşındırarak çimlenmeyi olumlu yönde etkileyebilmektedir. Besin ortamındaki azot kaynağı ise türlere bağlı olarak değişmektedir ve ayrıca besin ortamına kazein hidrolizat ilave edilmesi, çimlenmeyi olumlu etkilemiştir. *Cypripedium calceolus* ve *Epipactis helleborine* türlerinde çimlenme için bir sitokinine ihtiyaç duyulmuş, fakat *Dactylorhiza maculata* ve *Listera ovata* için hormon katkısına gerek olmamıştır. 23 tür arasında 21 tanesi, çimlenmeyi az veya çok başarmıştır.

Waes (1987), 18 orkide türünde çimlenme aşamasında ve daha sonraki gelişme aşamalarında aktif karbonun etkilerini araştırmıştır. Tüm türlerde %0.02-0.1 oranında ilave edilen aktif karbon, daha düşük çimlenme oranı ve daha yavaş gelişmeye neden olmuştur. Diğer yandan aktif karbon ilave edilen transfer ortamları genel olarak gelişmeyi uyarmıştır. Besin ortamına yüksek miktarda polifenol salgılayan türlerde (*Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza* spp., *Epipactis* spp., *Gymnadenia* spp. Ve *Listera ovata*) aktif karbon ilave edilmesi, daha iyi bir gelişme sağlamıştır. Fakat *Ophrys fuciflora*, *Orchis mascula* ile *O. morio* ve *Spiranthes spiralis* gibi gözle görülen bir polifenol salgısı olmayan türlerde herhangi olumlu bir etki ortaya çıkmamıştır.

Özkoç ve Dalcı (1991) tarafından, *Orchis laxiflora* türünün tohumlarını steril koşullarda hem konsantre hem de seyreltik besin ortamlarına ekim işlemi yapıldığında her iki ortamda da çimlenmenin olduğunu, ama sadece konsantre besi ortamında gelişmenin devam ettiğini ve ortamdan inorganik azotun çıkarılması durumunda çimlenmenin arttığı bu çalışmada ortaya konmuştur.

Özavcı (1995) tarafından Kahramanmaraş'ta doğal olarak yayılış gösteren bazı orkide türlerinde (*Ophrys bornmuelleri*, *Himantoglossum affine*, *Orchis anatolica*, *O. phryga*, *Serapias vomeraceae* ve *O. coriophora*) ve 22 farklı besin ortamında embriyo kültürü yaparak yumru oluşturmaya çalışmıştır. Sonuçta *O. anatolica* ve *Orchis coriophora* orkide türlerinde yumru elde etmede başarı sağlanmıştır. *O. coriophora* türünde ise VW&D+ Domates Ekstraktı + Aktif Karbon ortamında, *O. anatolica* orkide türünde ise VW&D besin ortamında en iyi sonuç elde edilmiştir.

Gönülşen ve ark. (1996) tarafından Ege ve Doğu Akdeniz Bölgesinden örnekler toplanmıştır. Ege Bölgesinde yapılan arazi çalışmasında toplanan örnekler; *Orchis italica*, *O. anatolica*, *O. sancta*, *O. papilionacea*, *O. laxiflora*, *O. mascula* ssp. *pinetorum*, *O. mario*, *Ophrys mammosa*, *O. reinholdii* ssp. *reinholdii*, *O. lutea* ssp. *minor*, *O. halosericea*, *O. bornmuelleri*, *O. ferrum-equinum*, *O. umbilicata* ssp. *umbilicata*, *O. fusca*, *O. speculum*, *Dactylorhiza romano*, *Serapias vomeracea*, *S. vomeracea* ssp. *laxiflora*, *Aceras antropophorum*, *Anacamptis pyramidalis* türleri belirlenmiştir. Embriyo kültüründe *Orchis laxiflora*, *O. sancta* ve *Serapias vomeracea* türlerinde başarılı sonuç alınmıştır. Doğu Akdeniz Bölgesinden toplanan örnekler, *Orchis anatolica*, *O. coriophora*, *O. italica*, *O. tridentata*, *O. punctulata*, *Ophrys bornmuelleri*, *O. transhyrcana*, *O. vernixia*, *O. apifera*, *O. umbilicata* ssp. *umbilicata*, *O. holoserica*, *Platanthera chlorantha*, *Anacamptis pyramidalis*, *Himantoglossum affine*, *Serapias vomeracea*, *Dactylorhiza* spp. türleri belirlenmiştir. *Orchis anatolica*, *Ophrys bornmuelleri*, *Serapias vomeraceae* ve *O. coriophora* orkide türleri embriyo kültüründe başarılı bir şekilde üretilmiştir. Sürgün ucu kültüründe *Himantoglossum affine* ve *O. anatolica* orkide türlerinde çoğalmasında başarı sağlanmıştır, fakat bitkideki aşırı kararmalar sonucunda bitki elde edilemediği belirtilmiştir.

Vejsadova ve Mala (1996), Çek Cumhuriyeti'nden toplamış oldukları 8 farklı orkide türüne ait (*Gymnadenia conopsea*, *Orchis morio*, *Liparis loeselii*, *Dactylorhiza longibracteata*, *D. incarnata*, *D. bohemica*, *D. maculata* ve *Epipactis palustris*) orkide tohumları %10'luk çamaşır suyu veya %7'lik kalsiyum hipoklorit + %70 etil alkol çözeltisinde yüzeysel sterilizasyona tabi tutmuşlardır ve daha sonra üç farklı ortama ekmişlerdir. 18-22°C'de ve karanlıkta dört ve sekiz hafta sonra çimlenme oranlarını belirlemişlerdir. Yüzeysel sterilizasyon süresinin ve konsantrasyonunun olgunlaşmamış ve tam olgun tohumlarda çimlenmeyi olumlu etkilediği bulunmuştur.

Çağlayan ve ark. (1998) tarafından nesli tehlike altında olan salep orkidelerinin *in vitro* üretilmesi araştırılmıştır. Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen salep

orkidelerinden *Ocrhis anatolica*, *O. coriophora*, *Ophrys bornmuelleri*, *O. phrigra*, *Serapias vomeraceae* ve *Himantoglossum affine* embriyoları *in vitro*'da 14 farklı besin ortamında kültüre alınmıştır. En yüksek ortalama çimlenme ve protokormdan bitki oluşum oranları %2.39 ve %1.86 olarak Van Waes Debergh + Domates Ekstraktı + Aktif Karbon (VW&D + DE + AK) ortamında bulunmuştur. En yüksek yumru oluşum oranı ise %2.453 ile aynı ortamda bulunduğu belirtilmiştir.

Önal (1999) tarafından yapılan araştırmada, *Aceras*, *Anacamptis*, *Ophrys*, *Orchis*, *Serapias* ve *Dactylorhiza* cinslerine ait toplam 21 orkide türleri Ege Bölgesi'nden toplanmıştır. *Orchis sancta*, *Serapias vomeracea* ve *O. laxiflora* embriyo kültürü ile başarıyla üretilmiştir, fakat diğer türlerde başarı sağlanamamıştır. *Orchis sancta* ve *O. laxiflora* türlerinde "5°C'de ve karanlık koşullarda" yumru elde etme oranı, normal koşullardan (25°C, 16s ışık) daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Aynı türler için en uygun aklimatizasyon zamanı Ağustos ayı olmuştur. En yüksek çimlenme yüzdesi Knudson C+ %10 patates ekstraktında %80 oran ile *O. laxiflora* türü; *O. sancta* türünde %100 oran ile yine aynı ortamdan ve *S. vomeracea* türünde ise %40 oran ile Knudson C+ %10-20 muz ekstraktından elde edilmiştir. En yüksek "mg tohum" başına gelişen bitki sayısı ise, *O. laxiflora* türünde 46,7 adet bitki ile Knudson C+%10 Hindistan cevizi sütü; *O. sancta* türünde 49.5 bitki adeti ile KC+ %20 patates ekstraktı ve *S. vomeracea* türünde ise 37, bitki adeti ile Van Waes&Debergh+0.2mg/L GA3 besin ortamından elde edilmiştir.

Szendrak ve Read (2000) tarafından, Orkide tohumlarının çok narin ve besin deposundan yoksun embriyolara sahip olduğu ifade edilmektedir, bu nedenle 52 değişik orta kuşak karasal orkide türünde *in vitro* çimlendirme üzerinde çalışmışlardır. Besin ortamı olarak bu türlerin kültürü için değiştirilmiş Fast ortamı kullanılmıştır. Kültürler tohum ekiminden sonra 10-12°C ve karanlık koşullarda 4 hafta süreyle bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda çimlenme gerçekleşene kadar sıcaklık 25-26°C'ye ayarlanmıştır. Bundan sonra kültürler mevsimsel sıcaklık değerlerine göre düzenlenmiştir: Nisan başından Eylül sonuna kadar 25-26°C, Ekim ayından Mart'a kadar 17-19°C. 25 tür bu yöntemle başarıyla yetiştirilmiş ve 2-3 yılın sonunda dış koşullara aktarılmıştır. Ayrıca çimlenmenin değişik aşamaları elektron mikroskopu preparatlarıyla incelenmiştir. İlk görülebilen farklılık, kültüre alındıktan sonraki birkaç hafta sonra tohum kabuğunun çatlaması ve apikal meristemin dışarı çıkmasıdır. Genç protokorm sayısız saydam kökçük (rhizoid) ile sarılı durumdadır. Çimlenmenin son aşaması olarak, ilk gerçek yaprağın ve ilk kökün gelişmeye başladığı an söylenebilir. Bu çalışmada ayrıca olgunlaşmış organlar ve dokular da incelenmiştir. Orkide mikorhizalarının köklerle birlikte oldukları yapısal detaylar ve

depolanan maddeler (kalsiyum okzalat kristalleri ve nişasta), yaprak/gövde stoma yapıları ve generatif organların anatomik detayları ile tohum taslağı/tohum gelişimi konularında yeni bilgilere ulaşılmıştır.

Polonyalı araştırmacılar Pindel ve Pindel (2004), Avrupa’da bulunan nesli tehlike altında olan bazı seçilmiş karasal orkide türlerinde doku kültürü yoluyla çoğaltım yapılması konusunda detaylı çalışmalar yapmışlardır. Beş farklı orta kuşak orkide türüne ait (*Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza maculata*, *Epipactis helleborine*, *Goodyera repens* ve *Gymnadenia conopsea*) farklı eksplantların ve besin ortamı kompozisyonlarının; hızlı çoğaltımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Eksplant tipleri olarak; çiçeklenmeden bir hafta önceki yumurtalıklar, tam çiçeklenme dönemindeki yumurtalıklar, çiçeklenmeden 10 gün sonra alınan yeşil kapsüller ve çiçeklenmeden 25 gün sonra alınan olgun kapsüller kullanılmıştır. Knudson (medium K) veya MS ortamı makro ve mikro tuzları ile vitamin (5mg/L thiamin veya 100 mg/L myoinositol), oksin (0.3 veya 0.5mg/L NAA, 0.5mg/L IAA ve 0.5mg/L 2,4-D), sitokinin (0.1, 1.0, 2.0 ve 5.0 mg/L benzil adenin), aktif karbon (%0.1 veya 0.2) besin ortamı bileşimlerinin oluşturulmasında kullanılmıştır. En uygun eksplant kaynağı, denemelerde kullanılan türe göre farklılık göstermiştir. Örneğin *C. calceolus*, *D. maculata* ve *G. repens* türlerinde yeşil kapsüller; *E. helleborine* türünde çiçeklenme öncesindeki yumurtalıklar; *G. conopsea* türünde tam çiçeklenme dönemindeki yumurtalıklar en iyi sonuçları vermiştir. Genel olarak eksplantlar, 0.3 mg/L NAA, 1.0mg/L BA ve %0.1 aktif kömür içeren MS ortamında protokorm benzeri yapılar, kök ve sürgün meristemleri veren protokormlar veya kallus oluşumu sağlamışlardır.

