

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BATI KARADENİZ BÖLGESİ'NDE SALEP ELDE EDİLMESİNDE
KULLANILAN BAZI ORKİDE TÜRLERİNİN (*ORCHIDACEAE*) ÇOĞALTIM
YÖNTEMLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

Cevdet GÜMÜŞ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2009**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

BATI KARADENİZ BÖLGESİ'NDE SALEP ELDE EDİLMESİNDE KULLANILAN BAZI ORKİDE
TÜRLERİNİN (*ORCHIDACEAE*) ÇOĞALTIM YÖNTEMLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Cevdet GÜMÜŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU
Eş Danışman: Prof. Dr. Ekrem SEZİK

Salep elde edilen orta kuşak orkidelerinden önemli bir kısmı Türkiye’de yetişmektedir. Batı Karadeniz Bölgesi de salep orkideleri bakımından oldukça zengindir. Ancak doğadan sökümler nedeniyle bu bitkilerin nesli tehlike altına girmiştir. Bu çalışmanın amacı, salep orkidelerinde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda çoğaltım olanaklarının geliştirilmesidir. Endospermi bulunmayan tohumların asimbiyotik olarak doku kültüründe çimlendirilmesi için toplam 16 tür (*Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich, *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo, *Dactylorhiza nieschalkiorum* Bauman et Künkele, *Dactylorhiza romana* (seb.) Soo, *Ophrys apifera* Hudson, *Ophrys ferrum-equinum* Desf, *Orchis coriophora* L., *Orchis laxiflora* Lam., *Orchis mascula* (L.) L. ssp. *pinetorum* (Boiss et Kotschy) Camus, *Orchis morio* L., *Orchis pallens* L., *Orchis purpurea* Hudson, *Orchis simia* Lam., *Orchis tridentata* Scop., *Platanthera chlorantha* (Custer) Reichb., *Serapias vomeracea* (Burm.fil.) Briq. ssp. *orientalis* Greuter.) kullanılmıştır. Farklı besin ortamı bileşimleri (1/2 MS, MS, VW & DB, KC, KC-N), besin ortamlarına GA₃ katkısı (0, 0.1, 0.5mg/l) yapılması ve inkübasyon sırasında farklı aydınlatma rejimi uygulamaları (ilk bir ay veya ilk 3 ay karanlıkta tutma ve ardından fotoperiyodik düzene aktarma) yapılmış; bu uygulamaların çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişme oranları üzerine etkileri incelenmiştir. *In vitro* koşullarda çimlendirme ve geliştirme amacıyla yedi farklı deneme, dış koşullara aktarma amacıyla dört değişik deneme kurulmuştur. Denemeye alınan tüm türlerde çimlenme ve protokorm elde edilmiş; ancak bunlardan üçünde çok düşük oranlarda olmakla birlikte sadece sekiz tanesinde bitkiye dönüşüm sağlanabilmiştir. Doku kültüründeki başarı, başta genotip olmak üzere besin ortamı, inkübasyon koşulları ve bitkinin yetiştirme koşullarından etkilenmektedir. Bu nedenle interaksyonlar ön plana çıkmaktadır. En yüksek bitki oluşum oranı *Orchis morio*’da % 89.88; *Serapias vomeraceae*’da % 57.65; *Orchis coriophora*’da % 48.35 ve *Orchis laxiflora*’da % 14.57 değerleriyle KC ortamından; *Dactylorhiza nieschalkiorum*’da % 19.87’lik bir değerle 0.5mg/l GA₃ ilave edilen KC besin ortamından elde edilmiştir. Dış koşullara alıştırma tam bir başarı sağlanamamış, bitkiler en fazla birkaç ay içerisinde canlılıklarını yitirmişlerdir. Yumruların bölünmesi ve ana yumru bitkinin doğal ortamına dikilmesi ile kurulan *in situ* denemelerde ise çıkış meydana gelmemiştir.

Ağustos 2009, 200 sayfa

Anahtar Kelimeler: Salep, orkide, Batı Karadeniz Bölgesi, *in vitro*, Besin ortamı, Karanlık, GA₃, Çimlenme, Protokorm, Bitki, Yumru

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATIONS FOR THE REPRODUCTION METHODS OF SOME OF THE ORCHID SPECIES (*ORCHIDACEAE*) USED FOR OBTAINING SALEP IN WESTERN BLACK SEA REGION.

Cevdet GÜMÜŞ

Ankara University
Institute of Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU

Co-supervisor: Prof. Dr. Ekrem SEZİK

Some of the important middle generation orchid species used for Salep production grows in Turkey. Western Black Sea region is also rich in terms of Salep orchids. However, they are under threat for extinction because of illegal hand picking from the nature. The aim of this study is to develop reproduction possibilities under in vitro and in vivo conditions. In order to germinate the seeds, not having the endosperm, under tissue culture asymbiotically 16 species were used. Those were (*Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich, *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo, *Dactylorhiza neschalkiorum* Bauman et Künkele, *Dactylorhiza romana* (seb.) Soo, *Ophrys apifera* Hudson, *Ophrys ferrum-equinum* Desf, *Orchis coriophora* L., *Orchis laxiflora* Lam., *Orchis mascula* (L.) L. ssp. *pinetorum* (Boiss et Kotschy) Camus, *Orchis morio* L., *Orchis pallens* L., *Orchis purpurea* Hudson, *Orchis simia* Lam., *Orchis tridentata* Scop., *Platanthera chlorantha* (Custer) Reichb. and *Serapias vomeracea* (Burm.fil.) Briq. ssp. *orientalis* Greuter.) Different nutrition media compositions (1/2 MS, MS, VW & DB, KC, KC-N), GA₃ addition to nutrition media (0, 0.1, 0.5mg/l), different lightning regime during incubation process (first one month or first three months under dark and transferred to photoperiodic arrangement) were carried out. Also, the effects of those applications to germination, protokorm formation and plant development rate were investigated. In order to germinate and develop the seeds under in vitro conditions, seven different trial areas and to transfer them to outdoors, 4 different trial areas were established. Germination and protokorm formation were obtained for all of the species taken under investigation. However, only eight of them turned into a plant and three of those were at very low rates. The success rate of tissue culture was affected especially by genotype, nutrition media, incubation conditions and plant growth conditions. Thus, interactions came to the fore. The highest plant formation ratio in KC nutrition media was found at *Orchis morio* as 89.88%, followed by *Serapias vomeraceae* as 57.65, *Orchis coriophora* as 48.35%, *Orchis laxiflora* as 14.57%. The highest plant formation ration in 0.5mg/l GA₃ added KC media was found at *Dactylorhiza neschalkiorum* as 19.87%. Complete success could not be achieved for adaptation to exterior conditions; plants lost their vitality within couple of months. An output could not be obtained from in situ trials made by dividing the tubers and planting the main tuberous plant to its natural environment

August 2009, 200 pages

Key words: Salep, Orchids, Western Black Sea Region, In vitro, Nutrition medium, Darkness, GA₃, Germination, Protokorm, Plant, Tuber

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek engin fikirleriyle yetiştirme ve gelişmeye katkıda bulunan, tanımaktan büyük mutluluk duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü); salep orkideleri konusunda Türkiye'de ilk çalışmaları başlatan, pek çok türün teşhisinde bulunan ve bazılarını da dünya literatürüne kazandıran, doğadan topladığımız orkide bitkilerinin teşhisini yapan ve değerli yardımlarını gördüğüm ikinci danışmanım Sayın Prof. Dr. Ekrem SEZİK'e (Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози Anabilim Dalı); süs bitkilerinin doku kültürü ile çoğaltımı konusundaki çalışma isteğimi anlayışla karşılayarak danışman hocama yönlendiren ve salep orkidelerinin önemini vurgulayarak bu konuda çalışmamız konusunda teşvik eden, ayrıca Tez İzleme Komitesi toplantıları vesilesiyle çalışmamın her aşamasında değerli yardım ve katkılarını gördüğüm hocam Sayın Prof. Dr. Hasan ÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü); Tez izleme Komitesi toplantılarında yönlendirici görüşlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Ercan ÖZZAMBAK'a (Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü); *in vitro* koşullarda elde edilen görüntülerin fotoğraflanmasında en son teknolojik olanakları ve emeğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Cengiz SANCAK'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü); stereomikroskoptaki sayımların yapılması ve fotoğrafların çekilmesinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Birhan KUNTER'e (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü); Adana'da yürütülen dış koşullara alıştırma denemelerinde yardımcı olan ve yönlendiren Sayın Doç. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ'ye (Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi); arazi çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Orman İşletme Müdürlükleri personeline; Laborant Mehmet TÜRKOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü); sağlıklı bir aile sistemi içerisinde yetiştirmeye vesile olan DEDEME, ANNEME, BABAMA; anlayış ve desteğini esirgemeyen EŞİME sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Cevdet GÜMÜŞ
Ankara, Ağustos 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1 GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1 Materyal.....	34
3.2 Yöntem.....	51
3.2.1 Salep elde edilen orkidelere ait tohumların <i>in vitro</i> koşullarda çimlendirilmesi.....	55
3.2.1.1 Genel doku kültürü şartları.....	55
3.2.1.2 Tohumların yüzeysel sterilizasyonu ve çimlendirilmesi.....	57
3.2.1.3 Denemelerin kurulması.....	59
3.2.1.4 <i>In vitro</i> bitkilerin dış koşullara alıştırılması.....	61
3.2.1.5 Değerlendirmelerin yapılması.....	65
3.2.2 Salep elde edilen orkideleri doğal koşullarda çoğaltma çalışmaları.....	66
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	70
4.1 <i>In vitro</i> Koşullarda Bitki Elde Etmek için Yapılan Çalışmalar.....	70
4.1.1 Deneme I.....	71
4.1.1.1 Çimlenme oranı.....	71
4.1.1.2 Protokorm oluşturma oranı.....	74
4.1.1.3 Bitki gelişme oranı.....	77
4.1.2 Deneme II.....	78
4.1.2.1 Çimlenme oranı.....	79
4.1.2.2 Protokorm oluşturma oranı.....	82
4.1.2.3 Bitki gelişme oranı.....	84
4.1.3 Deneme III.....	85
4.1.3.1 Çimlenme oranı.....	86

4.1.3.2 Protokorm oluşturma oranı.....	91
4.1.3.3 Bitki gelişme oranı.....	98
4.1.4 Deneme IV.....	100
4.1.4.1 Çimlenme oranı.....	101
4.1.4.2 Protokorm oluşturma oranı.....	104
4.1.4.3 Bitki gelişme oranı.....	108
4.1.5 Deneme V.....	111
4.1.5.1 Çimlenme oranı.....	112
4.1.5.2 Protokorm oluşturma oranı.....	114
4.1.5.3 Bitki gelişme oranı.....	117
4.1.6 Deneme VI.....	120
4.1.6.1 Çimlenme oranı.....	120
4.1.6.2 Protokorm oluşturma oranı.....	123
4.1.6.3 Bitki gelişme oranı.....	125
4.1.7 Deneme VII.....	128
4.1.7.1 Çimlenme oranı.....	128
4.1.7.2 Protokorm oluşturma oranı.....	131
4.1.7.3 Bitki gelişme oranı.....	136
4.2 Bitki Elde Edilen Türlerde Toplu Sonuçlar.....	140
4.2.1 <i>Dactylorhiza nischalkiorum</i>	140
4.2.2 <i>Orchis coriophora</i>	147
4.2.3 <i>Serapias vomeracea</i>	154
4.2.4 <i>Orchis morio</i>	157
4.2.5 <i>Orchis laxiflora</i>	161
4.3 <i>In vitro</i> Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması (aklimatizasyon).....	165
4.4 <i>In situ</i> Koşullarda Bitki Elde Etmek için Yapılan Çalışmalar.....	176
5. TARTIŞMA.....	177
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	189
KAYNAKLAR.....	193
ÖZGEÇMİŞ.....	199

SİMGELER DİZİNİ

°C	Celcius derece
cm	Mantimetre
g	Gram
l	Litre
mm	Milimetre
pH	Asitlik derecesi

Kısaltmalar

Alg	<i>Spirulina platensis</i>
GA ₃	Giberellik asit
KC	Knudson C
KC-N	İnorganik azot ilave edilmemiş Knudson C
Mikoriza 1	<i>Glomus etunicatum</i>
Mikoriza 2	<i>Glomus mossea</i>
½ MS	Yarı kuvvetteki Murashige and Skoog
MS	Murashige and Skoog
μmol s ⁻¹ m ²	Metrekareye bir saniyede düşen mikromol cinsinden ışık intensitesi
PE	Polietilen
VW&DB	Van Waes&DeBergh

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 <i>Anacamptis pyramidalis</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	35
Şekil 3.2 <i>Dactylorhiza incarnata</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	36
Şekil 3.3 <i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	37
Şekil 3.4 <i>Dactylorhiza romana</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	38
Şekil 3.5 <i>Ophrys apifera</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	39
Şekil 3.6 <i>Ophrys ferrum- equinum</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	40
Şekil 3.7 <i>Orchis coriophora</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	41
Şekil 3.8 <i>Orchis laxiflora</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	42
Şekil 3.9 <i>Orchis mascula</i> ssp. <i>pinetorum</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri....	43
Şekil 3.10 <i>Orchis morio</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	44
Şekil 3.11 <i>Orchis pallens</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	45
Şekil 3.12 <i>Orchis purpurea</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	46
Şekil 3.13 <i>Orchis simia</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	47
Şekil 3.14 <i>Orchis tridentata</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	48
Şekil 3.15 <i>Platanthera chlorantha</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	49
Şekil 3.16 <i>Serapias vomeracea</i> ssp. <i>orientalis</i> türüne ait çiçekli bitki örnekleri.....	50
Şekil 3.17 Doğal ortamından toprağıyla birlikte sökülerek deneme arazilerine taşınmak üzere hazırlanan <i>Orchis laxiflora</i> (a) ve <i>Orchis purpurea</i> (b) türüne ait orkide bitkileri.....	52
Şekil 3.18 Doğal ortamlarından toprağıyla birlikte sökülen orkidelerin kasa veya torbalarla taşınması.....	52
Şekil 3.19 Doğadan toplanan orkidelerin saksılanarak yerleştirildiğı ve muhafaza edildiğı mekan.....	53
Şekil 3.20 a. Orkidelere ait tohum kapsülleri ve bunların içerisinden çıkan toz gibi bir yapıya sahip tohumları b. Orkide tohumlarının stereomikroskop altındaki görünüşleri.....	58
Şekil 3.21 Sisleme ünitesindeki ‘perlit+ponza’ karışımına aktarılan orkide bitkileri.....	62
Şekil 3.22 Farklı yetiştirme ortamlarında dış koşullara adaptasyon için serada aktarılmış orkide bitkicikleri.....	63

Şekil 3.23 Mikoriza ve alg uygulaması yapılmış orkide bitkiciklerinin dış koşullara alıştırma aşamasına ait Adana’da yapılan denemeye ait görüntüler.....	65
Şekil 3.24 a ve b. Orkide tohumlarının <i>in vitro</i> ’da çimlenmesi, c. Protokorm oluşumu, d. Bitki gelişimi.....	66
Şekil 3.25 Bölünmek üzere hazırlanmış orkide yumruları.....	67
Şekil 3.26 Dikey olarak bölünen yumru parçaları ve odun kömürü tozuna batırıldıktan sonraki görünüşleri.....	68
Şekil 3.27 Bölünen yumru kısımlarının doğal ortamda kültüre alınması.....	68
Şekil 4.1 <i>În vitro</i> koşullarda kültüre alınan orkide tohumlarının embriyo hacimlerindeki artış ve boş tohumlarından ayırt edilme aşaması...	71
Şekil 4.2 Deneme I’de, farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	75
Şekil 4.3 <i>Orchis pinetorum</i> ’da protokorm oluşumu (0.67 X 10 büyütme).....	75
Şekil 4.4 a. <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> ’da protokorm oluşumu (1.5 X 10 büyütme) b. <i>Anacamptis pyramidalis</i> ’de protokorm oluşumu (3 X 10 büyütme)	76
Şekil 4.5 Deneme I’de, farklı besin ortamlarının üç orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	76
Şekil 4.6 Deneme I’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%).....	77
Şekil 4.7 Deneme I’de, dört farklı besin ortamının <i>D. neschalkiorum</i> türünde bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	78
Şekil 4.8 <i>Serapias vomeracea ssp. orientalis</i> türüne ait tohumlarda çimlenme (4 X 10 büyütme).....	79
Şekil 4.9 Deneme II’de, farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	82
Şekil 4.10 Deneme II’de, farklı besin ortamı bileşimlerinin iki orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	83
Şekil 4.11 Deneme II’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%).....	84
Şekil 4.12 Deneme II’de, dört farklı besin ortamı bileşiminin <i>S.vomeraceae</i> ve <i>O.laxiflora</i> türlerinde bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)....	85
Şekil 4.13 Deneme III’te, farklı orkide türlerinin iki ışıklandırma koşulu ve altı besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	92
Şekil 4.14 <i>Orchis pinetorum</i> ’da protokorm oluşumu (0.67X10 büyütme).....	92

Şekil 4.15 Deneme III'te farklı ışık uygulamalarının iki orkide türü ve altı besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).	93
Şekil 4.16 Deneme III'te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin iki ışıklandırma koşulu ve iki orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).	93
Şekil 4.17 Deneme III'te 'Tür + Işıklandırma' interaksyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%).	94
Şekil 4.18 a. <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> türüne ait protokormlarda ışığın klorofil oluşumu üzerine etkisi (0.67X10 büyütme) b. Karanlık ışık rejiminde tutulan <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> türüne ait protokormlar (0.67X10 büyütme).	95
Şekil 4.19 Deneme III'te 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)	96
Şekil 4.20 Deneme III'te Tür + Işıklandırma + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%).	97
Şekil 4.21 GA ₃ 'ün ve ışıklandırma koşullarının büyüme konisi uzaması ve klorofil oluşumu üzerine etkisi a. ' <i>D. neschalkiorum</i> + Karanlık + KC+0.1GA ₃ ' kombinasyonunda protokormun gelişerek bitkiciğe dönüşmeye başlaması (0.67X10 büyütme) b. ' <i>D. neschalkiorum</i> + Aydınlık + KC+0.1GA ₃ ' kombinasyonunda protokormun gelişerek bitkiciğe dönüşmeye başlaması (0.67X10 büyütme).	98
Şekil 4.22 Deneme III'te, farklı ışık uygulamalarının <i>D. neschalkiorum</i> türünde altı besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).	99
Şekil 4.23 Deneme III'te, 'Işıklandırma + Besin ortamı' interaksyonunun <i>D. neschalkiorum</i> türünde bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).	99
Şekil 4.24 a. <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'da ilk yaprakçıkların oluşumu 'Aydınlık + KC+0.1GA ₃ ' kombinasyonu (0.67X10 büyütme) b. <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'da bitkiciğin gelişmesi (0.67X10 büyütme).	100
Şekil 4.25 ½ MS+0.1GA ₃ ortamında kültüre alınan <i>Ophrys apifera</i> (a) ve <i>Ophrys ferrum-equinum</i> (b) türlerinde tohum ekiminden 3 ay sonra yapılan gözlemlerde çimlenme ve protokorm oluşum aşamasına geçiş (1 X 10 büyütme).	104
Şekil 4.26 <i>D. incarnata</i> 'da (VW&DB ortamı) az sayıda elde edilen fakat kayıt altına alınmayan birkaç bitki gelişim örneği.	105
Şekil 4.27 Deneme IV'te, farklı orkide türlerinin altı besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).	105

Şekil 4.28 Deneme IV'te, farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin dört orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).	106
Şekil 4.29 GA ₃ 'ün aynı tür ve besin ortamı bileşiminde büyüme konisi üzerine yaptığı etki	
a. ½ MS ortamında kültüre alınan <i>O.coriophora</i> protokormları (0.67x10 büyütme)	
b. 0.1 mg/l GA ₃ ilave edilen ½ MS besin ortamında kültüre alınan <i>O.coriophora</i> protokormları (0.67x10 büyütme).	106
Şekil 4.30 KC+0.1GA ₃ ortamında geliştirilen <i>O. apifera</i> protokormları (0.67X10 büyütme)	107
Şekil 4.31 Deneme IV'te, 'Tür + Besin ortamı' interaksiyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).	107
Şekil 4.32 Deneme IV'te, farklı orkide türlerinin altı besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).	109
Şekil 4.33 0.1mg/l GA ₃ ilave edilen ½ MS besin ortamında kültüre alınan ancak gelişme göstermeyen <i>Ophrys ferrum-equnium</i> bitkileri.	109
Şekil 4.34 Deneme IV'de farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin üç orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).	110
Şekil 4.35 Deneme IV'te, 'Tür + Besin ortamı' interaksiyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).	111
Şekil 4.36 Çimlenme aşamasına yakın <i>P. chlorantha</i> türüne ait tohumlar (KC ortamı, 10x4 büyütme).	112
Şekil 4.37 Deneme V'te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin dört orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).	113
Şekil 4.38 Deneme V'de farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).	115
Şekil 4.39 Deneme V'te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin üç orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).	116
Şekil 4.40 Deneme V'te 'Tür + Besin ortamı' interaksiyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)	116
Şekil 4.41 Deneme V'te farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).	117
Şekil 4.42 <i>O.simia</i> türünde az sayıdaki bitki gelişimi (KC+0.5mg/l GA ₃).	118
Şekil 4.43 Deneme V'te farklı besin ortamı bileşimi ve GA ₃ ilavesinin iki orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).	118
Şekil 4.44 Deneme V'te 'Tür + Besin ortamı' interaksiyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).	119

Şekil 4.45 Kuvvetli protokormlar geliştiren ancak az sayıda bitkiye dönüşen <i>Platanthera chlorantha</i> türüne ait örnekler (KC).....	120
Şekil 4.46 Deneme VI'da farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	123
Şekil 4.47 Deneme VI'da farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin üç orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	124
Şekil 4.48 Deneme VI'da 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	124
Şekil 4.49 Deneme VI'da farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	125
Şekil 4.50 Deneme VI'da farklı besin ortamı bileşimi ve GA ₃ ilavesinin iki orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	126
Şekil 4.51 İnorganik azot içermeyen KC ortamında (KC-N) gelişen <i>O.coriophora</i> bitkicikleri	127
Şekil 4.52 Deneme VI'da 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	127
Şekil 4.53 Deneme VII'de farklı orkide türlerinin dokuz besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	132
Şekil 4.54 Deneme VII'de farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin beş orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	132
Şekil 4.55 Deneme VII'de 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	134
Şekil 4.56 Deneme VII'de farklı orkide türlerinin dokuz besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	136
Şekil 4.57 Deneme VII'de farklı besin ortamı bileşimi ve GA ₃ ilavesinin beş orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	137
Şekil 4.58 Deneme VII'de 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	
Şekil 4.59 <i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i> 'da dört temel besin ortamı bileşiminin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi.....	141
Şekil 4.60 KC ortamında gelişen <i>D.nieschalkiorum</i> türüne ait protokormlar...	142
Şekil 4.61 <i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i> 'da üç temel besin ortamı bileşimi ve 0.1 mg/l GA ₃ katkısı ile aydınlık-karanlık uygulamasının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	144

Şekil 4.62 <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'da iki temel besin ortamı bileşimi ve 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	144
Şekil 4.63 0.5mg/l GA ₃ ilave edilen KC ortamında gelişmekte olan genç <i>D.neschalkiorum</i> bitkicikleri.....	145
Şekil 4.64 <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'da KC ve KC-N ortamlarının ve 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	146
Şekil 4.65 <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	147
Şekil 4.66 <i>Orchis coriophora</i> 'da ½ MS, KC ve KC-N ortamlarının ve 0.1 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	148
Şekil 4.67 ½ MS+0.1GA ₃ ortamına ekilen <i>O.coriophora</i> tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitkiler.....	149
Şekil 4.68 ½ MS ortamına ekilen <i>O.coriophora</i> tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitkiler ve yumrular.....	149
Şekil 4.69 <i>Orchis coriophora</i> 'da KC ve KC-N ortamlarının ve 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	150
Şekil 4.70 KC-N ortamına ekilen <i>O.coriophora</i> tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitki ve <i>in vitro</i> koşullarda oluşmuş yumrular.....	151
Şekil 4.71 KC ortamına ekilen <i>O.coriophora</i> tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitki ve <i>in vitro</i> koşullarda oluşmuş yumrular	151
Şekil 4.72 KC+0.5GA ₃ ortamına ekilen <i>O.coriophora</i> tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitki ve <i>in vitro</i> koşullarda oluşmuş yumrular	152
Şekil 4.73 KC-N+0.5GA ₃ ortamına ekilen <i>O.coriophora</i> tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitki ve <i>in vitro</i> koşullarda oluşmuş yumrular.....	152
Şekil 4.74 <i>Orchis coriophora</i> 'da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	153
Şekil 4.75 <i>Serapias vomeracea</i> 'de dört temel besin ortamı bileşiminin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	154
Şekil 4.76 <i>Serapias vomeracea</i> 'de KC ve KC-N ortamlarının ve 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	155

Şekil 4.77 <i>Serapias vomeracea</i> 'de ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	156
Şekil 4.78 <i>Serapias vomeracea</i> 'de KC ortamında protokormlardan yoğun bir şekilde bitki gelişimine geçiş aşaması.....	156
Şekil 4.79 KC ortamında gelişen <i>Serapias vomeracea</i> türüne ait bitkiler.....	157
Şekil 4.80 <i>Orchis morio</i> 'da ½ MS, KC ve KC-N ortamlarının ve 0.1 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	158
Şekil 4.81 <i>O.morio</i> 'da ½ MS besin ortamında gelişen protokormlar	159
Şekil 4.82 <i>Orchis morio</i> 'da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	159
Şekil 4.83 KC ortamında gelişen <i>O.morio</i> bitkicikleri.....	160
Şekil 4.84 VW&DB ortamında gelişen <i>O.morio</i> türüne ait bir bitki	161
Şekil 4.85 <i>Orchis laxiflora</i> 'da ½ MS ve KC ortamlarının ve 0.1 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi(%).....	161
Şekil 4.86 <i>Orchis laxiflora</i> 'da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	162
Şekil 4.87 <i>Orchis laxiflora</i> 'da VW&DB ortamında oluşan prokormlar.....	163
Şekil 4.88 KC+0.1 GA ₃ ortamında kültüre alınan <i>O.laxiflora</i> türünde gelişen bitkilerin farklı gelişme aşamaları.....	164
Şekil 4.89 Dış koşullara aktarma aşamasına gelmiş <i>O.laxiflora</i> türüne ait bir bitki.....	164
Şekil 4.90 Dış koşullara aktarma amacıyla hazırlanmış bir <i>O.coriophora</i> bitkiciği.....	166
Şekil 4.91 Perlit, vermikulit ve torf ortamındaki <i>D. nieschalkiorum</i> bitkilerinin, dış ortama aktarımdan 3 hafta sonraki durumu.....	167
Şekil 4.92 Dış koşullara alıştırma amacıyla yapılan üçüncü çalışmada kullanılan bir <i>Orchis laxiflora</i> bitkisi.....	168
Şekil 4.93 Üçüncü dış koşullara alıştırma çalışmasının birinci aşamasında kapaklı PET kutular içerisindeki vermikulit ortamında gelişmeye bırakılan <i>Orchis laxiflora</i> bitkileri.....	168
Şekil 4.94 Üçüncü dış koşullara alıştırma çalışmasının ikinci aşamasında toprağa aktarılan ve dördüncü hafta sonunda yaşamını sürdüren <i>O.morio</i> bitkileri.....	169

Şekil 4.95 Orkide bitkilerinin dış koşullara alıştırılmasında alg ve mikoriza uygulamalarından sonraki sekizinci haftada bitkilerin gelişme durumları.....	174
Şekil 4.96 Birinci gelişme dönemindeki <i>O.coriophora</i> türüne ait örneklerle yapılan alg uygulamalarının bitki gelişimine etkisi.....	175

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Ticari saleplerin ortalama yumru ağırlığı ile birim ağırlıktaki yumru sayıları.....	3
Çizelge 2.1 Orkide türlerine göre müsilağ ve nişasta oranları.....	12
Çizelge 2.2 Ticari saleplerin müsilağ ve nişasta oranları.....	13
Çizelge 2.3 Kastamonu salebinin elde edildiği türler.....	14
Çizelge 3.1 Orkide örneklerinin alındığı lokasyonlar ile Davis (1984)'e göre lokasyonlar.....	54
Çizelge 3.2 Denemelerde kullanılan temel besin ortamı bileşimleri.....	56
Çizelge 4.1 Deneme I'de, farklı orkide türlerine ait tohumların dört besin ortamında çimlenme oranı (%).....	72
Çizelge 4.2 Deneme I'de farklı besin ortamlarının altı orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	73
Çizelge 4.3 Deneme I'de, 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	74
Çizelge 4.4 Deneme I'de, farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	75
Çizelge 4.5 Deneme I'de, farklı besin ortamlarının üç orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	76
Çizelge 4.6 Deneme I'de 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%).....	77
Çizelge 4.7 Deneme I'de, dört farklı besin ortamının <i>D. nieschalkiorum</i> türünde bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	78
Çizelge 4.8 Deneme II'de, farklı orkide türlerine ait tohumların dört besin ortamında çimlenme oranı (%).....	80
Çizelge 4.9 Deneme II'de farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin beş orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	80
Çizelge 4.10 Deneme II'de 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	81
Çizelge 4.11. Deneme II'de, farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)	82
Çizelge 4.12 Deneme II'de, farklı besin ortamı bileşimlerinin iki orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)	83
Çizelge 4.13 Deneme II'de 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%)	84
Çizelge 4.14 Deneme II'de, dört farklı besin ortamı bileşiminin <i>S.vomeraceae</i> ve <i>O.laxiflora</i> türlerinde bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)	85

Çizelge 4.15 Deneme III'te, farklı orkide türlerine ait tohumların iki ışıklandırma koşulu ve altı besin ortamı bileşiminde çimlenme oranı (%).....	86
Çizelge 4.16 Deneme III'te farklı ışık uygulamalarının üç orkide türü ve altı besin ortamı bileşimi bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	87
Çizelge 4.17 Deneme III'te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin iki ışıklandırma koşulu ve üç orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	87
Çizelge 4.18 Deneme III'te 'Tür + Işıklandırma' interaksyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	88
Çizelge 4.19 Deneme III'te 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%)	89
Çizelge 4.20 Deneme III'te 'Tür + Işıklandırma + Besin ortamı' kombinasyonlarının çimlenme oranı üzerine etkileri (%)	90
Çizelge 4.21 Deneme III'te, farklı orkide türlerinin iki ışıklandırma koşulu ve altı besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	92
Çizelge 4.22 Deneme III'te farklı ışık uygulamalarının iki orkide türü ve altı besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	93
Çizelge 4.23 Deneme III'te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin iki ışıklandırma koşulu ve iki orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	93
Çizelge 4.24 Deneme III'te 'Tür + Işıklandırma' interaksyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%).....	94
Çizelge 4.25 Deneme III'te 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	96
Çizelge 4.26 Deneme III'te 'Tür + Işıklandırma + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%).....	96
Çizelge 4.27 Deneme III'te, farklı ışık uygulamalarının <i>D. nieschalkiorum</i> türünde altı besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	99
Çizelge 4.28 Deneme III'te, 'Işıklandırma + Besin ortamı' interaksyonunun <i>D. nieschalkiorum</i> türünde bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	99
Çizelge 4.29. Deneme IV'te, farklı orkide türlerine ait tohumların altı besin ortamında çimlenme oranı (%).....	101
Çizelge 4.30 Deneme IV'de farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin beş orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	102

Çizelge 4.31 Deneme IV’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	103
Çizelge 4.32 Deneme IV’te, farklı orkide türlerinin altı besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	105
Çizelge 4.33 Deneme IV’te, farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin dört orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)....	106
Çizelge 4.34 Deneme IV’te, ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	107
Çizelge 4.35 Deneme IV’te, farklı orkide türlerinin altı besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	109
Çizelge 4.36 Deneme IV’de farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin üç orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	110
Çizelge 4.37 Deneme IV’te, ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	111
Çizelge 4.38 Deneme V’te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin dört orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	113
Çizelge 4.39 Deneme V’te, ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	114
Çizelge 4.40 Deneme V’de farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	115
Çizelge 4.41 Deneme V’te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin üç orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)....	116
Çizelge 4.42 Deneme V’te ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	116
Çizelge 4.43 Deneme V’te farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	117
Çizelge 4.44 Deneme V’te farklı besin ortamı bileşimi ve GA ₃ ilavesinin iki orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	118
Çizelge 4.45 Deneme V’te ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	119
Çizelge 4.46 Deneme VI’da farklı orkide türüne ait tohumların dört besin ortamında çimlenme oranı (%).....	121
Çizelge 4.47 Deneme VI’da farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin üç orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	121
Çizelge 4.48 Deneme VI’da ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	122
Çizelge 4.49 Deneme VI’da farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	123

Çizelge 4.50 Deneme VI'da farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ ilavesinin üç orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)...	124
Çizelge 4.51 Deneme VI'da 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	124
Çizelge 4.52 Deneme VI'da farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	125
Çizelge 4.53 Deneme VI'da farklı besin ortamı bileşimi ve GA ₃ ilavesinin iki orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	126
Çizelge 4.54 Deneme VI'da 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	127
Çizelge 4.55 Deneme VII'de farklı orkide türüne ait tohumların dokuz besin ortamında çimlenme oranı (%).....	129
Çizelge 4.56 Deneme VII'de farklı besin ortamı bileşimi ve GA ₃ ilavesinin beş orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	129
Çizelge 4.57 Deneme VII'de 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%).....	130
Çizelge 4.58 Deneme VII'de farklı orkide türlerinin dokuz besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)	132
Çizelge 4.59 Deneme VII'de farklı besin ortamı bileşimleri ile GA ₃ beş orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	132
Çizelge 4.60 Deneme VII'de 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%).....	135
Çizelge 4.61 Deneme VII'de farklı orkide türlerinin dokuz besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	136
Çizelge 4.62. Deneme VII'de farklı besin ortamı bileşimi ve GA ₃ ilavesinin beş orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	137
Çizelge 4.63 Deneme VII'de 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%).....	138
Çizelge 4.64 <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'da dört temel besin ortamı bileşiminin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	141
Çizelge 4.65. <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'da üç temel besin ortamı bileşimi ve 0.1 mg/l GA ₃ katkısı ile aydınlık-karanlık uygulamasının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)....	142
Çizelge 4.66 <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'da iki temel besin ortamı bileşimi ve 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	144

Çizelge 4.67 <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'da KC ve KC-N ortamlarının ve 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	144
Çizelge 4.68 <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	147
Çizelge 4.69 <i>Orchis coriophora</i> 'da ½ MS, KC ve KC-N ortamlarının ve 0.1 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	148
Çizelge 4.70 <i>Orchis coriophora</i> 'da KC ve KC-N ortamlarının ve 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	150
Çizelge 4.71 <i>Orchis coriophora</i> 'da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	153
Çizelge 4.72 <i>Serapias vomeraceae</i> 'de dört temel besin ortamı bileşiminin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	154
Çizelge 4.73 <i>Serapias vomeraceae</i> 'de KC ve KC-N ortamlarının ve 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	155
Çizelge 4.74 <i>Serapias vomeraceae</i> 'de ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	156
Çizelge 4.75 <i>Orchis morio</i> 'da ½ MS, KC ve KC-N ortamlarının ve 0.1 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	158
Çizelge 4.76 <i>Orchis morio</i> 'da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	159
Çizelge 4.77 <i>Orchis laxiflora</i> 'da ½ MS ve KC ortamlarının ve 0.1 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	161
Çizelge 4.78 <i>Orchis laxiflora</i> 'da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA ₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%).....	162
Çizelge 4.79 Farklı türlerin sekizinci hafta sonunda canlı bitki oranı üzerine etkisi (%).....	170

Çizelge 4.80 Farklı uygulamaların sekizinci hafta sonunda canlı bitki oranı üzerine etkisi (%).....	170
Çizelge 4.81 Farklı ‘Tür + Uygulama’ interaksiyonlarının dış koşullara aktarılan bitkiciklerin haftalara göre canlılık oranı üzerine etkisi (%).....	172

1. GİRİŞ

Bitki gen kaynakları bakımından Türkiye zengin bir ülkedir. Bu kaynakların doğal olarak bulunması, “kendiliğinden” yetişiyor olmaları, sanki sınırsız ve sonsuz bir kaynakmışçasına tüketilmelerine hatta tahrip edilmelerine neden olmaktadır. İşte Anadolu topraklarında yetişen 140 kadar tür ile eşsiz bir çeşitlilik ve zenginlik sunan orkideler; bu doğal kaynaklardan birisidir.

Orkide deniliğinde tropikal iklimlerde yetiştirilen, pahalı, gösterişli ve egzotik bir çiçek akla gelmektedir. Ancak son birkaç yıldan bu yana ülkemizdeki seralarda da bu bitkinin yetiştiriciliğine başlanması ve ayrıca ithal edilmesi sayesinde artık alışveriş merkezlerinde bile çok uygun fiyatlarla temin edilebilen bir süs bitkisi haline gelmiştir. Süs bitkisi olarak tanınan orkidelerden başka; Türkiye’de doğal alanlarda yetişen bir başka orkide grubu vardır ki; bunlar daha çok kullanım amacı ve şekli doğrultusunda anıldığı ismiyle “salep” bitkisi olarak bilinirler. Bitkiye olan ilginin artmasıyla birlikte bilginin de geliştiği gazete, dergi ve çeşitli yayınlarda artık “salep orkidesi” olarak tanımlandıklarını görmekteyiz. “Salep elde edilen orkideler”, orkide ailesinin çok önemli bir bölümünü oluşturmaktadır.

Orchidaceae familyası, yaklaşık otuz bin türü ile yeryüzünde en geniş yayılıma sahip familyalardan birisidir (Özkoç 1991, Arditti and Ghani 2000). Dünya üzerinde 600-800 cinsi bulunan orkidegillerin epifitik olanları tropikal iklimlerde doğal alanlarda veya gerekli ekolojik koşulların sağlandığı seralarda yetiştirilmekte olup, gösterişli çiçekleri nedeniyle süs bitkisi olarak değerlendirilmektedir. Epifitik orkideler toprağa kök salmaz, başka bitkilerin gövde ve dalları üzerinde yaşarlar. Bununla birlikte fotosentez yapma yeteneğinde olup parazit değildirler.

Temel özellikleriyle benzer çiçek yapısına sahip olmakla birlikte çok daha küçük çiçeklere sahip olan ve toprakta yaşayan orkideler ise “ılıman kuşak orkideleri” veya “karasal orkideler” (terrestrial orchids) olarak adlandırılmaktadırlar.