Kitsaki ve ark., (2004), Yunanistan’dan toplanan ve çoğu bu ülke için endemik olan 13 değişik *Ophrys* türünde (*O. attica*, *O. apiifera*, *O. delphinensis*, *O. cornuta*, *O. lutea*, *O. ferrumequinum*, *O. speculum*, *O. mammosa*, *O. umbilicata*, *O. argolica*, *O. iricolor*, *O. tenthredinifera* ve *O. spruneri*) *in vitro* koşullarda tohum çimlenmesi, protokorm ve bitkicik oluşumu üzerine etki eden faktörler üzerinde araştırma yapmışlardır. İncelenen faktörler genotip etkisi, tohum olgunluğu ve besin ortamı bileşimidir. Toplandıktan 10 ay sonraki olgun tohumlar ve çiçeklenme döneminden 2 ay sonraki tohumlar, hindistancevizi sütü veya ananas suyu ile zenginleştirilmiş besin ortamlarında kültüre alınmıştır (sırasıyla CEM ve PEM ortamları). En yüksek kallus oluşumu (%96) CEM ortamında kültüre alınan *O.delphinensis* türünün olgunlaşmamış tohumlarından alınmıştır. En yüksek protokorm oluşumu ise (%52) yine CEM ortamındaki *O. spruneri* türünün olgun tohumlarından elde edilmiştir. Olgunlaşmamış tohumlardan protokorm oluşumu, her iki ortamda da olgun tohumlara göre çok daha düşük oranlarda kalmıştır. Transfer edilen protokormların hemen

hepsi bitkiciğe dönüşmüş ve mini-yumrular oluşturmuştur. PEM ortamları, bitkiciklerde mini-yumruların oluşumunu teşvik etmiştir. Denemede yer alan tüm faktörler ve bunların arasındaki interaksiyonlar, kallus veya protokorm oluşumu üzerine istatistiksel olarak önemli düzeyde etki yapmıştır.

Vejsadova (2006), orkide tohumlarının çimlenme oranlarını artırmak amacıyla sterilizasyonda kullanılan maddenin dozu ve süresiyle ilgili çalışmıştır. Nesli tehlike altında olan üç karasal orkide türü (*Dactylorhiza incarnata ssp. serotonia*, *D. maculata ssp. maculata*, *Liparis loeselii*) tohumlarını sodyum veya kalsiyum hipokloritin farklı dozlarında ve farklı sürelerle muamele etmişlerdir. Tohum yüzeyini kahverengiden fildişi beyazına kadar döndüren %7.2'lik kalsiyum hipoklorit, çimlenme oranını artırmıştır. Besin ortamına 1g/L pepton veya düşük dozlarda zeatin, IAA ve NAA ilave edilmesi, 12 ay sonra fide gelişim parametrelerini artırıcı yönde etki yapmıştır.

Yararbaş (2008), salep orkidesi tohumlarının *in vitro* ortamda çimlendirilmesi konusundaki çalışmasında tohumlara ultrason uygulaması yapmıştır. Besin ortamı olarak 1/10 MS + %20 şeker karışımı kullanmıştır. %1'lik sodyum hipokloritte 10 dakika sterilize edilen tohumlarda enfeksiyon riski ortadan kaldırılmıştır. *Orchis italica* türünde çamaşır suyu+ultrason uygulamasında 15 günde %81; kontrol uygulamasında 90 günde %89 çimlenme elde edilmiş ve 2 ay gibi kısa bir süre sonunda ilk yaprakların oluşmaya başladığı belirtilmiştir. *Ophrys tenthredinifera* türünde ise ultrason+5 dakika şok uygulamasından 60 gün sonra %5.3 çimlenme elde edildiği rapor edilmektedir.

Valletta ve ark., (2008) tarafından *Orchis mascula* L. türünde *in vitro* koşullar altında altı farklı ortam bileşimi denenerek, tohum kabuğu geçirgenliğinin *in vitro* çimlenme üzerine etkileri, sterilizasyon konsantrasyonu ve süresinin çimlenme üzerine etkileri incelenmiştir. Orchimax (Duchefa) ticari ortamında bazı modifikasyonlar yapmışlar, bunların arasından BA ilave edilen ve aktif karbon bulunduran bileşimde % 5.12 çimlenme elde edilebildiğini kaydetmişlerdir.

Gümüş (2009) tarafından Batı Karadeniz bölgesinde nesli tükenme tehlikesi altında olan 16 türün *in vitro* ve *in vivo* kültürleri yapılmıştır. Bu türler; *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza incarnate*, *D. romana*, *D. nieschalkiorum*, *Ophrys ferrumequinum*, *O. apifera*, *Orchis mascula ssp. pinetorum*, *O. coriophora*, *O. laxiflora*, *O. pallens*, *O. morio*, *O. simia*, *O. tridentata*, *O. purpurea*, *Serapias vomeracea ssp. orientalis*, *Platanthera chlorantha* türleri olduğu belirtilmiştir. Farklı besin ortamı bileşenleri ve konsantrasyonları (MS, 1/2 MS, KC-N, KC, VW & DB,), besin ortamlarına GA3 bitki

büyüme düzenleyicisinin farklı konsantrasyonları (0, 0.1, 0.5mg/L) uygulanmıştır ve inkübasyon sırasında farklı aydınlatma rejimi uygulamaları yapılmıştır; bu uygulamaların çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişim oranları üzerine etkilerini incelemişlerdir. En yüksek bitki oluşum oranı KC ortamından % 89.88 oran ile *O. morio* türünde; % 57.65 oran ile *S. vomeraceae* türünde; % 48.35 oran ile *O. coriophora* türünde ve % 14.57 oran ile *O. laxiflora* türünde; 0.5mg/L GA3 ilave edilen KC besin ortamında % 19.87 oran ile *D. nieschalkiorum* türünde en iyi çimlenme ilde edilmiştir. Aklimatizasyon işleminde tam olarak bir başarı elde edilememiştir, elde edilen bitkiler en fazla birkaç ay içerisinde canlılıklarını yitirmişlerdir.

Kısakürek ve ark. (2009) tarafından, Maraş salebi olarak bilinen, *Orchis coriophora*, *O.laxiflora*, *Himantoglossum affine*, *O.anatolica* ve *O.mascula* türlerinde *in vitro* koşullar altında tohum çimlendirme çalışması yapmışlardır. Üç farklı besin ortamının (VWDB, PF, KC) kullanıldığı bu çalışmada en yüksek çimlenme oranı KC ortamına ekilen *Orchis coriophora* türünden elde edilmiştir, bu türü *O.laxiflora* ve *O.anatolica* türleri takip etmiştir. %18 oranı ile *O.mascula* türünün çimlenme yüzdesi diğer türlere göre düşük kalmıştır, ama yine en iyi çimlenme KC besin ortamında olmuştur. Işık rejimindeki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. *H. affine* türünde herhangi bir besin ortamında çimlenme meydana gelmediği belirtilmiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak, Çanakkale ili sınırları içerisinde yetişen ve salep eldesinde kullanılan; *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich, *Anacamptis morio* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase **subsp. morio**, *Dactylorhiza romana* (seb.) Soo, *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase, türleri kullanılmıştır. Bu türlere ait bazı botanik özellikler, yetişme ortamı, çiçeklenme zamanı, yerel adı ve toplandığı bölge hakkında bilgiler aşağıda verilmiştir (Sezik, 1984; Kreutz, 2009).

3.1.1. *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich

Botanik Özellikleri: 20-50 cm yükseklikte oldukça gürbüz, boylanan ve ince bir bitkidir. Çiçek kurulu başlangıçta piramidal formlu, daha sonra koniden yumurta formuna kadar değişik biçimdedir. Çiçekler küçük-orta boyda, açık-koyu pembe veya beyazımsı renktedir. Yapraklar 5-9 lineardan lanseolata kadar olan şekillerde ve beneksizdir. Lateral sepaller geniş yayık; dorsal sepaller, petallerle miğfer meydana getirmiştir. Labellum derin üç loplu olup, tabanda iki boyuna çıkıntılıdır. Labellumun her iki yan lobu yaklaşık orta lop kadar veya biraz daha kısadır. Mahmuz çok ince ve aşağıya doğru yönelmiştir.

Yetiştirme Ortamı: Seyrek ormanlar, kayın ağaçlarının altı, çalılıklar, işlenmemiş araziler, yol şevleri, makilikler, friganalar ve zeytinliklerdedir. Kuru, ender olarak nemli, kireççe zengin toprak üzerinde bulunur. Yüksek dağlık alanlarda taze dağ çayırları içinde görülür.

Çiçeklenme Zamanı: Akdeniz Bölgesi'nde Nisan ayı başındadır. Karadeniz Bölgesi'nde ise, Temmuz ayı ortasına kadardır. Birçok *Orchis* ve *Ophrys* türünden yaklaşık bir ay daha geç, fakat *Epipactis* cinsinin türlerinden belirgin olarak daha önce çiçeklenir.

Yerel Adı: Çam Salebi, Peynir Çiçeği, Yoğurtçuk.

Toplandığı Bölge: Kilitbahir sırtları ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Yerleşke'si tepeleri (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Anacamptis pyramidalis* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

3.1.2. *Anacamptis morio* (L.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase subsp. *morio*

Botanik Özellikleri: 10-30 cm yükseklikte küçük, fakat sağlam ir bitkidir. Yapraklar tabanda rozet şeklinde düzenlidir. Yukarıdakiler ise kılıç kını şeklinde gövde yapraklarına geçiş yapmakta olup, dar-mızrağımsıdan mızrağımsıya kadar formlu ve yeşil beneksizdir. Brakteler ovaryuma eşit uzunlukta, yeşil veya kırmızımsı reklidir. Çiçekler orta büyüklükte çoğunlukla yoğun menekşe renginde, sık sık da açıktan tam beyaz veya pembeye kadar renklidir. Sepaller petallerle birleşip gevşek, yuvarlak bir miğfer meydana getirmiş. Lateral sepaller yeşil çizgilidir. Labellum 3 loplu, çok geniş, genellikle az veya çok içe katlanmış, orta lop uçta dişli; labellumun ortası koyu renklerde benekli. Mahmuz silindirik ve az veya çok belirgin yukarıya doğru bükülmüştür.

Yetiştirme Ortamı: Cılız çayırlar, seyrek ormanlar, kurak çayırlar ve otlulu yamaçlardır. Buralarda daha çok kurudan nemliye kadar alkalin topraklarda bulunur.

Çiçeklenme Zamanı: Oldukça erken olup, yüksek dağlık alanlarda Mart'ın sonundan Haziran'ın başına kadardır.

Toplandığı Bölge: Kilitbahir sırtları (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Anacamptis morio* subsp. *morio* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

3.1.3. *Dactylorhiza romana* (seb.) Soo

Botanik Özellikleri: 15-40 cm yükseklikte ince boylu ve orta büyüklüğe bir bitkidir. Yapraklar çok sayıda, genellikle tabanda rozet yapmış, lineardan linear-lanseolata kadar olan şekillerdedir. Çiçek kurulu yumurta formludan kısa silindiriğe, fakirden zengin çiçekliye kadar ve ender olarak sık çiçeklidir. Çiçekler orta büyüklükte, açık sarıdan kükürt sarısına, beyazımsı pembe veya kırmızımsıdan menekşe renkliye kadar renklidir. Sepaller lanseolattan uzun ovata kadar olan şekillerde; lateral olanlar hemen hemen geriye kıvrılmış 13 mm kadar boydadır. Petaller geniş ovat ve 10 mm kadar boydadır. Labellum öne doğru küçük 3 loplulu bazen tam, geniş ovattan ovat hatta yuvarlağa kadar olabilen şekillerde. Yüzeyde leke, benek veya çizgiler taşımazlar. Mahmuz silindirik, dik yukarıya doğru yönelmiş ve ovaryumdan daha uzundur.

Yetiştirme Ortamı: Kuraktan ılımlı nemliye kadar yerlerde kayın ve çam ormanlarında ve çalılaştırılmış meşeliklerde bulunur. Güney Anadolu'da özellikle friganalar içindeki kalkerli yamaçlarda görülür. Buralarda özellikle hafif asidikten alkalin topraklara kadar bulunur.

Çiçeklenme Zamanı: Akdeniz Bölgesi'nde Nisan'ın başlangıcında, Karadeniz Dağ'larında Mayıs'ın sonundadır.

Yerel Adı: Elçik.

Toplandığı Bölge: Denizgözü Köy'ündeki çam ormanı altlarından (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Dactylorhiza romana* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

3.1.4. *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase

Botanik Özellikleri: 15-40 cm yükseklikte orta büyüklükte, gürbüz ve genellikle bodur büyüme yapan bir bitkidir. Yapraklar mızrağımsıdan dar-mızrağımsıya kadar formlu mavimsi yeşil renkli, beneksiz, alt kısımda taban rozeti oluşturur. Yukarıdakiler ise, kılıç kını şeklinde gövde yapraklarına geçiş yapar. Çiçek kurulu küremsi, ender olarak silindirik, sık ve çok çiçeklidir. Brakteler ovaryumun yarısından daha kısadır. Çiçekler orta büyüklüktedir. Çiçek örtüsü gevşek bir miğfer oluşturur. Miğfer uzun bir sivri ucla sonlanır ve geriye doğru bükük, açık pembeden hemen hemen saf beyaz veya açık menekşeye kadar renklidir. Labellum 3 loplu, lateral loplar yayık, orta lop ikiye çatallanmış, ortada küçük bir diş taşır, pembe veya mor küçük noktalıdır. Mahmuz ovaryum kadar uzunlukta, aşağı doğrudur.

Yetiştirme Ortamı: Makilikler, friganalar, çayır alanları, kıraç araziler, yamaç çayırları, seyrek çam ormanları ve yapraklı ormanlar, (meşe) çalılıkları, zeytinlikler ve fındık kültürleridir. Buralarda daha çok alkalin ve kireçli topraklarda bulunur.

Çiçeklenme Zamanı: Deniz seviyesinde Nisan'ın başından Karadeniz'de dağlık alanlarda Haziran'ın ortasına kadardır.

Yerel Adı: Beyaz Dağ Salebi.

Toplandığı Bölge: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Yerleşkesi tepelerinden (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *Neotinea tridentata* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki materyallerinin toplanması, teşhisi ve korunması

Arazi çalışmalarında, Orchidaceae taksonlarının çiçeklenme dönemleri olan Nisan ve Mayıs ayları arasında Çanakkale merkez olmak üzere Gelibolu ve Kazdağı alanlarında arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tezde kullanılacak olan *Dactylorhiza romana*, *Anacamptis morio* subsp. *morio*, *Neotinea tridentata* ve *Anacamptis pyramidalis* türlerine ait 10 adet bitki doğal ortamlarından toprakları ile saksılara alınmıştır. *In vitro* yetiştirme sonrasında elde edilen bitkilerin de aktarılabilmesi için her bölgeden ekstra toprak alınmıştır. Bu bitkiler laboratuvar koşullarında saksılara aktarılmış ve *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü dışındaki türler kendileme yolu ile tohum elde edilmiştir. *Anacamptis morio* subsp. *morio* türünün tohumları doğal ortamlarında geliştikleri için direkt toplanmıştır. Bitkilerin tohum kapsülleri çatladığında, tohumlar kapsüllerinden çıkarılmıştır. Kapsüllerden çıkarılan tohumlar cam kavanozlara konup kullanılıncaya kadar +4°C’ de saklanmıştır. *Ophrys lutea* subsp. *minor* türüne ait polinaryum fotoğraflanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. *Ophrys lutea* subsp. *minor* türüne ait polinaryum

Örneklerin teşhis işlemleri için “Flora of Turkey and the East Aegean Island” vol 8 (Renz & Taubenheim, 1984) ve vol. 11 (Kreutz, 2000), “Orkidelerimiz” (Sezik, 1984), ve “Türkiye Orkideleri” (Kreutz, 2009) kaynakları kullanılmıştır.

Dactylorhiza romana Çanakkale Denizgözü Köyünden, *Anacamptis morio* subsp. *morio* Gelibolu Yarımadası-Kilitbahir’den, *Neotinea tridentata* Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Yerleşkesinden ve *Anacamptis pyramidalis* Gelibolu Yarımadası-Kilitbahir’den toplanmıştır.

3.2.2. Orchidaceae familyasına ait tohumların *in vitro* çimlendirilmesi

3.2.2.1. Genel doku kültürü şartları

Doku kültürü uygulamalarının tümü aseptik koşullar altında yapılmış olup, bunun için laminar akışlı ve HEPA filtreli steril kabin kullanılmıştır. Besin ortamları 500 ml’lik cam şişeler içerisinde hazırlanmış ve kullanılacak tüm malzemeler ile 1,2 atmosfer basınç altında 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süre otoklavda sterilize edilmiştir. Steril edilen besin ortamları steril kabin içerisinde her bir petriye 22-30 ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

Çalışmada temel besin ortamı olarak 3 reçete kullanılmıştır: Knudson C (Duchefa – K0215.0010), Orchimax (Duchefa – O0257.0010) ve son olarakta İsveçli amatör orkide yetiştiricisi Svante Malmgren’in bize vermiş olduğu reçete kullanılmıştır (Malmgren, 2013). Knudson ve Orchimax ortamlarına karbon kaynağı olarak 20 g/L sükröz, 1 g aktif karbon ve besin ortamının yarı katı yapıda olmasını sağlamak için de 6 g/L agar ilave edilmiştir. Svante’nin reçetesine (SV) ise; 75 mg $Ca_3(PO_4)_2$ (Duchefa – C0506.1000), 75

mg KH_2PO_4 (Sigma - 04243), 75 mg MgSO_4 (Sigma - 63140), 20 g sükroz, 1 g aktif karbon, 6 g agar ve 20 ml ananas suyu ilave edilmiştir. pH ise 6.0'a ayarlanmıştır.

3.2.2.2. Tohumların yüzeysel sterilizasyonu

Tohumlar içinde %10'luk NaClO (sodyum hipoklorit) içeren ependorfların içinde 10 dakika yüzey sterilizasyonu yapılmıştır (Şekil 3.6).



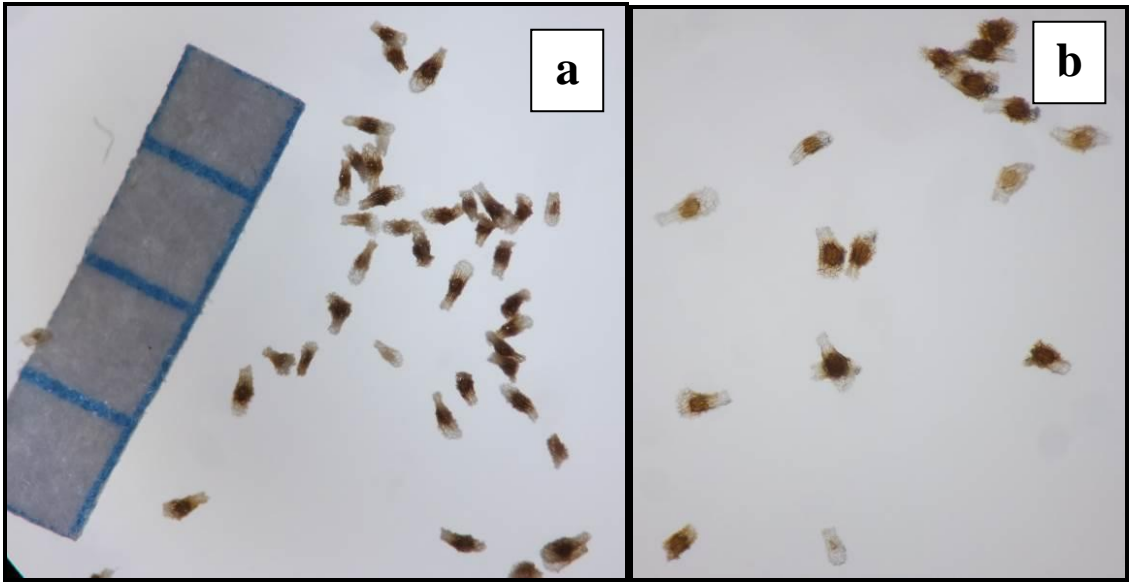
Şekil 3.6. Ependorflarda steril edilen orkide tohumları

Her bir tohum yüzeyine eşit miktarda NaClO değmesi için ependorflar vortexlenmiştir. Sürenin sonunda mikropipet yardımı ile NaClO alınıp 3 defa steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra mikropipet ile eşit miktarda alınan tohumlar petrilere ekilmiştir. Tohum ekimi yapılan petrilere dış ortam ile ilişkisinin kesilmesi amacıyla etrafı streçfilm ile sarılmıştır.

Tohum ekiminin ardından petrilere protokorm oluşuncaya kadar (2-3 ay) $18 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve sürekli karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Tohum ekiminden 1 hafta sonra embriyoların geliştiği ve çimlendiği gözlenmiştir. Bir ay sonra petrilereki toplam tohum sayısı ve çimlenen tohumlar stereo mikroskopta sayılmıştır. Bundan 4 ay sonrada 2-3mm büyüklüğündeki protokormlar sayılmıştır. Protokormlar 2-3 mm büyüklüğe ulaştıklarında tekrar aynı ortamlara alt kültürlere alınmıştır ve 20 hafta boyunca 8°C sıcaklıkta sürekli karanlık koşulda tutulmuşlardır. Yaprak oluşumu gözlemlendiğinde 40 cm mesafeden 36 W şiddetindeki floresan ışık kullanılmıştır. Orkidelere ait tohumlar ve kapsülleri fotoğraflanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Orkidelere ait tohumlar ve kapsülleri



Şekil 3.8. a) *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich türüne ait tohum, b) steril edilmiş tohum fotoğrafıdır

3.2.2.3. Bitkilerin dış koşullara alıştırılması (Aklimatizasyon)

Yaprak gelişimi olan orkidelerin dış ortama aktarılma işlemi Mart ayında yapılmıştır. Aklimatizasyon için orkidelerin doğal olarak yetiştiği ortamdan toprak alınmıştır. Bu toprağa %25 oranda çam ağacı kabuğu ve %25 oranda kuartz kum eklenmiştir. Gelişmiş orkideler toprağa aktarıldığında ilk sulama yapılmıştır, ekimden sonra toprağın kurumamasına dikkat edilmiştir, toprak kurumaya başladığında 50-75 ml su eklenmiştir ve 4-5 aylık dormansi periyodu başlamıştır.