Karasal orkideler; Avrupa, Akdeniz havzası, Kafkasya ve ön Asya'da yayılım gösterirken, 600 dolayında tür ve alttüre sahiptirler. Bu orkidelere “orta kuşak orkideleri” adı da verilir.

Sezik (1984), Türkiye’de 24 cins ve 90 dolayında orkide türü bulunduğunu bildirdiği yıllardan sonra, yeni ilave edilen türlerle birlikte bu sayının 140 tür olarak değiştiğini ifade etmektedir.

Türkiye’deki orkidelerin korunmasıyla ilgili toplantı Muğla’da yapıldı. (Anonim 2000). Nitekim Kreutz (2000)’da Türkiye’deki *Orchidaceae* familyası varlığına 9 cinsle 46 türün daha ilave edildiğini ifade etmektedir. 140 tür orkide bitkisi sadece bulunmakla kalmayıp, bunlardan bir kısmı da endemik olma özelliğine sahiptir. Erdem (2004), yurdumuzda yetişen orkidelerin %13’ünün endemik, yani sadece bu topraklarda yetişen bitkiler olduğundan bahsetmektedir. Tüm bu bilgiler, orkide gen kaynağı açısından zenginlik kavramının gerçekten de gözardı edilemeyecek boyutlarda olduğunu ve bu değerlere hak ettiği önemi vermek, hassasiyet göstermek gerektiğini ortaya koymaktadır.

Ilıman kuşak veya karasal orkidelerin toprakaltı organları; yumru (tuber), kök ve rizom olarak farklılık göstermektedir. Yumrular genellikle iki tane olup bunlar birbirine yapışık durumdadır. Birisi yetiştiği yıla ait olan genç yumru, diğeri ise bir önceki yıla ait yumru olup bu bitkiler çiçekli haldeyken kazılıp topraktan çıkarılmakta, toplanıp salep elde etmek amacıyla kullanılmaktadır (Sezik 1984).

“Salep nedir ve tarihçesi nasıldır?” sorusunun yanıtı; ülkemizde bu bitkinin tanınması, bilimsel olarak çalışmalarda kullanılması ve korunması konularında büyük emeği olan Prof. Dr. Ekrem SEZİK’in bir kitabından alınarak aşağıda aktarılmıştır. Bu konuda yapılan tüm kaynak araştırmalarında, yayınların tümünde Sezik (1984)’e atıf yapıldığı görülmüştür:

“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” kelimelerinin kullanıldığını görürüz. Bunların manası “tilki testisi” ve “köpek testisi” dir. Zamanla ilk kelimeler düşmüş ve sadece “Salep” kelimesi kullanılmıştır. Batı dillerinde de durum aynıdır. Örneğin, İtalyanca'da Salep yerine “testicolo di cane”, eski İngilizce'de ise “foxstones” veya “dogstones” kelimeleri kullanılmış, daha sonra sadece “Salep” kullanılmıştır. Salep, Dioscorides zamanından beri tıp kitaplarında kayıtlı bulunan bir drogdur. Dioscorides “Materia Medica” adlı meşhur kitabında, orkidelerin yaprak ve çiçekleri hakkında bilgi vermekte, ayrıca köklerinden büyük olanı yiyenin erkek, küçüğü yiyenin ise kız çocuğu olacağını belirtmektedir. Ayrıca köklerin kırmızı şarapla beraber kullanılması tavsiye etmektedir. İbn-i Sina'nın “Kanun” adlı eserinin 2. cildinde (Edviyei Müfrede) Hüssa-el sal'eb ve Hüssa-el kelb başlıkları altında saleple ilgili çok geniş bilgiler bulunmaktadır. İbn-i Sina bu drogu afrodizyak, iştah açıcı, felç giderici olarak tavsiye etmektedir. Hatta doğacak çocuğun cinsiyetini bile belirleyici bir drog olduğunu ifade etmektedir. Yine 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. IV. Murad'ın başhekimi Emir Çelebi'nin “Enmuzec-i Tıb”, 2. Selim'in başhekimi Tabib Nidai'nin “Menafiün Naas” gibi, daha çok İbn-i Sina'nın kitaplarının temel olarak alınmasıyla hazırlanan tıp kitaplarında da benzer kullanım şekilleri verilir. Salih bin Nasrullah'ın “Gayet-ül Beyan fi tedbir-i beden-il insan” adlı tıp kitabında “Husyet-üs salep” bahsinde, kullanılışı şu şekilde anlatılır: “Meşhurdur ikinci derecede ısıdır yaabisdir cimaa gayet kuvvet virir acem diyarında gayet muteberdir döğerler bal ile ya şeker ile baluze gibi bişürüb ısıcak gahve gibi içlerler”. Soğuk kış gecelerinde, salep içme alışkanlığımızın ne kadar eskiye dayandığını bu örnek güzel bir şekilde göstermektedir. I. Mehmet zamanında yaşamış olan Mehmed el Şirvanı tarafından yazılan risalede terkibi verilen “Macun-u Şahı” nin belli başlı maddelerinden biri de saleptir. Yazar bu macunun yararlarını şöyle anlatır: “Evvel fehm ziyade eder dahi yüreğe kuvvet virür ve dahi ciğer ağrısına faide eder ve dahi bevasire gayet nafidir ve hem kulunç giderir ve hem iptidai ikrise nafidir ve küllü maraza faide eder mücerrebdır şahlar macunudur”. Görüldüğü gibi bu macunun vereme, nikrise ve hemen bütün hastalıklara iyi geldiğini belirtmektedir. 1691-1692 yılları

arasında Mehmet Ali tarafından hazırlanan “Tercüme-i Cedide Filhavasıl Müfrede” adlı kitap salep ve orkidelerle ilgili bilgilerin ayrıntılı bir şekilde bulunduğu önemli bir elyazması eserdir. Bu kitapta salep veren bitkinin resmi gayet güzel, aslına benzer bir şekilde çizilmiştir. I. Mahmut devrinde (1730-1754) yaşamış olan, Hüseyin oğlu Ahmed'in, “Tuhfet-ül Müminin” adlı Farsça kitaptan tercüme ederek hazırladığı “Gunyat-al muhsilin tercümeti tuhfet-ül müminin” adlı eserinde salep ve onu veren bitkiler hakkında geniş bilgiler bulunmaktadır. Bu kitapta orkidelerde yeni yumrunun meydana gelişi, yaprak ve çiçeklerin şekli ile rengi açıklanmakta, ve bu özelliklerle bilinen diğer bitkiler (kuzu kulağı, süsen, zambak, vb.) karşılaştırılmaktadır. Ayrıca kullanılışı hakkında da geniş bilgiler bulunmaktadır. Salep, Osmanlı Sarayı'nın “Helvahane”sinde her sene padişahlar için pişirilen macunların kaydedildiği defterde de bulunmaktadır. Bu defterde Macun-i Misritaytus (Mısridat Macunu), Macun-u felasife (Feylezoflar macunu), Macun-u Maddet-ül Ferah (Ferahlatıcı Maddeler Macunu) bileşimlerinde önemli miktarlarda salep bulunmaktadır. Bu örnekler, salebin Osmanlılar'da ve daha önceki devirlerdeki tıpta önemli bir yeri olduğunu, değişik formları halinde ve değişik amaçlar için ilaç olarak kullanıldığını göstermektedir. Batı kaynakları da, sinyatür teorisine bağlı olarak, salebin Dioscorides'ten beri asırlarca afrodisyak olarak Avrupa ve özellikle doğu ülkelerinde kullanıldığını belirtmektedirler. Eskiden değişik amaçlarla ilâç yapımında kullanılmışsa da, bu kullanımları terkedilmiştir. Salep halen sadece gıda olarak kullanılmaktadır.”

Türkiye'de yetişen orkidelerin yumrularından asırlarca salep elde edilmiş, hem yurt içinde kullanılmış hem de ihraç edilmiştir. Avrupa kaynaklarında 1700 yıllarında “Levant Salebi”nin bilhassa İzmir'den ihraç edildiği, Muğla, Milas ve Kastamonu yörelerinde salep elde edildiği kayıtlıdır. Yıllık ihracatın 5000 okka olduğu da (1 okka 1,283 kg olduğuna göre 6.415 kg, yaklaşık 6,5 ton) aynı kaynaklarda belirtilmektedir. İhracat özellikle Suriye, Yunanistan, Ürdün, Lübnan, İsrail, S.Arabistan ve Kıbrıs'a yapılmıştır. İhracat miktarı bazı yıllarda 15 tona kadar çıkmıştır. Türkiye'den yurt dışına salep yumrularının satışı, asırlarca devam etmiş fakat doğadan yumru sökümünün “tahribat” boyutlarına ulaşması soncunda 1974 yılında Tarım Bakanlığı, uyarıları dikkate alarak ihracatı yasaklamıştır (Sezik 1984). İçecek olarak ve dondurmanın içine katılması yoluyla kullanılan salebe talebin her zaman olması, tüccarları yeni çarelere

yönlendirmiş; bu defa salep yumru değil ama toz halinde ihraç edilir olmuştur. 1995 yılına kadar süren toz salep (salep unu) ihracatı da, aynı yıl yasaklanmıştır. Yapılan araştırmalarda Türk Ticari Saleplerinin ortalama ağırlıkları hesaplanarak Çizelge 1.1’de verilmiştir. Buna göre en çok ihraç edilen ve yumruları orta büyüklükte olan Kastamonu Salebinin 1 tonunda ortalama 2 000 000 orkidinin yumrusu bulunurken, Muğla salebinin 1 tonunda 4 348 000 ve Silifke Salebinin 1 tonunda ise 2 857 000 adet orkide yumrusu bulunmaktadır (Sezik 1984).

Çizelge 1.1 Ticari saleplerin ortalama yumru ağırlığı ile birim ağırlıktaki yumru sayıları (Sezik 1984)

Ticari salepler	Ortalama yumru ağırlığı(g)	1kg’daki yumru sayısı	1ton’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	1.0	1 000	1 000 000

15 ton ihracatın tamamının en çok ihraç edilen Kastamonu salebinden karşılandığı ve yurt içinde de yıllık ihracat miktarı kadar kullanıldığı düşünülürse bu yılda 50-60 milyon orkide yumrusunun doğadan söküldüğü anlamına gelir. Bir yandan salep elde etmek üzere toplanması, diğer taraftan hızlı şehirleşmenin bir sonucu olarak da salep, Anadolu’da birçok bölgenin doğal bitki örtüsü görünümünden çıkmış, çok seyrek rastlanabilen bitkiler arasına girmiştir. Avrupa kaynaklarında, Osmanlı Devleti döneminde her yıl 5.000 okka (6.5 ton) salep ihraç edildiği kaydı da göz önüne alındığında, bu tahribin asırlardır devam ettiği ve hızlanarak arttığı ortaya çıkmaktadır. Orkidelerdeki bu tahribin kademe kademe nasıl ilerlediği ve değişik bölgelerde önceden çok bol bulunduğu halde, bazı orkide türlerinin şimdi bir iki örneğini bulmanın çok zor olduğu, daha önce bulunan nadir türlerin ise, artık bulmanın imkansızla yakın olduğu ifade edilmektedir (Sezik 2002).

Yumrular yaş iken 2-7g olduğuna göre, ortalama 4 g olarak düşünülürse 1 kg taze yumru için 250 adet orkidenin sökülmesi gerekmektedir. Bir salep toplayıcısı normalde günde 1kg taze yumru toplayabilmektedir. 1kg salep üretmek için yaklaşık 1000-4000 yumruya ihtiyaç bulunmaktadır (Sezik 1984). İşler (2005), Van ili ve çevresinden toplanan dağ salebinin kilosunun 100TL olduğunu ve bu nedenle çok cazip bir kazanç olanağı sunduğunu bildirmektedir. Tekinşen (2006), Türkiye’de elde edilen 35-65 ton salebin 15-20 ton kadarının toz şeklinde yurt dışına çıkarıldığını; 50 ton kadar yumru veya toz salebin yurt dışından Türkiye’ye getirildiğini ifade etmektedir.

Bir yandan doğal olarak yetişen orkidelerin sökülmesinin kontrol altında tutulması ile ilgili yasal sınırlamalar getirilmektedir. Örneğin, 2004’te 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 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 sökülmesinin yapıldığı bilinmektedir (Sezik 1984). Çünkü diğer yandan salep orkideleri halkın geçim sıkıntısını hafifletmede yararlanılacak bir doğal kaynak olarak görülmekte, hatta bizzat bazı resmi kurumlar tarafından yöre halkının geçim kaynakları arasında bulunduğu açıklanmaktadır. Basında çıkan bazı haberlerden bu durum gayet net bir biçimde anlaşılmaktadır. Örneğin, Beyşehir (Karaman) ve çevresinde bolca yetişen saleplerin yöre halkına geçim kaynağı oluşturduğu Yenidoğan Belde Belediye Başkanı tarafından açıklanırken (Anonim 2009 a); benzer bir haber Yozgat-Akdağmadeni için bizzat Kaymakam tarafından verilmekte (Anonim 2009 b) ve bu durum Davulbaz Köyü’nün web sitesinde de halkın geçim kaynakları arasında sıralanmaktadır (Anonim 2009 c). Bir başka benzer haber, Gümüşhane Orman İşletme Müdürü tarafından basına yansıtılmakta; Gümüşhane ve yöresinde salebin halkın geçim kaynağı olmaya başladığı anlatılmaktadır (Anonim 2009 d). Bu haberlerde günümüz piyasasında 1 kg yaş salebin 5-8 TL’ye satıldığı ifade edilmektedir.

Yasal engeller ile resmi açıklamaların büyük bir tezat oluşturduğu salep konusunun çözüme ulaşmasının tek yolu, üretim sisteminin oluşturulmasıdır.

Orkidelerin doğal stokları iki yönlü tahrip edilmektedir. Bunlardan birincisi, şiddetli söküm (doğrudan yok etme); ikincisi ise çiçeklenme aşamasında söküm yapılması nedeniyle tohum oluşturup neslini devam ettirmesi için şans bile verilmemesidir (dolaylı yok etme). Doğada oluşan tohumlarında çimlenmeleri çok güç ve uzun zamana ihtiyaç duyan bir yapıdadır. 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). Toz gibi bir yapıda olup gözle tek bir tohumun ayırt edilmesi bile güçtür. Zorluk bununla da kalmaz, bu tohumların endospermi yani besin dokusu yoktur. Tohum kabuğu içinde sadece embriyo yer alır. Bu tohumların çimlenebilmesi için sıcaklık, ışık, nem ve oksijen gibi tüm diğer tohumların ihtiyaç duyduğu uygun ekolojik koşulların yanı sıra bir de “mikorhizal fungus” ile bir ortalık kurma ihtiyacı bulunmaktadır. Ingold and Hudson (1993), orkide embriyolarının çimlenmek için gereksinim duydukları enerjiyi, mikorhiza işbirliği sayesinde sağladığı glikoz gibi karbonhidratlardan elde ettiğini ifade etmektedir. Andersen and Rasmussen (1996), orkide türlerinin yaşamlarının en azından bir bölümünün mikorhizal bir birlikteliğe ihtiyaç duyduklarını ve bu ortakların çoğunlukla *Rhizoctonia sp.* türüne ait olduğunu belirtmektedirler. Orkide türleri arasında, ortak olacakları *Rhizoctonia* türünü seçme gibi bir ayırım bulunmadığı ve tek bir mikorhiza türünün değişik orkide türlerinde rahatlıkla çimlenme ortaklığı kurabilecekleri ifade edilmektedir. Çimlenme sonrasında kendi klorofilini bulunduran ve fotosentez yapabilen yeşil yapraklı orkidelerde fungusa bağımlılık ortadan kalktığı halde; *Corallorhiza sp.* ve *Neottia sp.* gibi türlerde fungusla simbiyotik yaşamı boyunca devam etmektedir. Sezik (1984), fungusun önce orkide tohumuna parazit olarak enfekte olduğunu, kısa bir süre sonra fungusun tohum hücreleri tarafından durdurulduğunu, asimile edildiğini ve bir denge kurulduğunu ifade etmektedir. Bu simbiyotik yaşamda, bahar ve yaz mevsiminde orkide tohumuna ait hücreler; sonbahar ve kış aylarında ise fungus hücreleri baskındır. Tohum çimlendiğinde meydana gelen, önceleri küçük bir çivi şeklindeki yapıya mikorizom veya protokorm adı verilir. Fungus, bulunduğu ortamdaki organik humusun parçalanmasıyla oluşan nişasta ve benzeri bileşikler, suda çözünen şekerler haline çevirerek, genç orkide bitkisine gönderir. Genç bitki, henüz

çimlenmeyi sağlayacak yedek besin taşımadığı için, mikorizomun büyümesi çok yavaştır. Salep elde edilen orkide bitkilerine ait yumrular her yıl tek bir yavru yumru meydana getirmektedir. Bu nedenle, pek çok bitki türünde olduğu gibi üretim hızının düşük olması ve bilinçsiz yapılan sökümler sonucu salebin nesli giderek tükenmektedir. Çoğalması güç ve yavaş olan bu bitkinin tüketimine yönelik bilinçsiz sökümlere rağmen günümüzde az da olsa bulunabilmesi, doğada çok az miktarda tohumun çimlenip yumru oluşturmaya bağlıdır (Gönülşen vd.1996).

Mikorizom fungusları, daha çok humuslu topraklarda bulunurlar. Kayın, meşe, huş, çam gibi pek çok ağacın ve fundalıkların köklerinde yaşarlar. Orkidelerin daha çok bu tip arazilerde bulunmasının sebeplerinden biri de budur. Tohumun çimlenmesinde ikinci aşama, yumru veya köklerin teşekkül etmesi, yaprak taşıyan bir sapın toprak yüzeyine doğru meydana gelmeye başlamasıdır. Bu aşamada mikorizom kurur, yerini bitkinin ergin formuna terkeder. Orkidenin mikorizom fungusuna bağlılığı, cinslere göre farklılık gösterir. 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.

Yumru ve yapraklar uzun yıllar sonra meydana gelir. En kısa ortalama süre 2-4 yıldır. *Orchis*, *Ophrys* ve *Dactylorhiza* türlerinde bitkinin ilk yaprakları ortalama 4, *Epipactis* ve *Cephalanthera* türlerinde 2-3 yıl sonra; *Spiranthes aestivalis*'te ise ilk yumru ancak 9. yılda, *Neottia* türlerinde ilk çiçek 9-12 yıl sonra meydana gelmektedir. *Listera* türlerinde ise 4. yılda ilk yaprak meydana gelir, fakat bitki ancak 15. yılda (tohumun toprağa düşmesinden itibaren geçen) çiçek açar. *Cypripedium* türlerinde ise ergin bir ferdin meydana gelmesi için 16 yıl veya daha uzun bir süre beklemek gerekmektedir.

Orkidelerin generatif üremelerinin yanında bazen vejetatif olarak da üredikleri görülmektedir. Yüksek rakıma sahip bölgelerde yetişen orkideler bazen düşük sıcaklık nedeniyle gelişmesini tamamlayıp tohum bağlayamaz. Diğer taraftan sık orman altındaki orkidelerde ise ışık eksikliğinden dolayı hayat olayları çok yavaş cereyan eder

ve bitkiler istenen gelişmeye ulaşamazlar. İşte, bu veya buna benzeyen, çevre ile ilgili şartlar dolayısıyla, orkideler neslini vejetatif çoğalarak devam ettirmeye çalışır. *Orchis*, *Dactylorhiza* ve *Ophrys* türlerindeki 2 yumru, zamanla birbirinden ayrılıp 2 ayrı bitki verecek şekilde gelişir. Böylece orkide kümeleri meydana gelir. *Dactylorhiza* cinsi bu bakımdan çok başarılıdır. Doğada büyük *Dactylorhiza* kümelerine rastlanmasının sebeplerinden biri de bu vejetatif çoğalmadır (Sezik 1984).