Orkidelerin besin ortamında vermiş oldukları ilk yapraklar toprağa aktarım işleminden 2 hafta içinde kurumuştur ve bitki dormansi sürecine başlamıştır. Erken çiçeklenen *Ophrys* cinsine ait türlerde 2 ay dormansi sürecine ihtiyaç duyarken, *Orchis*, *Anacamptis* ve *Neotinea* cinslerine ait türlerde ise bu süreç 6 ay sürmektedir. Toprak

altındaki yumrular dormansi sürecini tamamladıktan sonra yeni yapraklarını verecektir. Toprağa aktarılan bitkiler fotoğraflanmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. (a) Toprağa aktarılan *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü, (b) toprağa aktarılan *Dactylorhiza romana* türü

3.2.2.4. İstatistiki analiz

XL Stat yazılım programında Marascuilo karşılaştırma testi sonuçlarına göre harflendirilerek yapılmıştır.

BÖLÜM 4

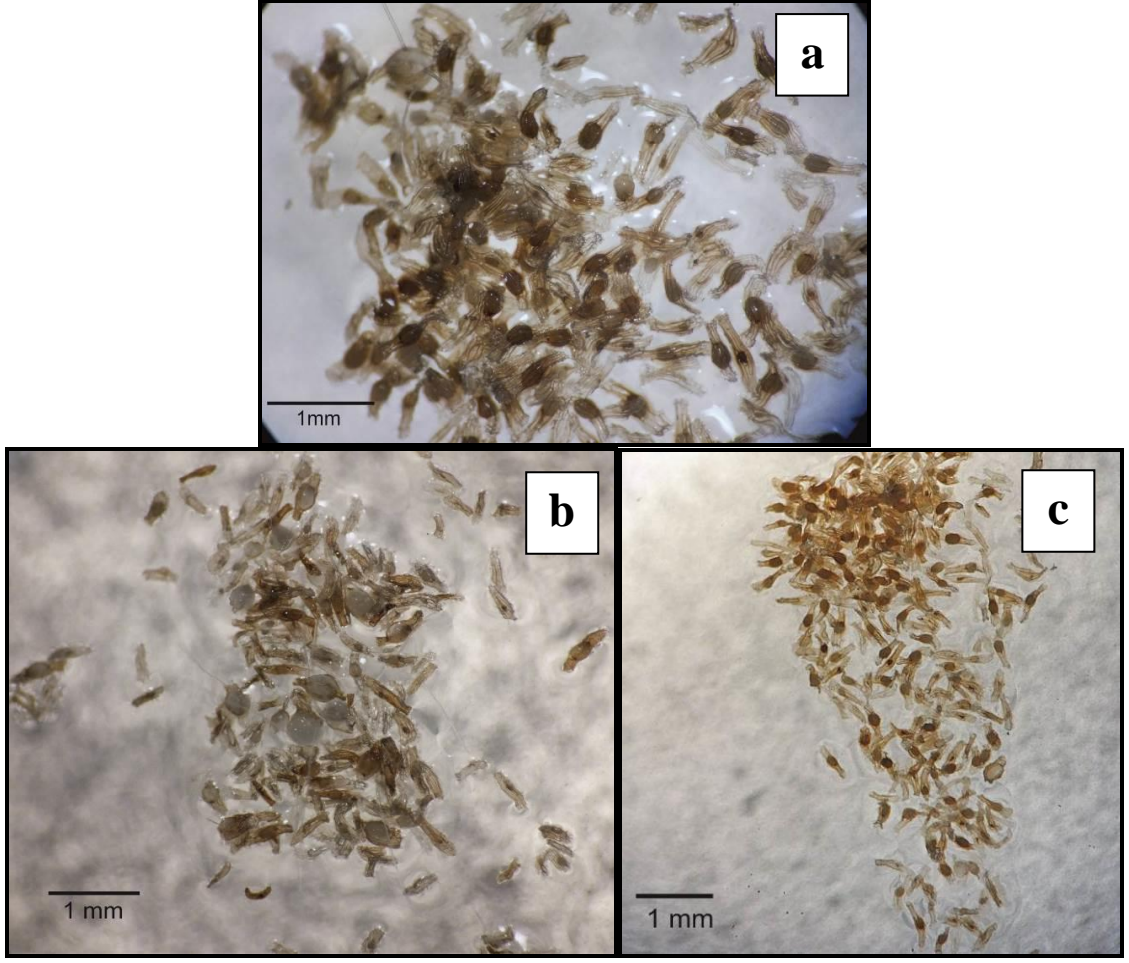
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

Endospermce fakir olan orkide tohumları fungusu gereksinim duymadan *in vitro* koşullarda kendi doğal döngüsü ve sıcaklık koşulları takip edilerek çoğaltma çalışması yapılmıştır. Çalışma istatistik analizlerle desteklenmiştir. Tür ve Besin ortamı arasındaki ilişki, türlerin ve besin ortamlarının çimlenme oranına katkıları ayrı ayrı istatistik olarak incelenmiştir. Çalışma üç başlık altında değerlendirilmiştir; çimlenme oranı, protokorm oranı ve bitki gelişim oranı.

4.1.1. Çimlenme oranı

Anacamptis morio subsp. *morio*, *Dactylorhiza romana*, *Anacamptis pyramidalis* ve *Neotinea tridentata* türlerine ait tohumlar kültüre alındıktan 1 hafta sonra embriyolarının geliştiği ve çimlendiği gözlenmiştir ve 1 ay sonra da incelenerek çimlenme oranları belirlenmiştir (Şekil 4.1). Tür ve Besin ortamı arasındaki ilişki, yapılan istatistik analizlerine göre %5 düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur. Sadece *Anacamptis pyramidalis* türünde KC ve ORC ortamlarında istatistiki olarak fark yoktur ve *Neotinea tridentata* türünde üç besin ortamı karşılaştırmasında istatistiki olarak fark yoktur, türlerin kendi aralarında çimlenme oranına etkisi istatistik analizlerce %5 düzeyinde önemli bulunmuştur ve besin ortamlarının çimlenme oranına katkılarına bakıldığında KC ve ORC ortamlarında istatistiki olarak fark yoktur.



Şekil 4.1. (a) Ekimden sonra 34 günlük *Anacamptis morio* subsp. *morio* türüne ait tohum çimlenmesi (30x büyütme), (b) Ekimden sonra 35 günlük *Dactylorhiza romana* türüne ait tohum çimlenmesi (25x büyütme), (c) Ekimden sonra 14 günlük *Neotinea tridentata* türüne ait tohum çimlenmesi (20x büyütme)

Her bir orkide türüne ait tohumların, üç farklı besin ortamında, besin ortamı farkı gözetmeksizin çimlenme sonuçlarının tamamı değerlendirilerek elde edilen verilerin karşılaştırılması ile türlerin kendi içlerinde çimlenme yetenekleri bulunmuştur (Çizelge 4.1). Orkide türlerinin kendi aralarında çimlenme üzerine etkisi incelendiğinde, %88.91 oranı ile *Anacamptis morio* subsp. *morio* en iyi çimlenen tür olmuştur. Bunu %74.42 oranı ile *Anacamptis pyramidalis* ve %66.30 oranı ile *Dactylorhiza romana* izlemiştir. %55.03 oranı ile *Neotinea tridentata* ise çimlenme oranı en düşük olan tür olmuştur.

Çizelge 4.1. Farklı orkide türlerinin kendi aralarında çimlenme oranı

Tür	Çimlenme Oranı (%)
<i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>morio</i>	88.91 d
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	74.42 a
<i>Dactylorhiza romana</i>	66.30 c
<i>Neotinea tridentata</i>	55.03 b

Türlere bakılmaksızın üç farklı besin ortamında çimlenen orkide tohumlarının tüm sonuçları değerlendirilerek karşılaştırılması ile besin ortamlarının çimlenme oranı üzerine etkileri bulunmuştur (Çizelge 4.2). Besin ortamlarının çimlenme oranı üzerine etkilerine bakıldığında en iyi %79.11 oranı ile SV besin ortamı olmuştur. Bunu %73.46 oranı ile KC besin ortamı izlemiştir. %70.99 oranı ile ORC en düşük çimlenme oranına sahip besin ortamı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı besin ortamlarının kendi aralarında çimlenme oranına etkisi

Besin Ortamı	Çimlenme Oranı (%)
KC	73.46 a
ORC	70.99 a
SV	79.11 b

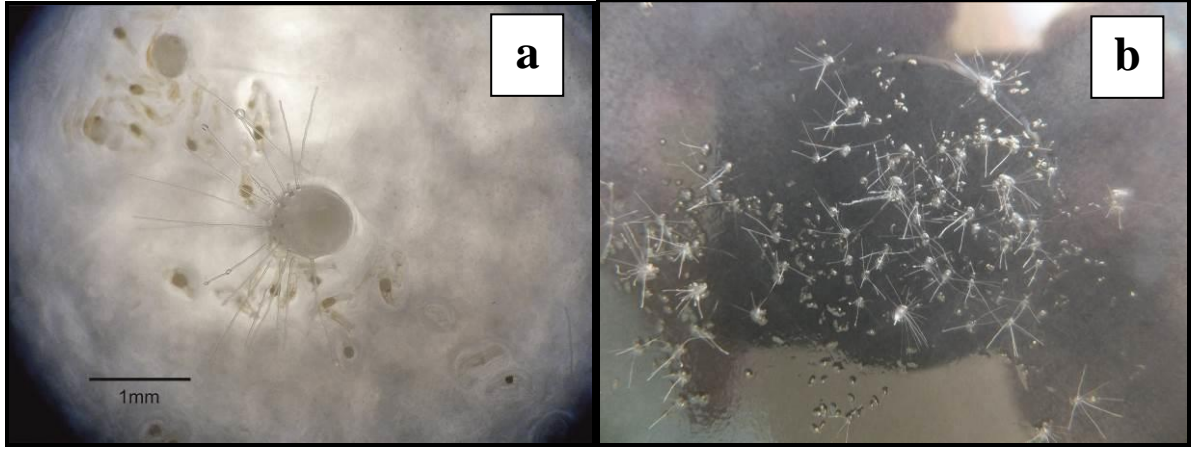
Tür ve Besin ortamı arasındaki ilişki, her bir tür için üç farklı besin ortamında çimlenen orkide tohumlarının ayrı ayrı bu besin ortamlarıyla karşılaştırılması ve sonuçların değerlendirilmesi ile bulunmuştur (Çizelge 4.3). En yüksek çimlenme SV ortamında %94 çimlenme oranı ile *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü olmuştur. Bunu KC ortamında %88.06 oranı ile *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü, ORC ortamında %82.39 oranı ile *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü ve SV ortamında %80.40 oranı ile *Anacamptis pyramidalis* türü takip etmiştir. Diğer türler orta düzeyde bir çimlenme göstermiştir. En düşük çimlenme ise *Neotinea tridentata* türü %54.47 oranı ile KC ortamında olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Tür ve Besin ortamı arasındaki ilişkinin çimlenme oranı üzerine etkisi

Tür	Besin Ortamı	Çimlenme (%)
<i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>morio</i>	KC	88.06 b
	ORC	82.39 a
	SV	94.00 c
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	KC	71.24 a
	ORC	72.23 a
	SV	80.40 b
<i>Dactylorhiza romana</i>	KC	64.95 b
	ORC	56.18 a
	SV	79.10 c
<i>Neotinea tridentata</i>	KC	54.47 a
	ORC	54.66 a
	SV	54.85 a

4.1.2. Protokorm oranı

Anacamptis morio subsp. *morio*, *Dactylorhiza romana*, *Anacamptis pyramidalis* türleri ekimden ortalama bir ay sonra protokorm oluşturmuştur ve 4 ay sonra ise 2 – 3 mm büyüklüğüne ulaşan protokormlar altkültüre alınmadan önce sayılmıştır. *Neotinea tridentata* türü tohumları çimlenmesine rağmen protokorm oluşturamamıştır. Türlerin ve besin ortamlarının protokorm oranı üzerine etkisi istatistik analizler sonucunda %5 düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Tür ve Besin ortamı arasındaki ilişkinin protokorm oranı üzerine etkisi istatistik analizler sonucunda *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü %5 düzeyinde önemli bulunmuştur, *Dactylorhiza romana* ve *Anacamptis pyramidalis* türlerinde KC ve ORC ortamlarında istatistiki olarak fark yoktur. Orkide türlerinin protokormlarının oluşmasının yanı sıra emici tüylerinin de olduğu yapılan incelemeler sonucunda gözlenmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

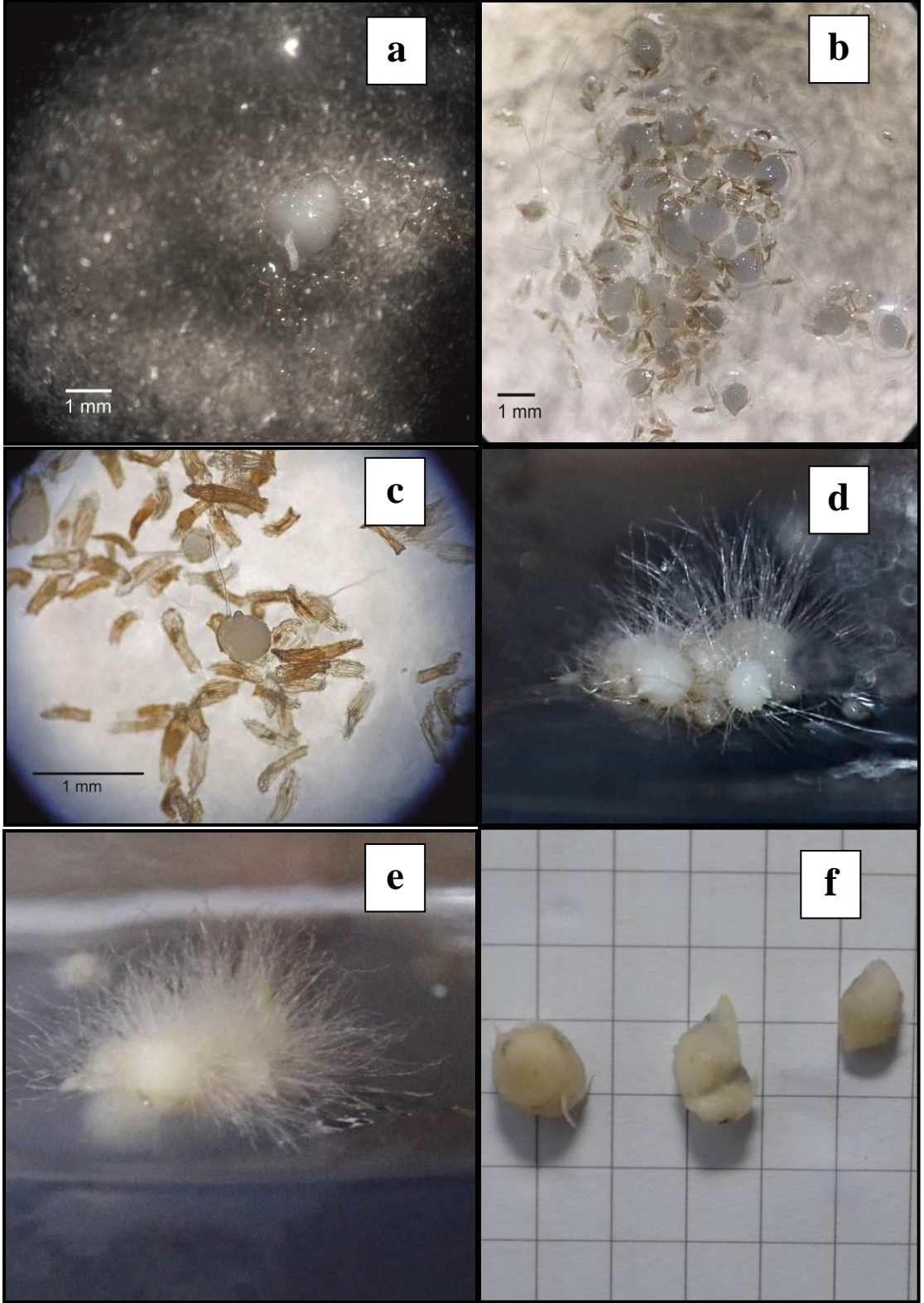


Şekil 4.2. (a) Ekimden sonra 90 günlük *Anacamptis morio* subsp. *morio* türüne ait protokorm gelişimi (30x), (b) Ekimden sonra 90 günlük *Anacamptis morio* subsp. *morio* türüne ait protokorm gelişimi

Türler arasında protokorm oluşum yüzdesi olarak en iyi % 50.80 oranı ile *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü olmuştur. Bunu %24.09 oranı ile *Dactylorhiza romana* türü takip etmektedir. En düşük protokorm oluşumu ise %7.25 oranı ile *Anacamptis pyramidalis* türünde görülmektedir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Farklı orkide türlerinin kendi aralarında protokorm oluşturma oranı

Tür	Protokorm Oranı (%)
<i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>morio</i>	50.80 c
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	7.25 a
<i>Dactylorhiza romana</i>	24.09 b



Şekil 4.3. (a) Ekimden sonra 106 günlük *Dactylorhiza romana* türüne ait protokorm gelişimi (15x), (b) Ekimden sonra 113 günlük *D. romana* türüne ait protokorm gelişimi (20x), (c) Ekimden sonra 35 günlük *D. romana* türüne ait protokorm gelişimi (40x), (d), (e), (f) *D. romana* türüne ait protokorm gelişimi

Besin ortamlarının üç orkide türünün protokorm oluşum kapasitesi açısından bir etkisi olmuştur ve istatistiki olarak bir fark vardır. Protokorm oluşumuna en iyi katkı sağlayan besin ortamı %61.96 oranı ile SV ortamı olmuştur. %40.29 oranı ile KC ortamı SV ortamını takip etmektedir. En az katkı sağlayan besin ortamı ise %14.65 oranı ile ORC besin ortamı olmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Farklı besin ortamlarının kendi aralarında protokorm oluşumu üzerine etkisi

Besin Ortamı	Protokorm Oranı (%)
KC	40.29 b
ORC	14.65 a
SV	61.96 c

Tür ve Besin ortamı arasındaki ilişki bakımından en yüksek protokorm oluşum oranı %70.42 oranı ile SV ortamında *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü olmuştur. Bunu KC ortamı %53.82 oranı ile *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü, %48.71 oranı ile *Dactylorhiza romana* türü SV ortamı takip etmiştir. Diğer türler orta düzeyde bir protokorm oluşumu göstermiştir. En düşük protokorm oluşumu ise *Anacamptis pyramidalis* türü %3.69 oranı ile ORC ortamında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Tür ve Besin ortamı arasındaki ilişkinin protokorm oranı üzerine etkisi

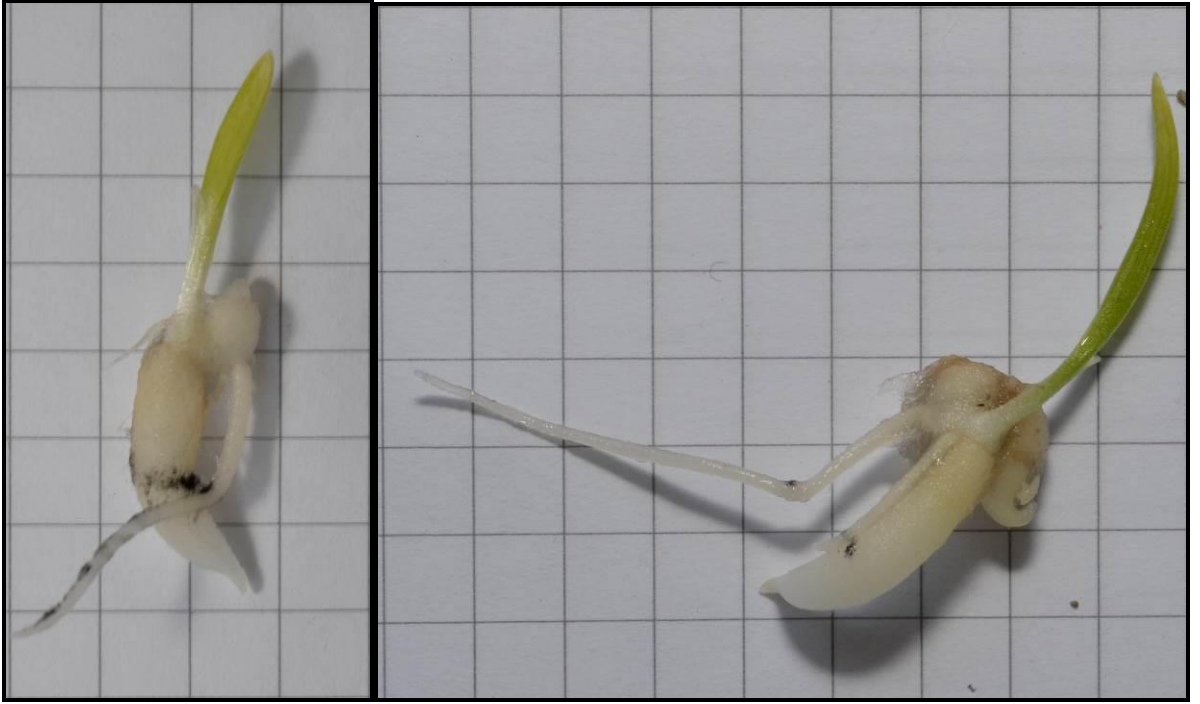
Tür	Besin Ortamı	Protokorm Oranı (%)
<i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>morio</i>	KC	53.82 b
	ORC	16.09 a
	SV	70.42 c
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	KC	4.98 a
	ORC	3.69 a
	SV	12.90 b
<i>Dactylorhiza romana</i>	KC	13.94 a
	ORC	19.12 a
	SV	48.71 b

4.1.3. Bitki gelişim oranı

Çimlenme çalışmasında dört farklı tür kullanılmıştır ve bunların hepsinde çimlenme meydana gelmiştir. Protokorm oluşumu, çimlenen türler arasından sadece üçünde meydana gelmiştir. Bitki gelişimi ise protokorm oluşturan bu üç türün hepsinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4 – Şekil 4.8).