Ülkemizde yetişen orkide türleri arasında yer alan *Orchis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Platanthera*, *Anacamptis*, *Dactylorhiza* cinslerine ait olanlar başta olmak üzere birçok tür doğadan toplanmaktadır. Her yıl 30 milyon civarında doğadan sökümlü yapılan bir bitki, çoğalmasında da sorunlar bulunuyorsa bu bitkinin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalması kaçınılmazdır. Nitekim kişisel gözlemlerimiz de; kayıtlarda mevcut gösterilen bazı türlerin ziyaret edilen doğal alanlarda bulunmadığı yönündedir.

Orkide bitkisi neden üretilmemekte ya da üretilmemektedir? Tohumlarının çok küçük, besin deposu bakımından eksik ve kusurlu olması ve çimlenme için mikorhizal bir fungusla işbirliğine ihtiyaç duyması; çimlenmeden sonra da yetişkin bir bitki haline gelinceye kadar uzun yıllar geçmesi; ayrıca uygulanabilir vejetatif yollarla çoğaltım olanaklarının sınırlı ya da hiç olmaması gibi nedenler; orkidelerin üretimini kısıtlamaktadır. Ancak bir sonraki bölümde (Kaynak Özetleri) açıklandığı üzere doku kültürü yöntemiyle asimbiyotik çimlendirme ve bitki elde etme olanağı sayesinde orkidelerin yok olma riskinin ortadan kaldırılabilmesi ve üretim yöntemlerinin geliştirilebileceği yönünde bir ışık bulunmaktadır.

Bu çalışmamızın amacı; salep elde edilen orkidelerin önemli bir bölümünün yer aldığı Batı Karadeniz Bölgesi'nde, doğal koşullarda yetişen orkide türlerini belirleyerek bunlarda çoğaltım yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayabilmektir. Bunun için hem doku kültürü yöntemiyle çoğaltma çalışmaları yapılmış; farklı besin ortamı bileşimlerinin değişik orkide türlerinde çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki elde etme üzerindeki etkileri araştırılmış; hem de yumrulara vejetatif yöntemlerle yeni bitkiler elde etmek için deneyler yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Salep veya bilimsel adı ile *Tubera Salep*, yumrulu orkidelerden elde edilmektedir. Eskiden değişik amaçlarla ilaç yapımında kullanılmışsa da, bu kullanımı terk edilen salep günümüzde sadece gıda olarak değerlendirilmektedir. Salebin içerdiği maddeler ve doğadan sökülmesini takiben uygulanan işlemler, bir çok kaynakta benzer biçimlerde anlatılmasına rağmen bunların tamamının esas aldığı kaynağın Sezik (1984) olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle saleple ilgili bazı temel bilgiler bu eserden olduğu gibi alınmıştır: “Orkide yumruları bölge köylerindeki çoban, çocuk veya kadınlar ile işleri salep kazmak olan kişiler tarafından topraktan çıkarılır. Bazı bölgelerde bu iş, kadınlar tarafından yapıldığı için, köyün erkekleri salep veren bitkileri pek tanımaz. Bazen bütün bölge halkı salep kazma işiyle ilgilenmez, bitkileri de tanımaz. Başka bölgelerden gelen köylüler, o bölgenin saleplerini kazıp götürürler. Örneğin Milas civarında salep kazıcıları daha çok Datça'nın dağ köylerinden gelir. Çobanlar ise sürülerini güderken gördükleri orkidelerin yumrularını kazar, torbalarına doldurur sonra satarlar. Salep bölgelerinde, salep ticareti genellikle bakkallar, tiftik veya pamuk ticareti ile uğraşanlar tarafından yapılır. Alıcılar, yumruların büyüklüğü, saflığı veya yaralı (kazılırken herhangi bir yerindeki zedelenme, salebin koyu renkli olmasına sebep olur) olup olmadığı, hatta geldiği bölgeye göre fiyat verirler. Köylüden satın alınan taze yumruların üzerinde bulunabilecek olan toprak ve diğer kirler su ile yıkanarak temizlenir. Bölgelere ve miktara bağlı olarak, yıkama işleminde küçük farklılıklar olabilmektedir. Yıkama esnasında salebe karıştırılan yabancı ve eski yumrular suyun üzerine çıkar ve atılır. Temizlenen yumrular su veya ayran içinde kaynatılır. Kaynatmanın esas sebebi yumruların içsel gelişimini durdurmaktır. Kaynatılmayan yumrulara, baharda enzimatik faaliyet başlar ve dolayısıyla yeni bir orkide meydana gelebilir. Ayrıca kaynatma işlemi yapılmazsa, salebin kendine has aroması teşekkül etmez. Kaynatma işleminde, bölgelere göre bazı farklılıklar vardır. Örneğin Milas bölgesinde bu işlem daha çok salep tüccarları tarafından, büyük miktarların işlenmesi şeklinde yapılır. Temizlenen yumrular sepete konur. Diğer taraftan varil veya büyük kazanlarda su kaynatılır. Su kaynadıktan sonra sepetteki yumrular suyun içine daldırılır, ve tekrar kaynama başlayıncaya kadar sepet su içinde tutulur (yaklaşık 10-15 dakika). Sonra sepet sıcak su içerisinde çıkarılarak soğuk suya daldırılır. Soğuk sudan çıkarılan

yumrular eleklerle yayılır ve tazyikli su ile hem soğutulur hem de yıkanır. Daha sonra betona serilerek, güneşte diş kesmeyecek ve elle kırılmayacak hale gelinceye kadar kurutulur. İşlem genellikle patates haşlar gibi yapılmaktadır. Bir başka yöntemde de tencere veya küçük kaplara yumrular ve su konur, yaklaşık 30 dakika kaynatılır, iyice haşlanınca sıcak su dökülüp, soğuk su ile soğutulur. Sonra da çarşaf veya kilimler üzerine serilerek güneşte kurutulur.”

Sezik (2002), Kastamonu civarındaki salep elde edilişi hakkında da bilgi vermektedir: “Yumrulu orkideler genellikle iki yumru taşır. Bunlardan biri önceki, diğeri ise yeni yıla aittir. Salep elde edilişinde yeni yılın yumrusu kullanılır. Genellikle bitkiler çiçek açtığında veya bazen taban yaprakları belirgin hale gelince, salep toplayıcıları özel çapa ve demir çubuklarla veya diğeri bahçe aletleriyle, bitkinin etrafını kazar, yumruları çıkarır, yeni yumruyu alır, geri kalan kısımları bir kenara atarlar. Kastamonu civarında eski yumru “ebesi”, yenisi ise “iyisi” olarak isimlendirilmektedir. Toprakta çıkarılan yumrular köye getirilir, bol su ile oarak yıkanır ve topraklarından arındırılır. Temizlenmiş yumrular hiçbir işleme tabi tutulmadan veya kaynatılıp, kurutulmadan ilçeye götürülerek salep ticareti yapanlara satılır. İlçeye ulaşımın zor olduğu köylerde ise, kaynatılır, kurutulur ve mevsim sonunda salep ticareti yapanlara satılır”. Araştırmacı Kastamonu civarında salep yumrularının ayran içinde kaynatıldığını; ayran bulunmadığı zaman su veya süt kullanıldığını belirtmektedir. Kaynatılmış yumruları kurutma için Kastamonu, Antalya ve Silifke Saleplerinde yumruların adeta tespih dizir gibi yorgan iğnesi yardımıyla ipe dizildiğini ve öylece güneşe asıldığını da ilave etmektedir.

Piyasada bulunan ticari saleplerin yapısında glikomannanlar (%11-44), nişasta (%8-19), şekerler (%2-3) ve proteik yapıdaki maddeler (%1) bulunur. Etkili madde veya bir başka deyişle salebin kullanılışının sebebi olan madde glikomannanlardır. Bu maddeler su ile (ayran ve süt ile de) şişer ve viskoz bir çözelti meydana getirir. Kalitesi iyi olan bir salep örneği % 40 civarında glikomannan taşır. Bu madde, 3 molekül mannozun 1 molekül glukoz ile β (1-4) bağıyla bağlanıp, polimerleşmesi sonucu meydana gelen heterojen yapıda bir poliholozittir. İşte, içtiğimiz salebe kıvam veya yediğimiz Maraş dondurmasına geç erime ve sertlik sağlayan, salepteki glikomannanlardır. Yapıda

bulunan az miktardaki nişasta da, şişme özelliği dolayısıyla, glikomannanlara yardımcı olur (Sezik 1984).

Ülkemizde doğal olarak bulunan ve salep yapımında kullanılan orkidelerin kimyasal yapısı üzerine yapılan bir çalışmada türlere göre müsilağ ve nişasta oranları belirlenmiştir. Buna göre müsilağı yüksek (%40 ve üzeri) olan türler (*Dactylorhiza romana*, *Orchis anatolica*, *Orchis pinetorum*, *Orchis italica*, *Anacamptis pyramidalis* ve *Serapias vomaracea*) kaliteli bir salep elde edilmesi için tavsiye edilmiştir (Çizelge 2.1) (Sezik 1967).

Çizelge 2.1 Orkide türlerine göre müsilağ ve nişasta oranları (Sezik 1967)

Türler	Müsilağ oranları (%)	Nişasta oranları (%)
<i>Dactylorhiza romana</i>	61.05	0.45
<i>Orchis anatolica</i>	57.04	2.75
<i>Orchis pinetorum</i>	50.11	0.69
<i>Orchis italica</i>	49.36	1.25
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	44.72	5.94
<i>Serapias vomaracea</i>	40.56	1.35
<i>Orchis laxiflora</i>	33.61	1.07
<i>Orchis morio</i>	32.11	25.04
<i>Orchis simia</i>	29.89	1.71
<i>Orchis tridentata</i>	24.50	36.04
<i>Himantoglossum longibracteatum</i>	20.95	10.99
<i>Orchis sancta</i>	15.70	10.64
<i>Ophrys fuciflora</i>	9.60	18.78
<i>Ophrys fusca</i>	6.82	12.77

Ülkemizde bulunan saleplerden bazılarının kimyasal özellikleri ve kalitesi Sezik (1967) tarafından yapılan bir araştırma ile tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 2.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 Ticari saleplerin müsilaaj ve nişasta oranları

Salep cinsi	Müsilaaj oranı (%)	Nişasta oranı (%)
Antalya	40.12	8.40
Kastamonu	39.88	13.86
Maraş	11.62	19.13
Muğla	44.04	13.04
Silifke	41.02	17.70
Van	17.69	17.77

Ticari salepler, o bölgede bulunan değişik orkide yumrularının karışımıdır. Genellikle o bölgede yaygın olarak bulunan orkidenin yumrusu, bu karışımda daha çok bulunur. Salep karışımlarının veya daha doğru deyişle ticari saleplerin görünüşleri genellikle birbirine benzer. Fakat dikkatle incelendiğinde aralarında makroskopik farklılıklar bulunduğu görülür. Örneğin Van Salebi parçalı yumrulardan meydana gelmiştir. Maraş Salebinde ise parçalı yumrular azdır, buna karşılık, diğer saleplerde rastlanmayan büyüklükte, iri yumrular bulunur. Kastamonu Salebi ise orta büyüklükteki yumruların bir karışımıdır. Genellikle ipe dizilmiş, bazen dizilmemiş olarak piyasaya çıkarılır. Karışımda rastlanan parçalı yumrular küçüktür ve “lale” adı verilir. Muğla Salebi ise küçük yumrulardan meydana gelmiştir ve ipe dizilmemiş olarak bulunur. Silifke Salebinin küçük yumruları, genellikle ipe geçirilmemiştir. Antalya Salebi ise ipe geçirilmiş olarak taşınır (Sezik 1984). Antalya ve Silifke Salepleri ise daha çok *Orchis anatolica*'dan elde edilmektedir.

Kastamonu, Adıyaman, Malatya, Maraş civarında *Dactylorhiza iberica* yumruları toplanır, salep elde edilişindeki işlemlere tabi tutulur ve “Çayır Salebi” adı verilen bir salep elde edilir. Bu tür, ince uzun yumrularıyla kolaylıkla diğerlerinden ayrılır. Ancak glikomannan taşımadığından salep gibi kullanılsa da, salebi tağşiş (katıştırma) etmede kullanılmaktadır (Sezik ve Baykal 1988).

Salep, yumrulu orkidelerden elde edilmesine karşın tüm yumrulu cinsler bu amaç için uygun değildir. Daha çok *Orchis*, *Anacamptis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Himantoglossum*, *Barlia* gibi ovoit yumrulu olanlarla, *Dactylorhiza* gibi parçalı yumruya sahip orkidelerin

değişik türleri salep elde edilmesinde kullanılır. *Platanthera* türlerinden de bazı bölgelerde salep elde edildiğine dair bilgiler bulunmaktadır. Diğer yumrulu cinsler ise salep elde edilişinde kullanılmaz (Sezik 1984).

Sezik ve Özer (1983) tarafından yapılan bir araştırmada, Batı Karadeniz Bölgesi'nde salep elde edilmesinde kullanılan türler tespit edilmiş olup, Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3 Kastamonu salebinin elde edildiği türler

Bölge	Türler
Araç	<i>O.mascula ssp.pinetorum</i> , <i>Dactylorhiza romana</i> , <i>O.purpurea</i>
Devrekani	<i>O.mascula ssp.pinetorum</i> , <i>O.purpurea</i> , <i>O.simia</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i> , <i>O.tridentata</i>
Daday	<i>O.mascula ssp.pinetorum</i> , <i>Dactylorhiza romana</i> , <i>O.purpurea</i> , <i>O.simia</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i> , <i>O.tridentata</i>
Azdavay	<i>O.mascula ssp.pinetorum</i> , <i>Dactylorhiza romana</i> , <i>O.purpurea</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i> , <i>O.pallens</i>
Taşköprü	<i>O.mascula ssp.pinetorum</i> , <i>Dactylorhiza romana</i> , <i>O.purpurea</i>
İlgaz	<i>O.mascula ssp.pinetorum</i> , <i>Dactylorhiza romana</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i> , <i>O.pallens</i>

Yumru, kök ya da rizoma sahip olan karasal orkidelerde, her bitki genellikle iki yumru taşımaktadır. Kış mevsimini bir önceki sene meydana gelen yumrunun aracılığıyla geçiren bitkinin, bahara doğru ek köklerinden biri kalınlaşmaya başlamakta ve uç kısmında bitkinin ikinci yumrusu meydana gelmektedir. Bu yumru gelişirken, diğer taraftan yukarı doğru da bir tomurcuk aracılığıyla yeni yılın gövdesi meydana gelmektedir. Bitkinin gelişmesi ilerledikçe yeni yumru da oluşmakta ve eski yumru buruşarak, yeni yumrunun yanında ona yapışık ve içi boşalmış halde kalmaktadır. Eski yumru, yeni yumru ve yeni bitkiyi meydana getirmektedir (Sezik 1984). Salebin elde edildiği ticari değeri olan orkidelerin tohumlarının son derece küçük olması ve endosperm bulundurmaması nedeniyle çimlenmek için mikorhizal funguslarla enfekte olmaya ihtiyaç duymasının; üretimdeki temel güçlük olduğundan daha önce de bahsedilmişti. Orkide plantasyonlarının doğal ortamlarda oluşturulması veya geliştirilmesi amacıyla mikorhizalardan yararlanma yoluna gidilmesi, başvurulabilecek yollardan biri gibi görünmektedir.

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

Orkide çoğaltımında simbiyotik çimlenmenin teşvik edilmesi, 1922 yılına kadar bilinen tek yöntemdi. Ayrıca bu yöntemin uygulamasının çok da kolay olmadığı açıktı. Simbiyotik tohum çimlendirme yöntemi, Avusturalya’da; Avrupa’da (Smreciu and Currah 1989) ve Kuzey Amerika’da (Zettler 1994, Zettler and McInnis 1993) karasal orkidelerin çimlendirilmesinde kullanılmıştır. Ancak bu yöntem her zaman etkili olmadığı gibi denenen bütün türlerde başarılı olmamıştır (Watkinson 2002).

Karasal orkidelerin yaşam döngülerini gerçekleştirmeleri için funguslarla ortaklaşa yaşam ihtiyacı içinde olmayabilecekleri durumu, 1922 yılında Knudson adlı araştırmacının çalışmaları ortaya çıkartmıştır. Knudson (1922), fungus olmadan da orkide tohumlarının mineral ve şeker içeren basit bir besin ortamında çimlenebildiğini göstermiştir. Fungus, orkide bitkilerinin genç gelişme döneminden (juvenile phase) sonraki gelişme evrelerinde çok küçük bir öneme sahiptir. Çünkü bitki çimlenip geliştikten sonra artık fotosentetik ototrof beslenme yeteneğine kavuşur (Withner 1974).

Knudson’un bu yıllarda yapmış olduğu araştırmalar; özellikle *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum* ve diğer pek çok orkidinin *in vitro* koşullarda asimbiyotik olarak çimlendirilebileceğini gösterdiği çalışmaları, orkide dünyasında şok etkisi yaratmıştır (Pierik 1981). Bu ilk bulgulardan sonra, değişik orkide cins ve türlerinde en iyi çimlendirme olanağını sağlayan çok çeşitli besin ortamı kompozisyonları ortaya konmuştur (Arditti 1967, 1982; Fast 1980, Arditti and Ernst 1982).

Orkide tohumlarının çimlenmesi için genel olarak karanlık koşulların uygun olduğunu; ancak bazı orkide türlerinde ışıklandırma ve fotoperiyodik koşullara ihtiyaç duyulduğunu, bazı türlerin ise ışık ve karanlıkta aynı düzeyde çimlenebildiğini gösteren Arditti

(1967), aynı zamanda orkide tohumlarının çimlendirilmesiyle ilgili bazı kronolojik bilgiler de vermiştir. Buna göre ilk kez orkide tohumlarının mikorhizal funguslarla birlikte simbiyotik olarak laboratuvar koşullarında 1899 yılında Noel Bernard isimli bir araştırmacı tarafından çimlendirildiği bildirilmiştir. Ayrıca Knudson'un orkide tohumlarının çimlendirilmesindeki başarısı vurgulanmakta; 1950 yılında *Vanilla* türünde basit bir mineral+şeker karışımında asimbiyotik çimlendirme başarısı nedeniyle bu alanda yeni bir dönem başlattığına dikkat çekilmektedir.

Yabani Avrupa orkidelerinin (*Orhis laxiflora* Lamk. ve *Ophrys sphegodes* Mill) çimlenme ve gelişiminde endofitik mantarların rolü, tam anlamıyla asimbiyotik ortam üzerinde denenmiştir. Amonyum nitrat içeren temel besin ortamına sakaroz, organik azot ve vitaminler ilave edildiğinde iki orkide türü arasındaki küçük farklara rağmen her ikisinde de iyi bir gelişim elde edilmiştir. Vitamin testlerinde ise *Orchis laxiflora* için thiamin'in gerekli olduğu belirlenmiştir. Mikorhizal fungus ilavesi *in vitro* koşullardaki çimlenmeyi olumlu etkilemiştir (Mead and Bulard 1975).

Başta tropikal orkideler olmak üzere çok sayıdaki orkide türünde tohumların çimlenmesi üzerine farklı besin ortamlarının, büyüme düzenleyicilerinin, besin ortamlarının fiziksel özelliklerinin etkileri araştırılmıştır (Olivia and Arditti 1984, Jong and Sin 1985, Singh and Prakash 1985).