Şekil 4.4. Ekimden sonra yaklaşık bir senelik *Anacamptis morio* subsp. *morio* bitkicikleri



Şekil 4.5. Ekimden sonra yaklaşık bir senelik *Dactylorhiza romana* bitkicikleri



Şekil 4.6. Ekimden sonra yaklaşık bir senelik *Dactylorhiza romana* bitkicikleri



Şekil 4.7. Ekimden sonra yaklaşık bir senelik *Dactylorhiza romana* bitkicikleri



Şekil 4.8. Ekimden sonra yaklaşık bir senelik *Anacamptis pyramidalis* bitkiciği

Bitki gelişim oranlarına bakıldığında *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü %55.87 oranı ile SV ortamında en yüksek bitki gelişim oranına sahiptir. Bunu %47.17 oranı ile SV ortamında *Dactylorhiza romana* takip etmektedir. En düşük bitki gelişimi %15.79 oranı ile *Anacamptis pyramidalis* türü ORC ortamı olmuştur. KC ortamında protokorm oluşmasına rağmen, bitki gelişimi meydana gelmemiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Türlerin bitki gelişim oranları

Tür	Besin Ortamı	Bitki Gelişimi (%)
<i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>morio</i>	ORC	30.24
	SV	55.87
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	ORC	15.79
	SV	27.78
<i>Dactylorhiza romana</i>	ORC	19.23
	SV	47.17

4.2. Tartışma

Orkide tohumları çok küçüktürler ve endosperm bakımından fakirdirler. Rasmussen (1995)'e göre, uygun koşulların sağlandığı orkide tohumlarının çimlenebilmesi için ortamda suyun olması yeterlidir. Fakat orkidelerin çoğu yaşamlarının bir bölümünde heterotroftir ve çimlenebilmeleri için bazı endofitlerle veya mantarlarla ilişkili olmak zorundadır. Sezik (1984)'e göre fungus genç orkide bitkisine nişasta ve benzeri bileşimleri suda çözünen şekerler haline çevirip gönderir. Knudson (1929 ve 1946)'a göre, fungus olmadan mineral ve sakkaroz içeren basit bir besin ortamında çimlenmenin *in vitro* koşullarda orkidelerin üretilmesini mümkün kılmıştır.

Orkidelerin doğada çimlenip ergin bir birey meydana gelene kadar 2-16 yıl geçmektedir. Fakat biz çalışmamızda bu süreci bir yıla kadar düşürdük ve bir yılın sonunda doğaya kazandırılacak kadar büyüklükte olan orkide bireylerini elde ettik.

Orkidelerde *in vitro* tohum çimlendirmesinde sterilizasyon süresinin özellikle tohumu sert kabuklu türlerde iyi ayarlanması gerekmektedir. Van Waes ve Debergh (1986); çimlenmede tohum kabuğunun engelleyici bir etkisinin bulunduğunu ve sterilizasyonda kullanılan kalsiyum hipoklorit+Tween-80 karışımının ne kadar süreyle uygulandığının, çimlenme üzerinde etkisinin bulunduğunu araştırmaları tarafından belirlemiştir. Sert kabuklu türlerde sterilizasyon süresinin uzun tutulması gerektiğini, tohum kabuğunu

aşındırarak çimlenmeyi olumlu yönde etkileyebileceğini yine çalışmasında belirtmiştir. Vejsadova ve Mala (1996); yapmış oldukları çalışmada %10'luk sodyum hipoklorit veya %7'lik kalsiyum hipoklorit + %70 etil alkol çözeltisinin, olgunlaşmamış ve tam olgun tohumlarda çimlenme üzerine olumlu bir etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Vejsadova (2006); orkide tohumlarının çimlenme oranlarını arttırmak için sterilizasyonda kullandıkları maddenin dozu ve süresiyle ilgili bir çalışma yapmıştır. Sodyum veya kalsiyum hipokloritin farklı dozlarını ve farklı sürelerini kullanmıştır. Tohum yüzeyini kahverengiden fildişi beyazına kadar döndüren %7.2'lik kalsiyum hipoklorit, çimlenme oranını artırdığını bulmuştur. Yararbaş (2008)'de yapmış olduğu çalışmada %1'lik sodyum hipokloritte 10 dakika sterilize edilen tohumlarda enfeksiyon riskini ortadan kaldırdığını ve 2 ay gibi kısa bir sürede orkidelerin ilk yapraklarının çıktığını bulmuştur. Biz de çalışmamızda en iyi sterilizasyon dozu ve süresinin %5 – 10'luk NaClO'de 6 – 10 dakika olduğunu yaptığımız denemeler sonucunda belirledik.

Orkide tohumunun çimlenmesi için topraktaki nem, sıcaklık, mikorizal fungus, su ve diğer edafik faktörler yeterlidir. Sonbahar yağışları ile tohum, çimlenme için gerekli olan neme sahip olur ve dormansi durumundan çıkar. Bu sezon farklı iklim bölgelerinde, farklı aylara denk gelmektedir. Akdeniz Bölgesi için çalışılan türlerin tohumlanma zamanı Temmuz ayıdır. Çalışılan türler için uygun çimlenme zamanı Akdeniz Bölgesinde Eylül – Ekim gibiyken, Avrupa orkideleri için Ağustos – Eylül arasındadır. Akdeniz Bölgesi'ndeki orkidelerin Kasım – Aralık gibi protokormu oluşur ve Nisan ayı gibi de ilk yaprakları çıkar (Delforge, 2006). Çalışılan örneklerin yıllık döngüsü Çanakkale için takip edilmiş olup, sağladığımız *in vitro* koşulların bu iklimsel şartlara paralellik göstermesi sağlanmıştır. Önal (1999); çalışmasında *Orchis sancta* ve *Orchis laxiflora* türleri için 5°C'de ve karanlık koşullarda yumru oluşturma oranı, normal koşullardan (25°C, 16s ışık) daha yüksek olduğunu bulmuştur. Biz de çalışmamızda 2 – 3 mm büyüklüğe ulaşan protokormları alt kültürleme yaptıktan sonra 5 – 10°C sıcakta tutarak kış mevsimi şartlarını sağladık. Yaptığımız denemelerde tohum ekiminden sonra 25°C sıcaklıkta çimlenmenin meydana gelmediğini gözlemledik ve çimlenme işleminin 18±1-23±1°C sıcaklıkta meydana geldiğini tespit ettik. Szendrak ve Read (2000)'in çalışmalarında; kültürler tohum ekiminden sonra 10 – 12°C ve karanlık koşullara 4 hafta süreyle bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda çimlenme gerçekleşene kadar sıcaklık 25 – 26°C'ye ayarlanmıştır. Bundan sonra kültürler mevsimsel sıcaklık değerlerine göre düzenlenmiştir: Nisan başından Eylül sonuna kadar 25 – 26 °C, Ekim ayından Mart'a kadar 17 – 19 °C'ye ayarlanmıştır. ABD'de gerçekleştirilen bu çalışmadaki iklim şartları ülkemiz ile paralellik göstermemektedir.

Daha önceki *in vitro* orkide tohumu çimlendirme çalışmalarında, neredeyse çalışılan bütün türlerin embriyoları şişerek, ilk ekimden daha şişkin ve daha belirgin bir hale geldiği görülmüştür. Fakat protokorm oluşumu ve bitki elde etme aşamaları türden türe farklılık göstermiştir. Hatipoğlu ve ark. (1984)'nın yapmış oldukları çalışmada *Anacamptis pyramidalis* ve *Orchis sancta* türlerinin fideleri dış ortama nakillerine kadar geçen süreçte başarı sağlanmış olduğu belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında *Anacamptis pyramidalis* türünün çimlendirilmesinde, protokorm oluşumunda, bitki gelişiminde ve dış ortama aktarımında başarı sağlanmıştır. Özavcı (1995), 6 farklı orkide türünü 22 farklı ortamda embriyo kültürü ile yumru oluşturma yeteneklerini araştırmıştır ve sadece 2 türde yumru oluşumu gözlemiştir. Çağlayan ve ark. (1998), nesli tükenmekte olan 6 farklı orkide türünün embriyolarını *in vitro* ortamda 14 farklı besi yerinde kültüre almıştır. En yüksek ortalama çimlenme ve protokormdan bitki oluşum oranları %2.39 ve %1.86, en yüksek yumru oluşum oranı ise %2.45 olduğunu belirtmiştir. Bu tez çalışmasında 4 farklı tür ile çalışılmıştır ve 3 türde yumru oluşumu gözlenmiştir. En yüksek çimlenme oranı %88.91, en yüksek protokorm oranı %50.80 ve en yüksek bitki oluşum oranı ise %55.87 olduğu bulunmuştur. Oranların diğer yapılan çalışmalara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Gönülşen ve ark. (1996), tarafından iki farklı bölgeden toplanan örneklerde sürgün ucu ve embriyo kültürü yapılmıştır ve çok az türde başarı sağlanmıştır. Kullandıkları türler arasında *Dactylorhiza romana*, *Anacamptis pyramidalis* ve *Neotinea tridentata* türleri bu çalışmada da kullanılmıştır. Bu üç tür başarılı bir şekilde çimlendirilmiştir, fakat *Neotinea tridentata* türünde protokorm oluşumu ve böylelikle bitki gelişimi elde edilememiştir. Önal (1999) tarafından yapılan bir araştırmada, *Aceras*, *Anacamptis*, *Ophrys*, *Orchis*, *Serapias*, *Dactylorhiza*, cinsine ait toplam 21 orkide türü Ege Bölgesi'nden toplanmıştır. Çalışmada besi yeri olarak Knudson C'un değişik formları kullanılmıştır ve farklı türlerde farklı formlarında başarı elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında da Knudson C kullanılmıştır ve çimlenme, protokorm oluşumunda orta düzey bir başarı elde edilirken, bitki gelişiminde Knudson C besi yerinde başarı elde edilememiştir. Pindel ve Pindel (2004)'in yapmış oldukları çalışmada da Knudson C besi ortamının başarı yüzdesi bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Kitsaki ve ark. (2004) Yunanistan için endemik olan 13 değişik orkide türünde *in vitro* koşullarda tohum çimlenmesi, protokorm ve bitkicik oluşumu üzerine etki eden faktörler üzerinde araştırma yapmışlardır. Hindistancevizi sütü veya ananas suyu ile zenginleştirilmiş besin ortamları kullanmışlardır. En yüksek çimlenme ve protokorm oluşumunun hindistancevizi sütü eklenen besin ortamlarında olduğunu belirtmiştir. Transfer edilen protokormların hemen hepsi bitkiciğe dönüşmüş ve mini yumrular oluşturmuştur, ananas suyu eklenen besin ortamlarında gelişen bitkicikler de mini yumru oluşturmuştur. Bu

tez çalışmasında 3 farklı besin ortamı kullanılmıştır; ORC, KC ve SV. Ananas suyu eklenen SV ortamının çimlenme, protokorm ve bitki gelişim yüzdesi ORC ve KC ortamlarına göre daha yüksektir. Valletta ve ark. (2008) Orchimax (ORC) ticari besin ortamında bazı modifikasyonlar yapmıştır, bunların arasında BA (Benzilamino) ilave edilen ve aktif karbon bulunduran bileşimde çimlenme elde edebilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan ORC çimlenmeye ve protokorm oluşumuna düşük seviyelerde etki etmiştir, bitki gelişimine orta düzeyde bir etkisi olmuştur. Gümüş (2009) Batı Karadeniz bölgesinde nesli tehlike altında olan 16 tür ile çalışmıştır. Bu türlerden *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza romana*, *Anacamptis morio* subsp. *morio* ve *Neotinea tridentata* türleri bu tez çalışmasında kullanılan türlerdir. Çalışmada farklı besin ortamı bileşimleri (MS, 1/2 MS, KC-N, KC, VW & DB,) kullanmıştır. En yüksek bitki oluşum oranı *Anacamptis morio* subsp. *morio* % 89.88 KC ortamında olduğunu bulmuştur. Bu tez çalışmasında da en yüksek bitki oluşum oranı *Anacamptis morio* subsp. *morio* %55.87 SV besin ortamı olmuştur.