Das and Goshall (1989), Bengal vadisinde yetişen bazı orkidelerin olgun tohumlarının *in vitro*'da 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*'un 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 *et al.* (1990), *Dendrobium* cinsine ait bazı Kuzeydoğu Hindistan orkide türlerinin tohumlarını *in vitro* koşullarda çimlendirmek amacıyla çalışmalar yapmıştır. Bu kapsamda, *D. moschatum*, *D. farmeri*, *D. fimbriatum* var. *oculatum* ve *D. primulinum* türlerine ait tohumlar 4 farklı ortama (Vacin and Went, Burgeff, Nitsch and Nitsch ve Knudson C) ekilmiştir. Çimlenme oranı, *D. farmeri* ve *D. primulinum* türleri için Vacin and Went ortamında; diğer iki tür için ise Nitsch and Nitsch ortamında %50-60 değerleri ile diğer ortamlardan daha yüksek olmuştur. Bir sonraki aşamada, aynı türlerin tohumlarının çimlendirilmesi amacıyla Vacin and Went ve Nitsch and Nitsch ortamlarına değişik katkı maddeleri ilave edilmiştir. Vacin and Went ortamına %15 hindistancevizi sütü + %5 muz ekstratı + %5 ananas suyu eklendiğinde çimlenme artmış, *D. farmeri* ve *D. primulinum*'da fidelerin yaprak ve kök gelişimi hızlanmıştır. Benzer tepkiler Nitsch and Nitsch ortamına %15 hindistancevizi sütü + 1mg/l NAA eklendiğinde *D. fimbriatum* var. *oculatum* türünden de elde edilmiştir.

Sharma and 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 D-glukoz 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.

Tropikal orkidelerle ilgili yapılan doku kültürü çalışmalarına ait literatürden verilen birkaç örneğin dışında zorunlu görülmedikçe başka kaynak kullanılmamıştır. Tropikal orkidelerin doku kültürüyle çoğaltılmasına ilişkin Ege Üniversitesi'nde tamamlanmış bir doktora çalışması bulunmakta olup ihtiyaç duyulması halinde detaylı bilgilere Yararbaş (2008)'tan ulaşılması mümkündür.

Pierik (1987), orkidelerin *in vitro* çimlendirilmesinin avantajlarını açıklayan birçok yazarın görüş ve düşüncelerini özetleyerek, aşağıdaki şekilde maddeler halinde açıklamaktadır:

1. Orkide tohumları çok küçüktür ve besin deposuna (endosperm) ya sahip değildir ya da çok küçük bir birikimi bulunmaktadır. Bu tohumların çok ufak olması, *in vivo* ekimlerinde çoğunun kaybolmasına veya sınırlı besin maddesinin hayatta kalma konusunda yetersiz kalmasına neden olmaktadır. *In vitro* koşullarda çimlenme çok daha başarılıdır.
2. Çimlenmede ve fidenin daha sonraki gelişme aşamalarında fungus ile birlikte sürdürülen simbiyotik yaşamın olumlu etkileri bulunmaktadır. Ancak, besin ortamı kullanılmasıyla birlikte fungusa olan ihtiyaç tamamen ortadan kalkar, buna da asimbiyotik çimlenme adı verilir.
3. Bazı özel amaçlı melezlemeler sonucunda elde edilen sınırlı sayıdaki tohumun uygun bir besin ortamında tamamını çimlendirmek mümkün olabilmektedir. Böylece ıslah materyalinin çimlenme oranı ve bitki elde etme oranını artırmak *in vitro* çimlenme sayesinde mümkün olabilmektedir.
4. *In vitro* koşullarda çimlendirme, olgunlaşmamış embriyoların besin ortamına ekilmesiyle de sağlanabilmektedir. Bu sayede ıslah çemberinin kısaltılması ve ıslah programlarında süre kazancı sağlanabilmektedir.
5. *In vitro* koşullarda çimlenme ve büyüme çok daha çabuk olmaktadır, çünkü koşullar tamamen kontrollüdür, ayrıca funguslarla ve bakterilerle bir yarış ve hayatta kalma mücadelesi bulunmamaktadır.

Arditti (1967), Harley (1969) ve Pierik *et al.* (1982; 1983)'a göre orkide tohumlarının çimlenmesi aşağıdaki şekilde gerçekleşmektedir: Tohum kabuğundan (testa) geçen suya ulaşan embriyo bu suyu emer ve şişer. Hücre bölünmelerini takiben embriyo, tohum kabuğunu kırarak dışarı çıkar. Protokorm benzeri yapı, hücre yığınının oluşur ve bu yapının üzerinde sürgün meristemi ayırt edilebilir. Organ farklılaşması başlar başlamaz, artık bu ilk gelişme aşaması olarak değerlendirilebilir (Bir yanda sürgün meristemi ve tam karşısında diğer yanda rhizoid oluşumu). Protokormlar ışık aldıklarında yeşerirler ve bununla birlikte yaprak oluşumuna başlarlar. Klorofil oluşumu ile birlikte artık bitki

ototrof yaşama başlamıştır, bunun ardından ilk gerçek kökler meydana gelir; protokorm yapısı ve tüylü kökler (rhizoid) kaybolur.

Orkide türlerinin tohumlarını *in vitro* koşullarda çimlendirme konusunda çok sayıda araştırma bilinmektedir. Bu araştırmalar çok farklı türlere ait geniş bir yelpazeye ait sonuçları içermektedir. Tür değiştikçe, kullanılan besin ortamı bileşimleri ve yapılan uygulamalarda da sayısız varyasyonlarla karşılaşmaktadır. Bu nedenle literatürde yapılan incelemelerin sonuçları, çalışmaların yayın yılı esas alınarak sıralanmış, başka bir gruplandırma yapılmamıştır.

23 adet Batı Avrupa orkidesinde *in vitro* koşullarda tohum çimlendirmesi üzerinde çalışan Van Waes and Debergh (1986); çimlenme oranı üzerine etki eden bazı faktörler hakkında bilgi edinmiş ve bunları paylaşmıştır. Çimlenmede tohum kabuğunun engelleyici bir etkisinin bulunduğu bahseden araştırmacılar; sterilizasyonda kullanılan kalsiyum hipoklorit+Tween-80 karışımının ne kadar süreyle uygulandığının, çimlenme üzerinde etkisinin bulunduğunu belirtmektedirler. Sert kabuklu türlerde sterilizasyon uygulamasının daha uzun süre tutulması, tohum kabuğunu aşındırmakta ve çimlenmeyi olumlu yönde etkileyebilmektedir. Besin ortamındaki azot kaynağının varlığı veya yokluğunun etkisi tamamen türlere bağlı olarak değişmiştir. 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 (Van Waes and Debergh 1986).

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.

Tay *et al.* (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. En yüksek çimlenme oranı Norstog besin ortamında, 6 hafta veya daha fazla karanlıkta bekletilen kültürlerden 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.

Barroso *et al.* (1990), *Ophrys lutea* ve *Ophrys fusca* türlerinin olgun ve olgunlaşmamış tohumlarını değiştirilmiş Curtis ortamında çimlendirmişlerdir. Tohum ekiminden 2 ay sonra elde edilen protokormlar, orkide kültür ortamı (OCM 4)'na transfer edildikten sonra 2 ay içerisinde protokorm benzeri yeni dokular ile bir miktar bitkicik geliştiren birçok küçük protokormlar oluşmuştur. Bu dokular taze OCM 4 ortamına transfer edildikten ve bölündükten sonra üretim için kullanılmıştır. Taze ortamlara aktardıktan 2 ay sonra yaklaşık 5 cm yüksekliğinde köklü bitkicikler elde edilmiştir. Bu bitkicikler başarılı bir şekilde toprağa transfer edilmiştir. *Ophrys lutea* ve *Ophrys speculum* türlerinde değiştirilmiş OCM ortamı kullanılarak yavru yumrular üretilmiştir. Bu yavru yumrular doğal olarak oluşmuş yumruların tipik morfolojik ve anatomik karakteristiklerini göstermiştir.

Rasmussen *et al.* (1990), *Dactylorhiza majalis*'in *in vitro* koşullarda, mikorizalı ve mikorizasız çimlenmesi ve fide gelişiminin, değişik sıcaklıklardaki durumunu araştırmıştır. *Rhizoctonia*'nın varlığında *D. majalis* tohumlarının *in vitro*'da çimlenmesi ve gelişmesi sıcaklıkla çok yakın bir ilişkide seyretmiştir. 23-25°C sıcaklıklarda

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*'nın 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 *et al.*, 1991 yılında *Listera ovata* türünün olgunlaşmamış embriyoları ve tohumlarının simbiyotik *in vitro* kültürünü çalışmışlar ve *L.ovata*'nın tohumları kadar olgunlaşmamış embriyolarının da simbiyotik bir fungus (*Epulorhiza* sp.) ile başarılı bir şekilde inokule edilebildiğini göstermişlerdir. Çalışmada bütün safhalarda embriyolardan simbiyotik protokormlar geliştirilmiş 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. Genellikle olgunlaşmamış embriyoların inokulasyonu, zor çimlenen orkide türlerinin üretimi ve fungus uygunluk testi için uygulanabilir bir yöntem olarak görülmüştür.

Özkoç (1991), *Serapias vomeracea* subsp.*laxiflora* ve *Orchis laxiflora*'nın simbiyotik ve asimbiyotik olarak çimlenmesini incelediği doktora çalışmasında, bazı katkı maddeleri ilave edilmiş yulaf ortamının simbiyotik kültürler için en uygun ortam olduğunu belirtmiştir. *Serapias vomeracea* subsp.*laxiflora* tohumlarının VWD-N ortamından ve %10 çamaşır suyu+30 dakika sterilizasyon uygulamasında en yüksek çimlenme (%21.7); %20 çamaşır suyu+ 5 dakika sterilizasyon uygulamasında %50.03; %30+10 dakika uygulamasında %25.4 çimlenme elde edildiğini belirlemiştir. Fungal izolatlarla yulaf ortamında yapılan çimlendirmede en iyi çimlenme oranı %30.6; modifiye yulaf ortamında ise %9.1 bulunmuştur. *In vitro* çimlendirme çalışmalarında MS, Knudson ve VWD ortamlarının modifikasyonları arasında en yüksek çimlenme oranı inorganik azot içermeyenlerden alınmıştır. Bu ortamlarda çimlenme iyiyken, protokormlarda epidermal tüy gelişmemiştir. En iyi sonuç MS-N ortamında %53.8

çimlenme olarak tespit edilmiştir. *Orchis laxiflora* ile yapılan çalışmada ise %30'luk çamaşır suyunda 15 dakikalık sterilizasyon yapılmış ve VWD-N ortamında %13.4 çimlenme elde edilmiştir.

Pedroso and Pais (1992) süspansiyon kültüründe *Orchis papilionaceae*'nin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış tohumlarından yavru yumru üretimi için yaptıkları çalışmada; tohumları değiştirilmiş 2 kuvvetindeki Curtis ortamında kültüre almışlar ve yavru yumrular elde etmişlerdir. Katı ve likit ortamların her ikisinde de olgun tohumların çimlenmesi ve protokorm oluşumu düşük olmuştur. Süspansiyon kültüründe olgunlaşmamış tohumların çimlenme oranı %9'dan %33'e çıkmıştır. Süspansiyon kültüründe ışık altında yavru yumrular protokormlardan elde edilirken, katı ortamda kalluslardan gelişmiştir. Süspansiyon kültüründe ekimden bir hafta sonra olgunlaşmamış tohumlara 30s süreyle ultrason uygulaması, kültürü hızlandırmış, aynı zamanda da çimlenmeyi ve yavru yumru üretimini artırmıştır. Yavru yumrular normal gelişimleri için katı ortamlara transfer edilmiştir. Katı fazlı ortamda kültüre alınan olgunlaşmış tohumlarda, kültürün 2. ayına kadar embriyo hacminde %41-73 oranında önemli bir artış olmasına rağmen çimlenme olmamıştır. Kültürün 5. ayında karanlık koşullarda %9.38, aydınlık koşullarda %10.1 oranında çimlenme meydana gelmiştir. Çimlenme homojen olmamış ve bir yıl boyunca devam etmiştir. Olgun tohumların çimlenmesi süspansiyon kültüründe katı fazlı ortama göre bir miktar daha fazla olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak önemli görülmemiştir. Bütün kültür koşullarında çimlenmenin testa engellemesine bağlı olarak değiştiği ortaya çıkmıştır. Embriyolar tümüyle testadan arındırıldığında çimlenme yüzdesi %100'e kadar çıkmıştır. Yavru yumrular yalnızca aydınlık koşullardaki süspansiyon kültüründe üretilmiş ve karanlık koşullara alındığında ise gelişme olmamıştır.

Epipactis palustris'in de aralarında olduğu bazı karasal orkide türlerinin *in vitro* koşullarda çimlenmesi ve kültüre çok güçtür. Doğal koşullarda orkidelerin çimlenmesini gözleme ve çimlenmenin aşamalarını izleme olanağı çok azdır. Bunu anlayabilmek amacıyla bir fungus izolatıyla birlikte *in vitro* kültüre alınmış veya diğer bazı uygulamalar yapılmıştır. (Rasmussen and Rasmussen 1992) Simbiyotik koşullarda çimlenme başarılı olmuş, ancak diğer uygulamalar başarılı bulunmamıştır (kalsiyum

hipoklorit ile testa skarifikasyonu, birkaç hafta 20°C’de inkubasyon veya 8-12 hafta 4-8 °C’de tutma gibi). Araştırmanın sonucunda genel bir bulgu olarak söylenebilecek şey; tohumlar olgunlaştıktan sonra bir süre soğuklatılabileceği ve tohum kabuğunun bir miktar dekompoze edilebileceği, bu uygulamaların çimlenmeyi teşvik edebileceğidir.

Özkoç ve Dalcı (1993) ise *Orchis laxiflora* tohumlarının iki farklı ortamda çimlenmesi ve gelişmesi üzerine bazı fungusların etkisini araştırmış ve farklı ülkelerden temin edilen 11 mikorizal fungal izolatu 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 izolatu ise etkisiz bulunmuştur.

Beyrle and Smith (1993), *Orchis morio* türü orkidenin tohumlarını *in vitro* çimlendirmeye almışlar, fakat aynı zamanda simbiyotik çimlenme olabilmesi için mikorhiza mantarları da ilave etmişlerdir. Simbiyotik çimlenme, sıvı besin ortamı içinde çalkalanan *O.morio* tohumlarında başarıyla gerçekleşmiş, protokorm oluşumu, kök ve yaprakların oluşumu 6 hafta içerisinde hızla tamamlanmıştır. Gün ışığında protokormlar klorofil oluşturarak yeşillenmiştir. Besin ortamına %1 oranında nişasta veya sakaroz eklenmesiyle daha uzun kökler oluşmuş, buna karşılık ışığın teşvik ettiği klorofil oluşumunda azalma ortaya çıkmıştır. Makalede, orkide mikorhizalarının orkide hayat döngüsündeki ana işlevinin; hazır karbonhidrat kaynağı olarak bitkiye olanak sunması olduğu tartışılmaktadır. Mikorhizal fungusların karbonhidrat havuzundan heterotrofik olarak beslenen orkidelerin bu yüzden gelişmelerinin daha güçlü ve çabuk olabileceği anlatılmaktadır. *In vitro* koşullarda simbiyotik çimlenme üzerinde başka orkide türlerinde ve değişik araştırmacılar tarafından yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Rasmussen *et al.* 1990; Rasmussen and Rasmussen 1992; Zettler and McInnis 1992; Zettler and McInnis 1994; Beyrle *et al.* 1995; Jorgensen 1995; Zettler and Hofer 1998; Zettler *et al.* 2000; Zettler *et al.* 2001; Kulikov and Filippov 2001; Sharma *et al.* 2003). Bundan başka *ex vitro*’da simbiyotik çimlenmenin sağlanması amacıyla çeşitli mikorhiza fungusu uygulamaları da yapılmıştır (Quay *et al.* 1995). Andronova (2003)’nın çalışmaları da *Dactylorhiza maculata* tohumlarının *in situ* çimlendirilmesi üzerinedir.

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 suyundan 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.

Cypripedium acaule türüne ait olgun tohumlar asimbiyotik koşullarda çimlenememektedir. Lauzer *et al.* (1994), bu 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.

Aytaş (1994), *Ophrys apifera* ve *Ophrys sphegodes*'in köklerinden elde edilen ve yurtdışından getirilen fungal izolatlarla çimlendirme denemeleri yapmış; 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'luk 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* türlerinden fungus izolasyonu yaparak simbiyotik ve asimbiyotik kültür ortamlarında çimlenme ve gelişme üzerine bir araştırma yapmıştır. Çalışmanın sonucunda simbiyotik kültür çalışmalarında iki türün köklerinden izole edilen fungal izolatların etkililik derecelerinin kültür ortamının besinsel içeriğine göre değişebileceğini ortaya koymuştur. Asimbiyotik çimlendirme çalışmalarında ise seyreltik ve konsantre kültür ortamlarını kullanarak seyreltik kültür ortamına eklenen şekerin çimlenme üzerine olumsuz etki yaptığını belirlemiştir. Konsantre Van Waes&Debergh kültür ortamı ve bu ortamın modifiye edilmesi ile hazırlanan ortamlarda şeker ve inorganik azotun fide gelişimi için gerekli olduğu belirlenmiştir.

Yine Özkoç and Dalcı 1994'te *Orchis laxiflora* tohumlarının asimbiyotik kültür şartlarında çimlenmesi üzerine bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada bu türe ait tohumlar seyreltik ve konsantre kültür ortamlarına steril koşullarda ekilerek çimlenme durumları belirlenmiştir. Bu türe ait tohumlar hem seyreltik hem de konsantre kültür ortamlarında genellikle çimlenmiş; fakat gelişme ve bitkiye dönüşüm sadece konsantre ortamlarda devam etmiştir. Ayrıca kültür ortamlarından inorganik azotun çıkarılması genel olarak çimlenmeyi artırmıştır. Bu çalışmada en yüksek çimlenme oranı (%25.1) inorganik azot ihtiva etmeyen Knudson C ortamından elde edilmiştir.

Özavcı (1995), "Kahramanmaraş Bölgesinde Doğal Yayılış Gösteren Bazı Salep Orkidelerinin *In vitro*'da Yumru Oluşturma Yeteneklerinin Oluşturulması" isimli çalışmasında, Kahramanmaraş'ta doğal yayılış gösteren orkide türlerinde embriyo kültürü kullanarak *in vitro*'da yumru oluşturma yeteneklerini araştırmıştır. Bu çalışmada *in vitro* koşullarda *Orchis coriophora* ve *Orchis anatolica* türlerinde yumru elde edilmiştir. Denemelerde kullanılan 22 ortamdan *Orchis coriophora* için Van Waes&Debergh-domates ekstraktı+aktif karbon ortamının, *Orchis anatolica* için Van Waes&Debergh ortamı en iyi çimlenme ortamı olarak belirlenmiştir.

Vakkasoğlu (1995), “Orkidelerde mikorhizal fungusların orkide tohumlarının çimlenmesi ve büyümeleri üzerine etkisi” isimli çalışmasında, Doğu Akdeniz Bölgesi’ndeki salep orkidelerinde mikorhizal fungusların izolasyonunu ve bu fungusların salep tohumlarının çimlenmesi ve gelişimi üzerine etkisini belirlemeyi amaçlamıştır. Çalışmanın sonucunda *Ophrys vernixia*, *Orchis coriophora* tohumları *Rhizoctonia solani*’nin varlığında fide oluşturmuş; *Orchis anatolica*’dan ise sadece protokorm elde edilebilmiştir.