Yapılan çalışmalarda başarılı bir şekilde bitki elde edilse de, dış koşullara aktarıldıktan sonra bitki kayıpları yaşanmıştır. Çalışmaların genelinde toprak olarak perlit, torf ve vermikulit kullanılmıştır ve dış ortama aktarmada doğal döngü takip edilmemiştir, normal doku kültürü şartları uygulanmıştır. Gümüş (2009), Çağlayan ve ark. (1998) ve Hatipoğlu ve ark. (1994) dış ortama alıştırmada başarı sağlayamamışlardır. Araştırmamızda, toprak olarak orkidelerin doğal yetiştikleri alanlardaki toprak kullanılmıştır ve içine %25'er kuartz kum ve ağaç kabuğu eklenmiştir. İsveçli amatör orkide yetiştiricisi Svante Malmgren (2013)'in internet sitesinde, genç bitkiler dormansi durumunda olduğu zaman, dış ortama aktarmanın en doğru zaman olduğunu belirtmiştir. Ayrıca dormansi doğada meydana geldiğinde türlerin doğal yıllık zamanının takip edilmesinin çok pratik bir yararının olduğunu belirtmiştir. Bu tez çalışması için özel yazışmalarımızda da bunları belirtmiştir. Bunlara ek olarak *in vitro* doku kültüründe doğal döngünün ve sıcaklığın öneminden, orkidelerin doğal yetiştikleri ortamdaki toprağının kullanılmasından ve ayrıca ilk dış ortama aktarılan bitkiciklerin yapraklarının kuruyup bir sonraki yaprak çıkarma zamanına kadar yumruların toprak altında dormansi durumunda olduğunu ve dormansi durumu bittiğinde tekrar yapraklarının çıkacağından bahsetmiştir. Kendisi neredeyse bütün türlerin çoğaltılması ve dış ortama aktarılmasında çok büyük oranda başarı sağlamıştır. Bu tez çalışmasında dış ortama aktarılan bitkicikler şu anda dormansi durumundadır ve bir sonraki yaprak çıkarma zamanı olan Şubat – Mart ayında yaprakları tekrar çıkacaktır.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüksek Lisans Tezimizde kullanılan dört salep orkidesi türlerinde de *in vitro* çimlenme başarılı bir şekilde yapılmıştır, fakat çimlenme oranları türler arasında farklılık göstermiştir. Besin ortamlarından KC ve ORC arasında istatistiki olarak fark bulunmamıştır. Tür ve Besin ortamı arasındaki ilişkide *Anacamptis morio* subsp. *morio* ve *Dactylorhiza romana* arasında istatistiki olarak fark vardır. *Anacamptis pyramidalis* türünde KC ve ORC arasında istatistiki olarak fark yoktur. *Neotinea tridentata* türünde besin ortamları arasında istatistiki olarak fark yoktur. Protokorm oluşumu sadece *Neotinea tridentata* türünde gözlenmemiştir. Diğer üç türde protokorm oluşumu, bitki gelişimi türden türe ve besin ortamına göre farklılık göstermektedir. Protokormda tür+besin ortamı ilişkisinde *Anacamptis morio* subsp. *morio* farklılık göstermektedir. *Anacamptis pyramidalis* ve *Dactylorhiza romana* türleri KC ve ORC ortamlarında istatistiki olarak farklılık göstermemiştir.

Çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişiminde *in vitro* olarak en iyi uyum sağlayan tür *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü olarak belirlenmiştir. Araştırmamızda kullandığımız dört tür arasından *Anacamptis morio* subsp. *morio* türü üzerinde daha detaylı çalışılarak ticari olarak üretilebilecek tür olarak saptanmıştır. Diğer bir tür ise *Dactylorhiza romana* türüdür. Bu tür de ticari olarak üretmek için ümitvar sonuçlar vermiştir. Araştırmamızda çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişiminde kullanılan üç farklı besin ortamından en iyi sonuç veren SV ortamıdır. SV ortamının en iyi ortam olma özelliği, orkidelerin topraktan almış olduğu besin maddelerini içeren bir besin ortamı niteliğinde olması ve ananas suyu ilavesinin de başarı oranını arttırdığı saptanmıştır.

Besin ortamına organik substratların ilave edilmesi yoluna da gidilmelidir. Önal (1999), Çağlayan ve ark., (1998) domates ve hindistan cevizi sütü ilavesi yapmıştır. Van Waes ve Debergh (1986) muz, patates ekstraktı, hindistan cevizi sütü, pepton gibi maddelerin ilave edildiği besin ortamlarını önermektedir. Kitsaki ve ark., (2004) hindistan cevizi sütü ve ananas suyunun besin ortamlarına ilavesini tavsiye etmektedir.

Elde edilen yumruların dış ortama aktarılmasında (aklimatizasyon) başarı oranının daha da artırılabilmesi açısından, substratın yapısının önemli olduğu ve orkidelerin doğal yetiştikleri ortamdaki toprağın kullanılması gerektiği ve ayrıca içine toprağın su tutma kapasitesini arttırıcı maddelerin ilave edilmesi gerektiği göz ardı edilmemelidir. Orkideler ile ilgili olarak daha sonra yapılacak olan bu tür bilimsel araştırmalarda hem *in vitro*

alternatif besin ortamlarının geliştirilebilmesi hem de dış ortama alıştırmada daha farklı yöntemlerin denenebilmesi açısından tamamlanan Yüksek Lisans tezimizin öncülük edeceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

- Ar E., 2000. Orkideler ve Türkiye'deki Mevcut Durumu. *Derim*. 17 (3): 136-152.
- Arditti J., 1967. Factors Afecting of Orchid Seeds. *Bot. Rev.*, 33, 1-97.
- Arditti J., 1979. *Aspect of the Physiology of Orchids*. Academic Press, Londra. 421-665.
- Arditti J., 1979. *Aspects of the Physiology of Orchids*. I: H.W. Woolhouse (Editor), Advances in Botanical Research,7. Academic Press, New York, 422-697.
- Arditti J., Ernst, R., 1984. Pyhisiology of Germinating Orchid Seeds, *Bot.Rev.*, 33:1-197.
- Arditti J., 2008. *Micropropagation of Orchids*. Blackwell publishing, Australia. 1523p.
- Aybeke M., 2002. Orkidelerde Granuler Polenler ve Poliniumlar Üzerinde *In Vitro* Çimlenme Deneyleri. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 15: 71-80.
- Aytaş T., 1994. Bazı *Ophrys* L. (Orchidaceae) Türlerinden Simbiyotik Fungusların İzolasyonu ve *Ophrys apifera* Hudson Tohumlarının Asimbiyotik ve Simbiyotik Ortamlarda Çimlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Beyrle H.F., Smith S.E., 1993. Excessive Carbon Prevents Greening of Leaves in Mycorrhizal Seedlings of the Terrestrial Orchid *Orchis morio*. *Lindleyana*. 8(2): 97-99.
- Beyrle H.F., Smith S.E., Peterson R.L., Franco C.M.M., 1995. Colonization of *Orchis morio* Protocorms by a Mycorrhizal Fungus: Effects of Nitrogen Nutrition and Glyphosate in Modifying the Responses. *Canadian Journal of Botany*. 73(8): 1128–1140.
- Bhaskar J., Rajeevan P.K., 1996. Embryo Culture of Vanda 'John. Club'. *South Indian Horticulture*. 44(1-2): 36-38.
- Bulpitt C. J., 2005. The Uses And Misuses of Orchids in Medicine. Occasional Paper. *Q. J. Med.*, 98:625–631.
- Çağlayan K., Özavcı A., Eskalen A., 1997. Kahramanmaraş Yöresinde Doğal Yayılış Gösteren Salep Orkidelerinin *In Vitro*'da Sürgün Ucu Kültürü ile Çoğaltılabilme Olanakları Üzerinde Araştırmalar. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2: 11-24.
- Çağlayan K., Özavcı A., Eskalen A., 1998. Doğu Akdeniz Bölgesinde Yaygın Olarak Yetişen Bazı Salep Orkidelerinin Embriyo Kültürü Kullanılarak *In Vitro* Koşullarda Çoğaltılmaları. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22: 187-191.
- Çığ A., 2012. Van'da Doğal Olarak Yetişen Salep Orkidelerinin Simbiyotik ve Asimbiyotik Olarak *In Vitro* ve *In Vivo* Ortamlarda Çoğaltılması. Doktora Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.

- Das A., Ghoshall K.K., 1989. *In vitro* Germination Behaviour of Some Orchids Seeds Developed in Plains of West Bengal. *Indian Agriculturist*. 33(2): 103-109.
- Davis P. H., 1984. *Flora of Turkey*. Universty of Press, Edinburg. 8: 450-551.
- Delforge P., 2006. *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East*. Timber Press, Inc., USA. 7-8.
- Devi J., Nath M., Devi M., Deka P.C., 1990. Effect of Different Media on Germination and Growth of Some North East Indian sp. of. *Dendrobium*. *Journal of The Orchid Society of India*.4: 1-2; 45-49; 10ref.
- Ekim T., 1989. *Türkiye'nin Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitkileri*, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayınları, Ankara. 18:227.
- Ekim T., Koyuncu M., Vural M., Duman H., Aytaç Z., Adıgüzel N., 2000. *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı*, Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayınları, Ankara. 246.
- Gezgin Y., 2004. Çeşitli Salep (Orkide) Türlerinde Mikoriza Oluşturan Fungusların İzolasyonu ve Tanımlanması ile İnokulant Olarak Kullanım Olanaklarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Gönülşen N., Yıldızgördü K., Önal K., Şekeroğlu E., Ercan N., Biçici M., Eskalen A., 1996. Ege ve Doğu Akdeniz Bölgelerinde Doğal Yayılış Gösteren *Orchidaceae* Familyasına Ait Bazı Türlerin *In Vitro* ve *In Vivo* Koşullarda Üretimleri Üzerinde Araştırmalar. Proje No: TBGAG-52, İzmir.
- Gümüş C., 2009. Batı Karadeniz Bölgesi'nde Salep Elde Edilmesinde Kullanılan Bazı Orkide Türlerinin (*Orchidaceae*) Çoğaltım Yöntemleri Üzerinde Araştırmalar (Doktora Tezi). Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Harrap A., Harrap S., 2009. *Orchids of Britain and Ireland* (2nd ed.). A&C Black Publ. Ltd., London. 7.
- Hatipoğlu A., Ringe F. ve Korkut A., 1984. Toprak Orkidelerinin Doğal Yetiştirme Alanlarında Bir Vejetasyon Süreci İçerisindeki Biyolojik Ritminin Gözlenmesi Ve Toprak Orkidelerinin Üretimi. Ege Üniversitesi, İzmir ve Justus Liebig Üniversitesi Giessen İşbirliği Haftası ve Sempozyumu.
- Jong S., Sin S., 1985. Effect of NAA and BA on Dark Culture of *Cymbidium Virescens* Rhizom *In vitro*, 11.
- Karagüzel O., Ortaçşme V., Özkan V., 1999. Türkiye Ölçeğinde Bitki Genetik Kaynaklarının Muhafaza Yöntemlerine Swot Analiz Tekniği İle Bir Yaklaşım. International Symposium on Protection of Natural Environment and Ehrami Karaçam. Kütahya. 518-527.

- Kısakürek Ş., Arpacı B.B., Özdemir A., Dalfesoğlu K., Ergun N. ve Kaya Y., 2009. Kahramanmaraş Doğal Florasında Yetişen ve Salep Üretiminde Kullanılan Bitkilerin Kültüre Alınabilme Olanakları. 12 s.
- Kitsaki C.K., Zygouraki S., Ziobora M., Kintzios S., 2004. *In Vitro* Germination, Protocorm Formation and Plantlet Development of Mature versus Immature Seeds from Several Ophrys species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*. 23 (5): 284-290.
- Knudson L., 1929. Physiological Investigations on Orchid Germination. *Proc. Congr. Plant Sci.* 2:1183-1189.
- Knudson L., 1946. A New Nutrient Solution for Germination of Orchid Seed. *Am. Orchid. Soc. Bull.* 15:214-217.
- Kreutz K., 2000. Orchidaceae. In: Davis, P.H. et al., Eds. *The Flora of Turkey and The East Aegean Islands* (Vol. 11). University Press, Edinburgh, 275-305.
- Kreutz K. (C.A.J.), 2009. *Türkiye Orkideleri*. Rota Yayınları, İstanbul. 848 s.
- Lauzer D., St-Arnaud M., Barabe D., 1994. Tetrazolium Staining and in vitro Germination of Mature Seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*. 9(3): 197-204.
- Magrini S., Carli De A., Onofri S., Scoppola A., 2011. A Comparative Study of the Seed Germination Capabilities of *Anacamptis palustris* (Orchidaceae), A Threatened Terrestrial Orchid, and Other More Common *Anacamptis* species, by a Symbiotic Culture *In Vitro*. *European Journal of Environmental Sciences*, 1(2): 71-79.
- Malemnganba H., Bhattacharya S., Deka P.C., 1994. A New Cost Effective Embryo Culture Medium For Orchids. *Journal of the Orchid Society of India*. 8 (1/2): 67-71.
- Malmgren S., (5 Şubat 2013). About Orchids. 26 Mayıs 2015, <http://www.lidaforsgarden.com/orchids/>.
- Miyoshi K., Mii M., 1998. Stimulatory Effects of Sodium and Calciumhypochlorite, Prechilling and Cytokinins on the Germination of *Cypripedium macranthos* Seed in vitro. *Physiologia Plantarum* 102: 481-486.
- Olivia A.P., Arditti B., 1984. Seed Germination of North American Orchids. II. Native California and Related Species of *Aplectrum*, *Cypripedium* and *Spiranthes*. *Bot. Gaz.* 145(4):495-591.
- Önal K., 1999. Ege Bölgesi'nde Doğal Yayılış Gösteren *Orchidaceae* Familyasına Ait Bazı Türlerin *In Vitro* Koşullarda Üretimleri Üzerinde Araştırmalar. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23: 1057-1064.

- Özavcı A., 1995. Kahramanmaraş Bölgesinde Doğal Yayılış Gösteren Bazı Salep Orkidelerinin *In Vitro*'da Yumru Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Özkoç İ., Dalcı M., 1991. Bazı Orkide Türlerine Ait Tohumların Çimlenmesi Üzerine Yüzeysel Sterilizasyonda Kullanılan Sodyum Hipokloritin Etkisi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3: 116-122.
- Özkoç İ., 1991. *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Briq. subsp. *laxiflora* (Soo) Gözl et. Reinhard ve *Orchis laxiflora* Lam. (Orchidaceae) Tohumlarının Simbiyotik ve Asimbiyotik Kültürlerde Çimlenme ve Gelişmesi Üzerinde Araştırılması. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Özkoç İ., Dalcı M., 1992. İki Farklı Kültür Ortamında *Serapias vomeraceae* (Orchidaceae) Tohumlarının Çimlenme ve Gelişme Üzerine Bazı Fungusların Etkisi. *Turkish Journal of Biology*, 16: 158-164.
- Özkoç I., Dalcı M., 1993. *Orchis laxiflora* Tohumlarının İki Farklı Ortamda Çimlenmesi ve Gelişmesi Üzerine Bazı Fungusların Etkisi. *Doğa Türk Biyoloji Dergisi*. 17(1): 23-28.
- Pedroza M. J. ve Mican G.Y., 2006. Asymbiotic Germination of *Odontoglossum gloriosum* RCHB.F (Orchidaceae) under *in vitro* Conditions. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 42(6): 543-547.
- Pierik, R.L.M., 1997. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Springer Science & Business Media, 36p.
- Pindel A., Pindel Z., 2004. Intiation of *In Vitro* Cultures of Chosen Endangered European Species of Orchids. *Folia Horticulturae*. 16 (2): 111-117.
- Rasmussen H., Anderson T.F., Johansen B., 1990. Temperature Sensitivity of *In vitro* Germination and Seedling Development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) With and Without a Mycorrhizal Fungus. 13 (2): 171-177.
- Rasmussen H.N., Johansen B., Andersen T.F., 1991. Symbiotic *In Vitro* Culture of Immature Embryos and Seeds From *Listera ovata*. *Lindleyana*. 6(3): 134-139.
- Rasmussen H. N., 1995. *Terrestrial Orchids From Seeds To Mycotrophic Plant*. Cambridge University Press, Cambridge. 39 p.
- Renz J., Taubenheim G., 1984. Orchidaceae. in: Davis, P.H. et al., Eds. *The Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburg University Press, Edinburg. 8: 450-552.

- Sazak A., 2004. Bazı Orkide Türlerine Ait Tohumların Simbiyotik ve Asimbiyotik Olarak Çimlendirilmesi ve Fide Gelişimi. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Sezik E., 1984. *Orkidelerimiz Türkiye'nin Orkideleri*. Sandoz Kültür Yayınları, İstanbul. 6:166.
- Sezik E., 2002. Turkish Orchids and Salep. *Acta Pharmaceutica Turcica*. 44: 151-157.
- Sezik E., İşler S., Orhan Ç., Deniz G. İ., Güler N., Aybeke M., Üstün O., 2007. Salep ve Orkidelerin Tahribi. TÜBİTAK Araştırma Projesi. Proje No: TBAG-Ç.SEK/23(103T008). Ankara.
- Sharma S.K., Tandon P., 1990. Asymbiotic Germination and Seedling Growth of *Cymbidium elegans* Lindl. and *Coelogyne punctulata* Lindl. as Influenced by Different Carbon Sources. *Journal of The Orchid Society of India*. 4: 1-2, 149-159; 23ref.
- Stewart L.S., Kane M.E., 2006. Asymbiotic Seed Germination and in vitro Seedling Development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 86(2):147-158.
- Singh F., Prakash F., 1985. Suspension Culture Technique for the Culture of Orchid Embryos. *Gartenbauwissenschaft*. 50 (5): 236-238.
- Sushmita Bhattacharjee., Khan H.A., Reddy P.V., Bhattacharjee S. 1999. In Vitro Germination of Phalaenopsis Hybrid Seed. *Seed Research* 27(1): 11-15.
- Szendrak E., Read P.E., 2000. *In Vitro* Propagation and Anatomical Studies of Temperate Orchid Species (Orchidaceae). *Acta Horticulturae*. 75-81.
- Tay L.j., Takeno K., Hori Y., 1988. Culture Conditions Suitable for *in vitro* Seed Germination and Development of Seedlings in *Paphiopedilum*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 57(2): 243-249.
- Vakkasoğlu F., 1995. Orkidelerde Mikorizal Fungusların Orkide Tohumlarının Çimlenmesi ve Büyümleri Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Valletta, A., Attorre, F., Bruno, F., Pasqua, G. 2008. *In vitro* Asymbiotic Germination of *Orchis mascula* L. *Plant Biosystems- An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 142(3):653-655.
- Van Waes J.M., Debergh P.C., 1986. *In Vitro* Germination of Some Western European Orchids. *Physiologia Plantarum*. 67(2):253-261.
- Van Waes J.M., 1987. Effect of Activated Charcoal on *In Vitro* Propagation of Western European Orchids. *Acta Hort*. 212(1):131-138.

- Vejsadova H., Mala M., 1996. Seed Germination of Some Endangered Terrestrial Orchids Under Aseptic Conditions. *Acta Pruhoniana*. 63: 77-84.
- Vejsadova H., 2006. Factors Affecting Seed Germination and Seedling Growth of Terrestrial Orchids Cultured *In Vitro*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 48(1):109-113.
- Yararbaş R.T., 2008. Bazı Orkide Türlerinin *In Vitro* Koşullarda oğaltılması, çiçeklenmesi. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Yasemin KEMEÇ

Doğum Yeri : Bakırköy

Doğum Tarihi : 31/10/1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Hürkan K., Güler N., Kemeç Y., Demir C., 2013. Çanakkale'de Yayılış Gösteren *Neotinea tridentata* (Scopoli) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase (Orchidaceae) Türünün Ekolojik Özellikleri. XI. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Samsun. 233.

Bozyel M. E., Gönüz A., Merdamert E., Kemeç. Y., 2013. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Terzioğlu Yerleşkesi İçinde Taşıt Egzoz Kirliliğinin Kızılcıam (*Pinus brutia* Ten., Pinaceae) Yaprağı Anatomik Yapısı Üzerine Bazı Etkileri. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ekoloji Sempozyumu, Tekirdağ. 132.

Kemeç Y., Hürkan K., Akı C., 2015. *In Vitro* Pollen Cluster and Pollinium Germination Attempts on Some Salep Orchids. International Conference on Temperate Orchids Research & Conservation, Yunanistan. 1 (1) 83.

İŞ DENEYİMİ

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

07.2010 - 08.2010 (Staj).

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

07.2009 - 09.2009 (Staj).

İLETİŞİM

E-posta Adresi : ykemec@hotmail.com