Bhaskar and Rajeevan (1996), Vanda tipi tropikal orkide çeşidi 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.

Vejsadova and Mala (1996), Çek Cumhuriyeti’nin Sumava ve Ceska Lipa bölgelerinden topladıkları sekiz değişik orkide türüne ait (*Orchis morio*, *Gymnadenia conopsea*, *Dactylorhiza longibracteata*, *Liparis loeselii*, *Dactylorhiza bohemica*, *D. incarnata*, *Epipactis palustris* ve *D. maculata*) tohumları %10’luk sodyum hipoklorit veya %7’lik kalsiyum hipoklorit + %70 etil alkol çözeltisinde yüzeysel sterilizasyonu tabi tuttuktan sonra üç farklı ortama ekmişlerdir. 18-22°C’de ve karanlıkta 4 ve 8 hafta sonra çimlenme oranlarını değerlendirmişlerdir. Tohum olgunluğu özelliğinin çimlenme üzerinde bir etkisi bulunmamıştır. Yüzeysel sterilizasyon olgunlaşmamış ve tam olgun tohumlarda çimlenmeyi olumlu etkilemiştir. Kullanılan maddeler arasında türlere ve besin ortamına göre değişen farklılıklar bulunmuş, yani parametreler arasında interaksiyon belirlenmiştir.

Miyoshi and Mii (1997), *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.

Çağlayan vd. (1998), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetişen salep orkidelerinde *in vitro* çoğaltım yapma konusunda çalışmışlardır. *Orchis anatolica*, *Orchis coriophora*, *Ophrys bornmuelleri*, *Ophrys phrygia*, *Serapias vomeracea* ve *Himantoglossum affine* türlerine ait embriyolar (tohumlar), *in vitro*'da 14 farklı besin ortamında kültüre alınmıştır. En yüksek çimlenme oranı ve protokormlardan bitki oluşum oranı %2.39 ve %1.86 ile Van Waes&Debergh + domates ekstaktı + aktif karbon ortamından elde edilmiştir. *In vitro*'da en yüksek yumru oluşum oranı %2.45 ile aynı ortamda bulunmuştur.

Önal (1999) tarafından yapılan bir araştırmada *Orchis*, *Ophrys*, *Dactylorhiza*, *Serapias*, *Aceras*, *Anacamptis* cinsine ait toplam 21 orkide türü Ege Bölgesi'nden toplanmıştır. *Orchis laxiflora*, *Orchis sancta* ve *Serapias vomeracea* embriyo kültürü ile başarılı bir şekilde üretilmiş, fakat diğer türler üretilenmemiştir. *Orchis laxiflora* ve *Orchis sancta* türleri için “5°C’de ve karanlık koşullarda” yumru oluşturma oranı, normal koşullardan (25°C, 16h ışık) daha yüksek olmuştur. Aynı türler için toprağa optimum transfer zamanı Ağustos ayı olmuş, ilkbaharda gelişen bitki yüzdesi ise düşük kalmıştır. En yüksek çimlenme yüzdesi *Orchis laxiflora* türünde %80 ile Knudson C+ %10 patates ekstraktından; *Orchis sancta*'da %100 ile yine aynı ortamdan ve *Serapias vomeracea*'de ise %40 ile Knudson C+ %10-20 muz ekstraktından elde edilmiştir. En yüksek “mg tohum” başına gelişen bitki sayısı ise, *Orchis laxiflora*'da 46.7 adet ile Knudson C+%10 Hindistan cevizi sütü; *Orchis sancta*'da 49.5 adet ile KC+ %20 patates ekstraktı ve *Serapias vomeracea*'de ise 37.0 adet ile Van Waes&Debergh+0.2mg/l GA₃ besin ortamından elde edilmiştir.

Sushmita-Bhattacharjee *et al.* (1999), *Phalaenopsis* hibrit tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlenmesi ve bitki elde edilmesi üzerinde çalışmışlar, bu amaçla MS, Rosa and Laneri ve Knudson C besin ortamlarını denemelerde kullanmışlardır. Tohum ekiminden itibaren çimlenmeye kadar geçen gün sayısı, fide büyümesi ve gelişimi

kaydedilmiştir. En hızlı tohum çimlenmesi ve fide gelişimi Rosa and Laneri ortamında meydana gelmiş, bunu MS ortamı izlemiştir.

Orkide tohumlarının çok narin ve besin deposundan yoksun embriyolara sahip olduğu Szendrak and Read (2000) tarafından da ifade edilmekte, bu nedenle 52 değişik orta kuşak karasal orkide türünde *in vitro* çimlendirme üzerinde çalışıldığı anlatılmaktadır. Besin ortamı olarak bu türlerin kültürü için değiştirilmiş Fast ortamı kullanılmıştır. Kùltürler 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 kùltürler 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 mikroskobu preparatlarıyla incelenmiştir. İlk görülebilen farklılık, kùltüre 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.

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. Araştırmacı funguslarla ilgili propagül boyutu, biyoformasyon gibi konularda da detaylı çalışmalar yapmıştır.

Avrupa’da bulunan nesli tehlike altında olan bazı seçilmiş karasal orkide türlerinde doku kültürü yoluyla çoğaltım yapılması konusunda Polonyalı araştırmacılar (Pindel and Pindel 2004) 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 çoğaltımın ilk kuruluş aşaması 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 *et al.* (2004), Yunanistan’dan toplanan ve çoğu bu ülke için endemik olan 13 değişik *Ophrys* türünde (*O. apifera*, *O. attica*, *O. cornuta*, *O. delphinensis*, *O. ferrum-equinum*, *O. lutea*, *O. mammosa*, *O. speculum*, *O. spruneri*, *O. umbilicata*, *O. argolica*, *O. iricolor* ve *O. tenthredinifera*) *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 interaksyonlar, kallus veya protokorm oluşumu üzerine istatistiksel olarak önemli düzeyde etki yapmıştır.

Sazak (2004); *Spiranthes spiralis*, *Dactylorhiza romana* subsp. *romana* tohumlarının simbiyotik ve asimbiyotik şartlarda çimlenme ve gelişmesini incelemiştir. Çalışmanın sonucunda en iyi çimlenme ve gelişme için yüzeysel sterilizasyon solüsyonunun konsatrasyonu ve uygulama zamanının, orkide türlerine göre değiştiğini belirlemiştir. Simbiyotik kültür çalışmalarında farklı fungal izolatların *Spiranthes spiralis* ve *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine etkilerini araştırmıştır. Çalışmanın sonucunda *Spiranthes spiralis* tohumlarının çimlenmesinde en etkili izolatın fosm1 olduğu, *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* tohumlarının çimlenmesinde ise 624 kodlu izolatın etkide bulunduğu belirtilmiştir. Araştırmacı, asimbiyotik kültür çalışmaları sonucunda, inorganik azotun *Spiranthes spiralis* türüne ait tohumlarda çimlenme oranını artırdığını, *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* türüne ait tohumlarda ise çimlenme oranını azaltıcı etki yaptığını ortaya koymuştur. Her iki türe ait tohumlarda inorganik azotun fide gelişimi için gerekli olduğu da belirtilmektedir.

Vejsadova (2006), orkide tohumlarının çimlenme oranlarını artırmak amacıyla sterilizasyonda kullanılan maddenin dozu ve süresiyle ilgili çalışan bir başka araştırmacıdır. Nesli tehlike atında 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.

Pedroza-Manrique and 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 μ M); 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 μ M 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 and 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 μ M 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-h’lik fotoperiyodisite olumlu bulunmuştur.

Andronova and Ivashenko (2007), *Dactylorhiza maculata* türüne ait bir popülasyondaki 12 adet bitkiden tohumları ayrı ayrı almış ve bunlarda çimlendirme denemeleri kurmuştur. Genotipler arasında yüksek düzeyde heterojenite, hem çimlenme hem de bitki gelişim bakımından ortaya çıkmıştır. 13 ve 18 aylık olan bitkilerin bir kısmı laboratuvar koşullarında, bir kısmı da doğal koşullarda toprağa aktarılmış ve bunların canlılık oranlarına bakılmıştır. Laboratuvar ortamında dış koşullara alıştırılanlarda sırasıyla %45 ve %83 canlılık oranı belirlendiği halde; doğal koşullara transfer edilen 13 aylık bitkiler %8 oranında, 18 aylık bitkiler ise %30 oranında canlılıklarını sürdürmüşlerdir.

In vitro koşullarda *Dactylorhiza* türlerinin kök ve sürgün gelişimi üzerine büyümeyi düzenleyiciler ve şekerlerin etkisi araştırılmıştır. Fide gelişimi 10g/dm³ sakaroz ve glukoz uygulaması ile uyarılmıştır. N-6 adenin veya N-6-benzyladenine ve bunların IBA ile kombinasyonları sürgün uzunluğunu ve gelişim oranını artırmıştır. IBA ve NAA'in varlığı fidelerin kök uzunluğu ve kök gelişme oranını artırmıştır. *Dactylorhiza* türlerinde şeker ve büyümeyi düzenleyici maddeler sürgün ve kök gelişimi üzerine istatistiki olarak önemli farklar göstermiştir (Wotavova-Novotna *et al.*2007).

Yararbaş (2008), salep orkidesi tohumlarının *in vitro*'da imlendirilmesi 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*'da 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.

Orchis mascula L. türünde *in vitro* koşullarda çimlenme üzerinde tohum kabuğu geçirgenliği, sterilizasyonun çimlenme üzerine etkisi, 6 farklı ortam bileşimi denenmiştir (Valletta *et al* 2008). Orchimax (Duchefa) ticari ortam bileşimi, en iyi çimlenme oranını vermiştir. Tohum kabuğunun H₂SO₄ ile kırılması ve tohumun su almasının teşvik edilmesi ile birlikte 4-8°C'de 2 ay soğuk uygulaması, çimlenmeyi çok olumlu etkilemiştir. H₂SO₄'te 5 dakika tutma ve bunun ardından 20 dakika sodyum hipoklorit uygulaması, en yüksek çimlenme oranını vermiştir. Tetrazolium boyama yöntemi ile canlılıklar belirlendiğinde; bu uygulamaların önemli düzeyde canlılığı azaltmadığı görülmüştür. Sürekli karanlık koşullarda tohum çimlenmesi meydana gelmemiştir. 16-h fotoperyot koşullarında tohumlar 20-30 gün içinde şişmiş; 3 ay sonra tohum kabuğunu atarak rhizoidleri oluşturmaya başlamıştır. 4-5 ayda sürgün ucu belirginleşmiş; 5-6. ayda ilk görünür yapraklar oluşmuştur. Daha sonraki iki ay boyunca kök ve yumru gelişimi oluşmuş ve yeşil yapraklar gelişmiştir. Toprağa aktarım aşamasında mikorhizal fungus ilavesi gerekli olacağı düşünülmüştür.

Kahramanmaraş Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde Kısakürek ve ark. (2009) tarafından yürütülen ve proje sonuç raporu sunulan araştırmada Maraş salebi olarak bilinen *Orchis coriophora*, *O.laxiflora*, *O.mascula*, *O.anatolica* ve *Himantoglossum affine* türlerinde *in vitro* tohum çimlendirme çalışmaları yapılmıştır. Üç farklı besin ortamının (KC, PF, VWDB) kullanıldığı denemelerde en yüksek çimlenme oranı *Orchis coriophora* türünden ve KC ortamından elde edilmiştir (%63.92, 8/16-h fotoperiyodisite, %55.77 karanlık). Işıklandırma koşulları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Bu türü *O.anatolica* ve *O.laxiflora* takip etmiş, *O.mascula*'da çimlenme oranı %18 gibi bir değerle diğer türlere göre düşük olmakla birlikte yine KC ortamından elde edilmiştir. *Himantoglossum affine* türünde hiçbir ortamda çimlenme meydana gelmemiştir. İkinci yıl denemeler tekrar edilmiş, ancak *O.mascula* ve *O.coriophora*'nın PF ortamlarındaki performansları hariç; tüm uygulamalardaki çimlenme oranları daha düşük bulunmuştur. İkinci yıl denemelerindeki çimlenme oranı düşüklüğünün, birinci yıl kullanılan tohumlarla aynı partinin, oda sıcaklığında muhafaza edildikten sonra ikinci yıl kullanılmasından kaynaklandığı yorumu yapılmıştır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Araştırma, 2004-2008 yılları arasında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü ve Bartın Üniversitesi Bartın Meslek Yüksekokulu'nda gerçekleştirilmiştir. Orkide türlerinin doğadan toplanması amacıyla Bolu, Zonguldak, Bartın, Karabük ve Kastamonu illeri sınırları içinde kalan alanlarda bilimsel geziler yapılmıştır. Toplam 16 türe ait salep orkidesi tohumlarının *in vitro* koşullarda kültüre alınması ve bitkiye dönüştürülmesi aşamalarının tümü, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı'nda, elde edilen bitkiciklerin dış koşullara alıştırma çalışmaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Seraları, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Seraları ve Bartın Üniversitesi Bartın Meslek Yüksekokulu Uygulama Seraları'nda yürütülmüştür. Doğal yetiştirme ortamlarında, *in situ* çoğaltım çalışmaları ise Bartın Üniversitesi Bartın Meslek Yüksekokulu Uygulama Seraları ile Bartın Orman İşletme Müdürlüğü sınırları içerisindeki bir orman alanında yapılmıştır.

3.1 Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak, Batı Karadeniz Bölgesi'nde bulunan ve salep elde edilmesinde kullanılan bazı orkide türlerine ait olgunlaşmış tohumlar, yeni oluşmuş taze yumrular ile bir önceki yıla ait ana yumrulu bitkiler kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan türler *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich; *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo; *Dactylorhiza nieschalkiorum* Bauman et Künkele.; *Dactylorhiza romana* (seb.) Soo; *Ophrys apifera* Hudson; *Ophrys ferrum-equinum* Desf.; *Orchis coriophora* L.; *Orchis laxiflora* Lam.; *Orchis mascula* (L.) L. ssp. *pinetorum* (Boiss et Kotschy) Camus; *Orchis morio* L.; *Orchis pallens* L.; *Orchis purpurea* Hudson; *Orchis simia* Lam.; *Orchis tridentata* Scop.; *Platanthera chlorantha* (Custer) Reichb.; *Serapias vomeracea* (Burm.fil.) Briq. ssp. *orientalis* Greuter.'tir. Bu türlere ait bazı morfolojik özellikler ile yetiştirildiği yerler ve mahalli isimleri aşağıda ayrı ayrı verilmiştir:

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

Bitki	: 20-50 cm yükseklikte.
Yapraklar	: 5-9 linear'dan lanseolat'a kadar olan şekillerde ve beneksiz.
Brakteler	: Hemen hemen ovaryum kadar uzunlukta.
Çiçek durumu	: Çok sık konik bir baş şeklinde olup çiçekler açınca oblong bir şekil alır. Çiçekler açık pembeden koyu pembeye kadar olan renklerde.
Sepaller	: Lateral sepaller geniş yayık; dorsal sepal, petallerle miğfer meydana getirmiş.
Labellum	: Üç loplu; tabanlı 2 küçük dik çıkıntı var. Mahmuz ince uzun, silindirik, hemen hemen ovaryumun 1,5 katı; aşağı doğru.
Yetiştigi yer	: Kuru çayırılık yamaçlar, kalkerli topraklar.
Çiçeklenme	: Mart- Haziran
Mahalli adı	: Peynir çiçeği, peynircik, yoğurtcuk (Sezik 1984).



Şekil 3.1 *Anacamptis pyramidalis* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo**

Bitki	: 15-60 (80) cm, gövde ince düzgün ve içi boş,
Yapraklar	: Dik, sert lanseolat, daima beneksiz bazen uçta miğfer yapmış,
Brakteler	: Lanseolat, soluk gül renkli, et renginde ya da nadiren krem renkli çiçeklere sahiptir.
Çiçek durumu	: Yoğun ve silindirik
Sepaller	: Lanseolat ya da ovat-lanseolat, 5-7x2-3mm
Petaller	: Sepallerden daha kısa ve geniş
Labellum	: Oblong ya da baklava dilimi şeklinde tam veya nadiren 3 loplu, mahmuz kıvrık konik- silindirik, ovaryumun yarısı kadar
Yetiştği yer	: Bataklık, nemli çayırlar, su kenarları ve kalkerli topraklar
Çiçeklenme	: Haziran- Temmuz (Davis 1984)



Şekil 3.2 *Dactylorhiza incarnata* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Dactylorhiza nieschalkiorum* Bauman et Künkele.**

Bitki	: 30-70 cm yükseklikte, gövdenin içi hemen hemen boş.
Yapraklar	: 4-7, iyi gelişmiş, geniş eliptik obovat'tan lanseolat'a kadar olan şekillerde, üstekiler brakteye benzer, beneksiz veya çok küçük benekli, benekler apekse doğru yoğun.
Brakteler	: Lanseolat, otsu.
Çiçek durumu	: Önce pramidal, sonra geniş silindirik, genellikle çok sık. Çiçekler kırmızımsı mor, çok büyük.
Sepaller	: Lanseolat'tan ovat-lanseolata kadar olan şekillerde; lateral olanlar geriye doğru veya yayık, ortadaki petallerle beraber miğfer meydana getirmiş.
Petaller	: Lanseolat'tan ovat-lanseolata kadar olan şekillerde, dorsal sepal ile miğfer meydana getirmiş.
Labellum	: Yuvarlak veya geniş ovat genellikle eni boyundan fazla tam veya apekte loplu; yüzeyi küçük lekeler ve çizgilerden meydana gelen değişik desenlerle kaplı. Mahmuz torba şeklinde, ovaryumun $\frac{3}{4}$ 'ü boyda, yukarı doğru.
Yetiştigi yer	: Orman açıklıkları, taban suyu bol, nemli çayırılar.



Şekil 3.3 *Dactylorhiza nieschalkiorum* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Dactylorhiza romana* (seb.) Soo**

Bitki	: 15-40 cm yükseklikte.
Yapraklar	: Çok sayıda, genellikle tabanda rozet yapmış, linear'dan linear-lanseolat'a kadar olan şekillerde.
Brakteler	: Otsu, lanseolat çiçeklerden aşağıda çok, üst kısımlarda az uzun.
Çiçek durumu	: Kısa silindirik; çiçekler küçük, kırmızımsı mor, kırmızı, sarı nadiren beyaz renklerde.
Sepaller	: Lanseolat'tan uzun ovat'a kadar olan şekillerde; lateral kadar hemen hemen geriye kıvrılmış, 13 mm kadar boyda.
Petaller	: Geniş ovat, 10 mm kadar boyda.
Labellum	: Öne doğru, küçük 3 loplu bazen tam, geniş ovat'tan ovat'a, hatta yuvarlağa kadar olabilen şekillerde. Yüzeyinde leke, benek veya çizgiler taşımaz. Mahmuz, silindirik yukarı doğru, genellikle 10-23 mm boyda.
Yetiştği yer	: Çalılık veya orman altı.
Çiçeklenme	: Mart-Temmuz.



Şekil 3.4 *Dactylorhiza romana* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Ophrys apifera* Hudson**

Bitki	: 15-60 cm yükseklikte.
Yapraklar	: 5-9, geniş lanseolat.
Brakteler	: Ovaryumdan uzun.
Çiçek durumu	: Gevşek, 2-10 çiçekli. Çiçekler oldukça büyük.
Sapeller	: 12-16 mm boyda, 5-8mm genişlikte; açık veya koyu pembe, bazen beyazımsı yeşil, damarlar yeşil.
Petaller	: Değişik şekilde (üçgen, dil şeklinde ince uzun...), normal olarak sepallerin yarısından daha kısa boyda; yeşil veya sepallerle aynı renkte, kenarlarda tüylü.
Labellum	: Tabanda derin 3 lopluk, ovat; yan loplar 3 köşeli, sarı veya kahverengi tülü; orta lop kırmızımsı kahverengi, yüzeyde beyaz veya sarı değişik desenli; apendis yeşilimsi renkte ve geriye doğru.
Yetiştigi yer	: Orman açıklık ve kenarları, çalı ve maki altları.
Çiçeklenme	: Mayıs- Haziran sonu.



Şekil 3.5 *Ophrys apifera* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Ophrys ferrum- equinum* Desf.**

Bitki	: 10-30 cm yükseklikte.
Yapraklar	: 4-8, lanseolat'tan geniş lanseolat'a kadar olan şekillerde.
Brakteler	: Ovaryumdan uzun.
Çiçek durumu	: Gevşek, 4-6 çiçekli. Çiçekler bariz büyük.
Sepaller	: 10-15 mm uzunlukta, normal olarak pembe bazen kırmızı veya kırmızımsı kahverengi.
Petaller	: 7-10mm uzunlukta. Bazen kenarları dalgalı linear- lanseolat, pembe, kırmızı veya kırmızımsı kahverengi.
Labellum	:10-14mm boyda yuvarlaktan ovat'a kadar olan şekillerde, parçalanmamış, koyu morumsu kahverengi, kadife gibi tüylü, ortada parlak morumsu renkte, at nalı veya 2 küçük diş şeklinde leke taşır.
Yetiştği yer	: Makilikler, orman kenarlarındaki çayırlar; kalkerli topraklarda.
Çiçeklenme	: Mart ortası- Haziran sonu



Şekil 3.6 *Ophrys ferrum- equinum* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Orchis coriophora* L.**

Bitki	: 15-45 cm yükseklikte.
Yapraklar	: Taban yapraklar 5-6 adeta kanallı, lanseolat; üst yapraklar sapı sarar.
Brakteler	: Ovaryum kadar uzunlukta.
Çiçek durumu	: Azçok sık silindirik spika. Çiçekler mat ya morumsu kırmızı renkli yeşil çizgili veya beyaz veya yeşilimsi beyaz renkli, kırmızı benekli.
Sepaller	: Petallerle miğfer teşkil etmiş.
Labellum	: 3 loplu, biraz içe bükük orta lop yan loplardan biraz daha uzun, yan loplarda düz dişli değil. Mahmuz ovaryumdan biraz kısa, aşağı doğru.
Yetiştigi yer	: Taban suyu olan çayırlarda ve biraz asidik topraklarda.
Çiçeklenme	: Nisan sonu-Haziran.



Şekil 3.7 *Orchis coriophora* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Orchis laxiflora* Lam.**

Bitki	: 30-60 cm yükseklikte.
Yapraklar	: 7-10, lanseolat, beneksiz.
Brakteler	: Morumsu, ovaryumdan biraz kısa.
Çiçek durumu	: Gevşek, 6-20 çiçekli. Çiçekler mor, kırmızı, nadiren pembe.
Sepaller	: Lateral olanlar geriye doğru yayık.
Petaller	: İçe doğru bükük, dorsal sepalle miğfer meydana getirmiş.
Labellum	: Hafif 3 loplu, orta kısmı beyazımsı ve beneksiz. Orta lop yok veya çok küçük, yan loplar geriye doğru bükülmüş, bu yüzden labellum katlanmış gibi görünür. Mahmuz ufki, bazen biraz aşağı doğru açta genişlemiş, ovaryumun yarısı kadar boyda.
Yetiştigi yer	: Nemli çayırlar, bataklıklar.
Çiçeklenme	: Mayıs- Haziran



Şekil 3.8 *Orchis laxiflora* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Orchis mascula* (L.) L. ssp. *pinetorum* (Boiss et Kotschy) Camus**

Bitki	:20-45 cm yükseklikte, gövde bazen kıvrılmış.
Yapraklar	: 4-7, tabanda yayık bir rozet halinde, obovat'tan oblong'a kadar olan şekillerde, parlak yeşil renkte , beneksiz bazen benekli.
Brakteler	: Ovaryumun takriben ½'si kadar boyda.
Çiçek durumu	: Çok çiçekli, gevşek ve silindirik. Çiçekler leylak renginden kırmızıya kadar olan renklerde.
Sepaller	: Ovat, uçları obtus; lateral olanlar yayık geriye bükük dorsal olan petallerle beraber miğfer meydana getirmiş, 10-13 mm boyda.
Petaller	: Sepallerden daha kısa.
Labellum	: 3 loplu, konveks, tabana yakın kısımları küçük benekli veya beneksiz; orta lop uzamış, yan loplardan bariz uzun, böbrek şeklinde 2 – lopluya kadar değişik şekillerde; lateral loplar ovat. Mahmuz hemen hemen ovaryuma eşit uzunlukta biraz yukarı doğru kıvrık.
Yetiştigi yer	: Çam, kayın ormanları ve kenarları, meşelikler.
Çiçeklenme	: Mayıs- Haziran



Şekil 3.9 *Orchis mascula* ssp. *pinetorum* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Orchis morio* L.**

Bitki	: 10-30 cm yükseklikte.
Yapraklar	: 5-9, lanseolat, beneksiz.
Brakteler	: Ovaryuma eşit uzunlukta, yeşil veya kırmızımsı renkli.
Çiçek durumu	: 5-12 çiçekli, gevşek. Çiçek rengi değişik olabilir. Koyu mor, karmen- pembeden beyaza kadar.
Sepaller	: Petallerle birleşip gevşek, yuvarlak bir miğfer meydana getirmiş. Lateral sepaller yeşil çizgili.
Labellum	: 3 loplu çok geniş, genellikle az veya çok içe katlanmış, orta lop uçta dişli; labellumun ortası koyu renklerde benekli. Mahmuz tüylü, takriben ovaryumun uzunluğunda, aşağı doğru veya ufki.
Yetiştigi yer	: Orman açıklıklarında, makilikte, kalkerli veya biraz asidik topraklarda
Çiçeklenme	: Mart- Haziran.



Şekil 3.10 *Orchis morio* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Orchis pallens* L.**

Bitki	: 10-30 cm yükseklikte.
Yapraklar	: 7-9, geniş lanseolat, beneksiz.
Brakteler	: Ovaryuma eşit uzunlukta.
Çiçek durumu	: Sık, çiçekler sarı, sepal ve pataller labellumdan daha açık renkte.
Sepaller	: Lateral sepaller dik, dorsal sepal petallerle gevşek bir miğfer yapmış.
Labellum	: 3 loplu, beneksiz. Mahmuz kuvvetli, kalın, ovaryumdan biraz kısa, ufki veya yukarı doğru.
Yetiştği yer	: Ormanlık arazi, ormanlık arazideki açık yamaçlarda.
Çiçeklenme	: Nisan- Haziran



Şekil 3.11 *Orchis pallens* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Orchis purpurea* Hudson**

Bitki	: 25-80 cm yükseklikte, gürbüz.
Yapraklar	: 6-10, geniş lanseolattan ovata kadar olan şekillerde, parlak yeşil, beneksiz.
Brakteler	: Ovaryumun yarısı kadar uzunlukta.
Çiçek durumu	: Çok çiçekli, bitkiye nazaran büyük 5-20cm boyda.
Sepaller	: Petallerle oldukça yuvarlak miğfer meydana getirmiş; miğfer kırmızımsıdan siyahımsı kahverengiye kadar olan renklerde.
Labellum	: 3 loplu; lateral loplar silindirik, orta lop çok geniş ve yuvarlaklaşmış, ortada küçük bir apendis ile dişlenmiş; beyazımsıdan pembeye kadar olan renklerde morumsu kırmızı noktalı.
Yetiştiğı yer	: Çalılıklarda, orman altında.
Çiçeklenme	: Nisan- Haziran.



şekil 3.12 *Orchis purpurea* türüne ait çiçekli bitki rnekleri

***Orchis simia* Lam.**

Bitki	: 20-45 cm yükseklikte.
Yapraklar	: 5-7, geniş lanseolat, beneksiz.
Brakteler	: Ovaryumun 1/5'i kadar uzunlukta.
Çiçek durumu	: Sık, kısa; çiçekler tepeden aşağı doğru açar.
Sepaller	: Petallerle beraber ucu sivri bir miğfer yapmış; miğfer parlak pembeden koyu kırmızıya kadar olan renklerde.
Labellum	: 3 loplu; yan loplar silindirik; orta lop derin bir şekilde parçalanmış, ortasında küçük bir apendis var; orta kısmı beyaz, dış kısımlar kırmızı. Mahmuz ovaryumun hemen hemen yarısı kadar aşağı doğru.
Yetiştigi yer	: Çayırlar, orman açıklıkları, makiler.
Çiçeklenme	: Mart sonu- Haziran sonu.



Şekil 3.13 *Orchis simia* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Orchis tridentata* Scop.**

Bitki	: 15-40 cm yükseklikte.
Yapraklar	: 6-9, oblong- lanseolat, beneksiz.
Brakteler	: Ovaryumun yarısından daha kısa.
Çiçek durumu	: Sıkça, çiçekler açık kırmızı, mor, leylak rengi veya beyaz; kokulu.
Sepaller	: Petallerle beraber miğfer meydana getirmiş, sepaller uzun uçlu. Miğfer, mor çizgili.
Labellum	: 3 loplu lateral loplar yayık, orta lop ikiye çatallanmış, ortada küçük bir diş taşır, pembe veya mor küçük noktalı. Mahmuz ovaryum kadar uzunlukta aşağı doğru.
Yetiştigi yer	: Deniz seviyesinden 1500m ye kadar kuru yamaçlar, orman ve maki kenarları.
Çiçeklenme	: Nisan-Haziran.



Şekil 3.14 *Orchis tridentata* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

***Platanthera chlorantha* (Custer) Reichb.**

Bitki	: 25-50 cm yükseklikte.
Yapraklar	: Taban yaprakları 2, hemen hemen karşılıklı, uzamış ovat; üst yapraklar ince uzun.
Brakteler	: Ovaryumun uzunluğunda.
Çiçek durumu	: Çok çiçekli, gevşek spika. Çiçekler <i>P.bifolia</i> 'dan daha yeşil ve orta büyüklükte. Anter loplari, dolayısıyla polliniyumlar birbiri ile açi meydana getirecek şekilde; kokulu.
Sepaller	: Lateral olanlar yayık, dorsal sepal petallerle miğfer yapmış.
Labellum	: Tam, dil gibi sarkık. Mahmuz ovaryumdan çok uzun.
Yetiştiiği yer	: 2000 m'ye kadar olan kalkerli topraklarda az nemli çayırlar ve çalılıklarda.
Çiçeklenme	: Mayıs-Ağustos, <i>P.bifolia</i> 'dan iki hafta kadar önce.



Şekil 3.15 *Platanthera chlorantha* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

Serapias vomeracea (Burm.fil.) Briq. ssp. **orientalis** Greuter.

- Bitki** : 10-30 cm yükseklikte, gövde yeşil, üst kısımlara doğru kırmızımsı mor.
- Yapraklar** : 4-6, mavimsiden sarımsı yeşile kadar olan renklerde geniş lanseolat dışa doğru bükük.
- Brakteler** : Geniş lanseolat, çiçekleri geçen boyda mavimsi mordan gümüşü yeşile kadar değişik renklerde.
- Çiçek durumu** : Kısa, ovat, 3-6 çiçekli sık. Çiçekler büyük.
- Sepaller** : Petallerle beraber 20-30mm buda bir miğfer meydana getirmiş, uçta sivrilmiş, kurşuniden morumsuya kadar olan renklerde.
- Labellum** : Epikil geniş lanseolattan kordata kadar olan şekillerde, tabana yakın kısımda sık tüylü; sarımsı yeşil, kırmızımsı kahverengi veya koyu mor. Hipokilin 2 yan lopu yukarı kalkık, miğferin altında.
- Yetiştirildiği yer** : Kuru veya nemli çayırlar, makilikler yol kenarları.
- Çiçeklenme** : Mart sonu- Mayıs (Sezik 1984).

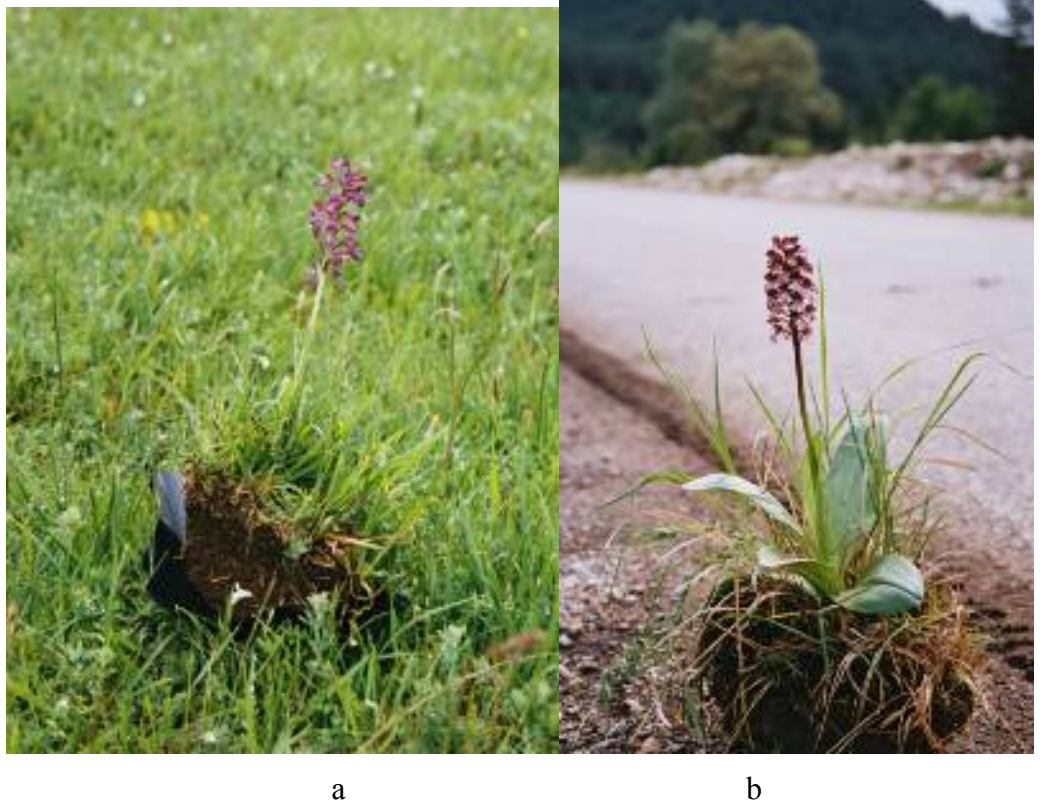


Şekil 3.16 *Serapias vomeracea* ssp. *orientalis* türüne ait çiçekli bitki örnekleri

3.2 Yöntem

Batı Karadeniz Bölgesi'nde salep elde edilmesinde kullanılan orkideler Sezik ve Özer (1983)'e, bu orkidelerin floradaki lokasyonları ise Davis (1984)'e göre belirlenmiştir. Araziye gidiş ve orkidelerin doğada aranması aşamalarında Prof. Dr. Ekrem Sezik'in kayıtlarından yararlanılmış olup, sadece bir türün (*Orchis simia*) lokasyonu rastlantısal olarak tespit edilmiştir. Çizelge 3.1'de orkidelerin 'Flora of Turkey' kitabındaki lokasyonları ile bitki örneklerinin alındığı noktalar gösterilmiştir.

Yapılan literatür incelemesinden hareketle *Orchis*, *Ophrys*, *Dactylorhiza*, *Serapias*, *Anacamptis*, *Platanthera* cinslerine ait farklı türlerin 'Flora of Turkey' kitabında belirtilen yayılış bölgelerine, çiçeklenme zamanı olan Nisan-Mayıs-Haziran aylarında bilimsel geziler düzenlenmiştir. Kaynaklarda belirtilen noktaları bulmak veya bitki belirlenen yükseklikleri kaydedebilmek amacıyla Thommen Classic marka altimetre kullanılmıştır. Bu cinslere ait farklı türlerden doku kültürü veya geleneksel vegetatif çoğaltma yöntemi çalışmalarına materyal sağlamak amacıyla 20'şer adet çiçekli bitki, köklü ve topraklı olarak sökülüştür (Şekil 3.17). Bu bitkiler ya kasalar içerisine veya plastik torbalara yerleştirilerek (Şekil 3.18), Bartın'a getirildikten sonra saksılara dikilmiş ve korunaklı bir alanda gölgeleme materyalleri ile gölgelenen yastıkların üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 3.19). Örnekler herbaryumları teşhise olanak sağlayacak şekilde alınmış ve fotoğrafları çekilmiştir. Elde edilen bu türlerin teşhisleri ise Prof. Dr. Ekrem Sezik (Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi) tarafından yapılmıştır.



Şekil 3.17 Doğal ortamından toprağıyla birlikte sökülerek deneme arazilerine taşınmak üzere hazırlanan *Orchis laxiflora* (a) ve *Orchis purpurea* (b) türüne ait orkide bitkileri



Şekil 3.18 Doğal ortamlarından toprağıyla birlikte sökülen orkidelerin kasa veya torbalarla taşınması



Şekil 3.19 Doğadan toplanan orkidelerin saksılanarak yerleştirildiği ve muhafaza edildiği mekan

Teşhisleri yapılan türlere ait bitkilerden, tohum kapsülleri yeterli olgunluğa ulaştığında (kapsüllerde çatlama belirtisi görüldüğünde) tohumlar kapsülleri ile birlikte alınmıştır. Tohumlar kapsüllerinden çıkartıldıktan sonra kapaklı cam kavanozlara konulmuş ve buzdolabında +4 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.1 Orkide örneklerinin alındığı lokasyonlar ile Davis (1984)'e göre lokasyonlar

Tür	Davis (1984)'e göre lokasyon	Örneklerin alındığı lokasyon
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	Kastamonu Bölük Yazı Köyü	Bartın Orduyeri su deposu yolu 3.5km 80m.; Bartın Amasra-Kurucaşile 8.km. 310m. Çayırılık
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	Bolu Abant Gölü 1350m, Kastamonu Ağılı'nın doğusu 1100m.	Bartın; Kumluca, Kumluca-Turna mevki 25-26.km. 1250-1260m.; Kastamonu, Ilgaz Milli parkına 1km kala yolun üstü 1400m su kenarları
<i>Dactylorhiza nischalkiorum</i>	Bolu Abant Gölü; Kastamonu Ilgaz Dağı 1400-1700m	Kastamonu Tosya, Evkaya yaylası mevki 1350m.; Kastamonu, Daday –Ballıdağ 27.km 1400m su kenarları
<i>Dactylorhiza romana</i>	Kastamonu Elek Dağ Kazampınar,Taşköprü	Kastamonu, Kaşçılar-Benlisultan yolu, Benlisultana 1.7km kala yolun üstü 1300m rakımda sarıçam ormanı alt tabaka kayın-meşe
<i>Ophrys apifera</i>	Zonguldak'tan Mengen'e doğru 13km.700m. ve Mengen'in 8km. güneybatısı 520m.	Mengen-Bolu arası 11.km. 560m.
<i>Ophrys ferrum-equnium</i>	-	Mengen- Bolu 10.km. 540m.çayırliklar ve çalı altları
<i>Orchis coriophora</i>	Bolu; Abant 1280m.	Gerede-Ankara arası 18.km. 1210m.su kenarları; Bartın; Kurucaşile çıkışı Hoca köyü yol ayrımı, çayır tarla mevki 160m.çayırliklar
<i>Orchis laxiflora</i>	Zonguldak; Bartın'a doğru Çaycuma'nın 35km. doğusu 50-100m.	Gerede-Ankara arası 18.km. 1210m.su kenarları; Bartın-Kozcağz yolu 5.km.22m.(çayırliklar); Kastamonu,Daday –Ballıdağ 28.km 1480m orman içi açıklık çayırlik
<i>Orchis mascula pinetorum</i>	Kastamonu; Araç 1200m.	Bolu Taşlıyayla 24.km. 1370m. sarıçam altları; Bolu-Gerede 29.km 1000m.; Kastamonu, Tosya, Avşar-Avşar yaylası arası 1650m.çam altları; Kastamonu-Ankara yolu 33.km soğuksu mevki 1550m sarıçam-gökmar altı
<i>Orchis morio</i>	Devrek'e doğru Mengen'in 6.5km. kuzeyi 700m.; Kastamonu, Eflani'ye doğru Karaevli'nin 10km. doğusu 1000m.	Mengen-Devrek arası 7-8.km. 740-760m.çayırliklar; Bolu-Abant kavşağı Bolu-Abant 12.km. 760m.; Bartın-Amasra-Boztepe 60m.çayırlik
<i>Orchis pallens</i>	Bolu; Abant G. 1400m.	Kastamonu; Tosya, Yeşil göl yangın kulesi altları 1730m.orman altları; Kastamonu-Çankırı sınırı karayolları tesisi TV verici yolu 500m ilerde sağda gökmar altı 1910-2000m.
<i>Orchis purpurea</i>	Zonguldak; Kilimli 100m. Ve Keltepe 1700m.	Mengen-Bolu arası 14.km. 530m.Çalı altları; Mengen-Bolu arası 4.5km. 600m.çalı altları; Kastamonu; Tosya, Avşar-Avşar yaylası arası 1220m.Çamlık alan Bartın- Kumluca Çengelli köyü 400m. Çayırlik
<i>Orchis simia</i>	Kastamonu; Araç, Taşköprü	Bartın-Mugada yolu 17.km çayırlik
<i>Orchis tridentata</i>	Kastamonu; Ballıdağı, Daday-Azdavay arası 1140m.	Mengen-Bolu arası 11.km. Gökçesu civarı 560m.çayırliklar; Kastamonu, Araç, Kızılsaray köyü, Kotcuğaz mh. 1050m.
<i>Platanthera chlorantha</i>	Bolu Mengen 600m.	Kastamonu; Araç, Kızılsaray köyü, Kotcuğaz mh. 1200m.çalı ve çam altları; Kastamonu-Kaşçılar yolu 7.km 1000m sarıçam altı
<i>Serapias vomeraceae</i>	Zonguldak, Zonguldak'a yakın	Bartın; Orduyeri su deposu karşısı 90m. Çayırlik

3.2.1 Salep elde edilen orkidelere ait tohumların *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi

3.2.1.1 Genel doku kültürü şartları

Doku kültürü uygulamalarının tümü aseptik koşullar altında yapılmış, bunun için laminar akışlı ve HEPA filtreli steril kabin kullanılmıştır. Kullanılan bistüri bıçağı ve pensler önceden otoklavda steril edilmiş ve dikim işlemi sırasında da %96'lık etil alkole batırılıp alevden geçirme suretiyle steril koşulların devamı sağlanmıştır. Besin ortamları 500 ml'lik balon jojeler içerisinde otoklavda sterilizasyona tabi tutulmuş önceden otoklavda steril edilen petri kutularına, laminar akışlı kabin içerisinde 15-17'şer ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Ortamların otoklavda sterilizasyonu, 1.2 atmosfer basınç altında, 121°C sıcaklıkta 20 dakika sürede yapılmıştır. Denemelerde kullanılan cam ve metal malzemelerin sterilizasyonu için 1.2 atmosfer basınç, 121°C sıcaklıkta 90-120 dakika süre kullanılmıştır. Çimlenen tohumlardan gelişen protokormların alt kültürlere alınması ve büyütülmesi aşamasında 70 ml besin ortamı (1/2 MS) doldurulan ve steril edilen 7x10 cm boyutlarındaki cam kavanozlardan faydalanılmıştır.

Çalışma süresince temel besin ortamı olarak beş reçete kullanılmıştır: MS (Murashige and Skoog 1962), 1/2 MS (yarım kuvvette MS ortamı), KC (Knudson 1946), inorganik azot ilave edilmemiş KC (KC-N) (Gönülşen vd 1996), VW&DB (Van Waes and Debergh, 1986) ortamları kullanılmıştır. Besin ortamlarının bileşimleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Yarı kuvvetteki MS (1/2 MS); makro ve mikro elementler ile vitaminler bakımından Çizelge 3.2'de verilen MS değerlerinin yarısını içeren MS besin ortamını; inorganik azot ihtiva etmeyen KC (KC-N) ortamı ise $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın ilave edilmediği KC ortamını ifade etmektedir.

Bitki büyüme düzenleyicilerden sadece gibberellik asitin (GA_3) değişik dozları (0, 0.1, 0.5 mg/l), bazı deneme aşamalarında ortamlara ilave edilmiştir. Besin ortamlarına aksi yönde bir açıklama yapılmadığı takdirde karbon kaynağı olarak 20 g/l sakaroz (Difco-Bacto) eklenmiştir (Sadece Deneme I'de, Deneme VI ve Deneme VII'de sakaroz

oranları farklı kullanılmıştır ve bunlar ilgili bölümlerde açıklanmıştır). Besin ortamlarının yarı katı yapıda olmalarını sağlamak amacıyla 6 g/l agar (Difco-Bacto) ilave edilmiş ve tümünün pH seviyeleri 5.7 -5.8'e ayarlanmıştır.

Çizelge 3.2 Denemelerde kullanılan temel besin ortamı bileşimleri

Bileşenler	VW& DB	MS	KC
Makro Elementler (mg/l)			
KNO ₃	400	1900	
NH ₄ NO ₃	370	1650	
(NH ₄) ₂ SO ₄	60	-	500
MgSO ₄ .7H ₂ O	100	370	250
KH ₂ PO ₄	300	170	250
CaCl ₂ .2H ₂ O		440	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O			1000
Mikro Elementler (mg/l)			
MnSO ₄ .4H ₂ O	25	22.30	7.5
KI	-	0.83	
H ₃ BO ₃	10	6.2	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10	8.6	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	0.25	
FeSO ₄ .7H ₂ O	37.3	27.8	25
Na ₂ EDTA	27.8	37.3	
CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0.025	
Vitaminler (mg/l)			
Nikotinik asit	2.0	0.5	
Pridoksin-HCl	0.5	0.5	
Thiamin-HCl	0.5	0.1	
Biotin	0.05	-	
Meso-inositol	1000	100	
Amino Asitler (mg/l)			
L-Glutamin	100	-	
Glisin	-	2.0	

Tohum ekiminin ardından çimlenme ve protokorm oluşumu meydana geldikten sonra (tohum ekiminden itibaren tam dört ay) tüm eksplantlar, transfer ortamı olarak kullanılan ½ MS besin ortamını içeren 10 cm çapındaki steril cam petri kutularına aktarılmıştır. Protokormların alt kültürleri her 4-5 haftada bir olacak şekilde yapılmış, besin ortamı bileşimi ve kullanılan petri kutularının boyutlarında herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Taze besin ortamlarına aktarım işlemine aynı biçimde bitki gelişme dönemine kadar devam edilmiş; bitkiler gelişmeye başladıktan sonra da transfer işlemleri yine her 4-5 haftada bir tekrarlanmıştır.

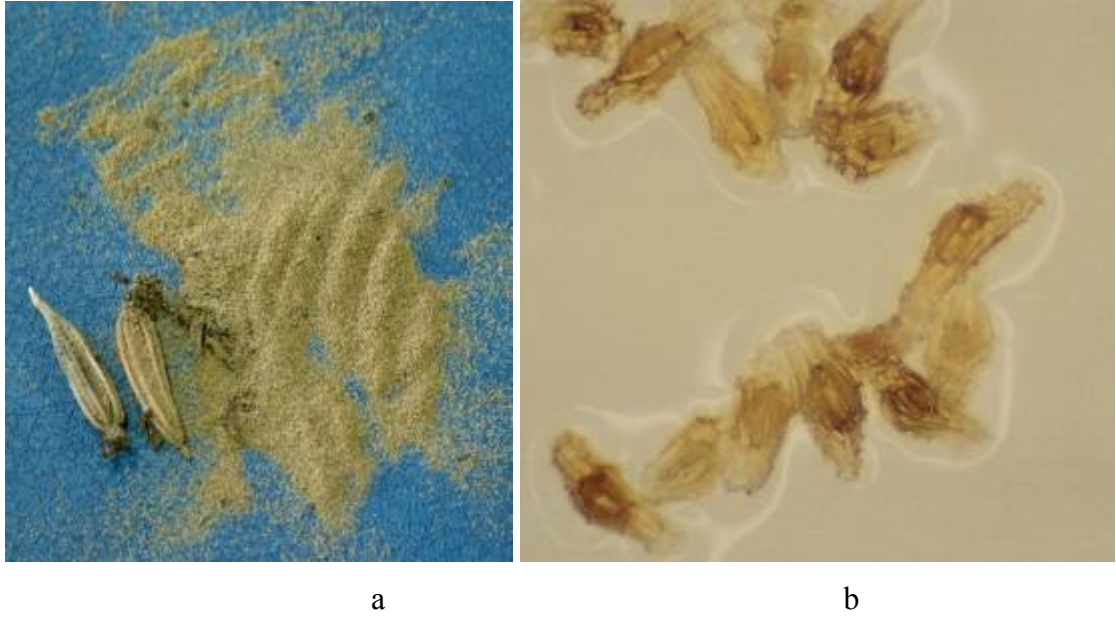
3.2.1.2 Tohumların yüzeysel sterilizasyonu ve çimlendirilmesi

Orkide tohumları, 2-3 damla Tween-20 ilave edilmiş % 10'luk ticari sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içinde 12 dakika bekletilerek yüzeysel sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu oranın ve sürenin belirlenebilmesi amacıyla sonuçları burada sunulmamakla birlikte birkaç kez deneyler kurulmuş, %10-20'lik dozda 10-20 dakika arasındaki farklı sürelerde yapılan sterilizasyonun etkileri enfeksiyon oluşma ve çimlenme oranı bakımından değerlendirilmiştir. Bu ön denemelerin sonucunda %10'luk doz ve 12 dakika sürenin uygulanmasına karar verilmiştir.

Tohumlar çok küçük oldukları ve toz gibi bir yapıda bulunduklarından dolayı (Şekil 3.20) öncelikle 1 mg tartılmış ve kaba filtre kağıdından yapılan küçük paketlerde sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bunun ardından, 3 defa 5'er dakika steril saf su ile durulama işlemi yapılmıştır. Sterilizasyon işleminin yapıldığı cam kavanozdaki son durulama suyu süzildükten sonra tohumları bulunduran filtre kağıdı paketleri, yuvarlak şekilde ve 15 cm'lik cam petri kutularına sığacak şekilde kesilmiş ve bunların içinde otoklavda sterilize edilmiş kurutma kağıtları üzerine alınarak fazla sularından kurtarılmıştır. Daha sonra paketlerin uçları kesilerek açılmış ve tohumlar, besin ortamı bulunan petri kutularına yerleştirilmiştir. Tohum ekimi her uygulama kombinasyonu için her bir türden, tekerrürlerin her birinde 1 mg tohum olacak şekilde yapılmıştır. Tohum ekimi yapılan petri kutularının kenarları, dış ortamla ilişkinin kesilmesi

amacıyla streç film ile kapatılmış ve üzerlerine uygulama bilgileri camyazar kalemle yazılmıştır.

Tohum ekimi tamamlanan petri kutuları, protokorm oluşumu dönemine kadar (4 ay) $23\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve sürekli karanlık koşullarda (Deneme III'ün bir bölümü hariç; Deneme III'ün aydınlık kısmı $23\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, 16 saat/gün aydınlık, $32\ \mu\text{mol s}^{-1}\text{ m}^2$ ışık rejiminde, ilk bir ay sürekli karanlıkta) inkübe edilmiştir. Tohum ekiminden 3 ay sonra her petri kutusundaki toplam tohum sayısı, çimlenen tohum sayısı stereomikroskop altında tespit edilmiştir. Bundan bir ay sonra yeniden bir sayım yapılmış, bu defa sadece beyaz bir küre şeklinde ve en az 2 mm büyüklüğe ulaşmış protokormlar sayılmıştır. Elde edilen protokormlar daha sonra transfer ortamlarına aktararak, $23\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, 16 saat/gün aydınlık fotoperiyodisite düzenine sahip ve 3000 lux şiddetindeki aydınlatma rejimine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.20 a. Orkidelere ait tohum kapsülleri ve bunların içerisinden çıkan toz gibi bir yapıya sahip tohumları

b. Orkide tohumlarının stereomikroskop altındaki görünüşleri

3.2.1.3 Denemelerin kurulması

Salep elde edilen orkidelerin doğal yetiştiği alanlara bilimsel geziler yapılarak bitkiler belirlenmiş ve bunlar materyal olarak değerlendirilmiştir. Çalışma süresince yeni türler belirlenerek denemelere dahil edilmiştir. Bu nedenle hiçbir deneme, aynı anda toplam 16 orkide türünde birden yapılamamıştır. Herhangi bir deneme aşamasında, elimizde bulunan türler ve bunlardan elde edilmiş tohum miktarı göz önünde bulundurularak ve aynı zamanda bir önceki veya daha önceki deneme aşamalarının sonuçları dikkate alınarak tür seçimi yapılmış ve denemeler kurulmuştur.

Çalışmamızın başlangıcında hangi besin ortamlarıyla yola çıkılması gerektiği konusu belirlenirken, önceki yıllarda değişik araştırmacılar tarafından elde edilmiş ve yayınlanmış sonuçlar göz önünde bulundurulmuştur. İlk aşamada, mevcut türlere ait tohumlar öngörülen besin ortamları bileşimlerine ekilmiştir. Deneme sonuçlarına göre bir sonraki aşamada izlenecek yol ve besin ortamı bileşiminde oluşturulacak farklılıklar belirlenmiştir. Böylece ikinci aşama denemesi kurulmuştur. İlerleyen aşamalarda kullanılacak türlerin belirlenmesinde, ümitvar sonuç elde edilen türler tercih edilmiş ve çalışmalar bu türlerde yoğunlaştırılmıştır. Ayrıca zaman içerisinde yeni türlere ait bitkiler bulunmuş ve bunlardan tohum alınabilmişse, denemelere bu türler de ilave edilmiştir. Çimlenme kapasitesi düşük olan veya hiç çimlenmeyen türler (Ör. *Orchis purpurea*, *O.pallens* gibi) daha sonra yapılması planlanan araştırmalarda tek başlarına ele alınmak üzere denemelerden çıkartılmıştır. Çimlenme ve protokorm oluşturma kapasitesi yüksek görülen türlerde ise arka arkaya farklı denemeler kurularak bitki oluşturma oranını artırmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarımızın temel prensibi ve iş akışı bu anlayış kapsamında gerçekleştirilmiştir. En az bir veya birkaç türde üretime yönelik olarak uygulanabilir sonuçlar elde edilmesine gayret edilmiştir. Açıklanan bu hedef doğrultusunda farklı orkide türü ve besin ortamı kombinasyonlarının kullanıldığı, toplam yedi adet deneme yürütülmüştür. Birbiri ardına gerçekleştirilen denemelere ait ayrıntılar ise şöyledir:

Deneme I: *Orchis pinetorum*, *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza neschalkiorum*, *Orchis purpurea*, *Orchis pallens* ve *Orchis tridentata* türlerine ait tohumlar ½ MS, MS, KC ve VW&DB besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Gönülşen vd. (1996)'nin bulguları ve yorumları ışığında ortam kuvvetine göre sakaroz dozları ayarlanmış ve MS ortamına 30 g/l, 1/2MS ortamına 15 g/l ve diğer ortamlara da 20 g/l sakaroz ilavesi yapılmıştır. Her petriye 1 mg tohum olmak üzere, her türden 10'ar adet petri kutusuna ekim yapılmıştır.

Deneme II: *Anacamptis pyramidalis*, *Orchis laxiflora*, *Serapias vomeraceae* ssp. *orientalis*, *Orchis pallens* ve *Orchis purpurea* türlerine ait tohumlar, hormonsuz veya 0.1 mg/l GA₃ ilave edilmiş, ½ MS ve KC temel bileşimine sahip besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Bu besin ortamlarının bulunduğu petri kutularına her bir türden 5'er adet olacak şekilde 1'er mg tohum ekimi yapılmıştır.

Deneme III: *Dactylorhiza neschalkiorum*, *Orchis pinetorum* ve *Orchis tridentata* türlerine ait tohumlar, hormonsuz ½ MS, MS, KC, KC-N ile bunlara 0.1 mg/l GA₃ ilave edilmesiyle elde edilen besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bu besin ortamlarına her bir türden 5'er petri kutusuna ekim yapılmıştır. İnkübasyon süresinin ilk 30 günü tüm kültürler karanlıkta ve 23±1 °C sıcaklıkta bekletilmişler, bu sürenin sonunda kültürlerin yarısı fotoperiyodik aydınlatma koşullarına (16 saat/gün aydınlık, 3000 lux ışık şiddeti) alınmış, diğer yarısı ise karanlıkta tutulmaya devam edilmiştir. Üç aylık süre dolduktan sonra tüm kültürler iklim odasındaki fotoperiyodik ışıklandırma koşullarına aktarılmıştır.

Deneme IV: *Dactylorhiza incarnata*, *Ophrys apifera*, *Ophrys ferrum-equnium*, *Orchis coriophora*, *Orchis morio*, *Orchis morio*, ve *Platanthera chlorantha* türlerine ait tohumlar, hormonsuz ½ MS, KC, KC-N ile bunlara 0.1 mg/l GA₃ ilave edilmesiyle elde edilen besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Bu besin ortamlarına her türden 5'er adet petri kutusuna tohum ekimi yapılmıştır.

Deneme V: *Dactylorhiza neschalkiorum*, *Orchis simia*, *Platanthera chlorantha* ve *Dactylorhiza romana* türlerine ait tohumlar, hormonsuz ½ MS ve KC ile bunlara 0.5 mg/l GA₃ ilave edilmesiyle elde edilen besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Bu besin ortamlarına her türden 10'ar adet petri kutusuna tohum ekimi yapılmıştır.

Deneme VI: *Orchis coriophora*, *Dactylorhiza neschalkiorum*, *Serapias vomeracea* ve *Dactylorhiza romana* türlerine ait tohumlar, hormonsuz KC ve KC-N ile bunlara 0.5 mg/l GA₃ ilave edilmesiyle elde edilen besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Sakaroz miktarı 30 g/l olarak kullanılmıştır. Bu besin ortamlarına her türden 10'ar adet petri kutusuna tohum ekimi yapılmıştır.

Deneme VII: *Orchis coriophora*, *Dactylorhiza neschalkiorum*, *Orchis morio*, *Serapias vomeracea* ve *Orchis laxiflora* türlerine ait tohumlar, hormonsuz ½ MS, KC ve VW&DB ile bunlara 0.1 ve 0.5mg/l GA₃ ilave edilmesiyle elde edilen besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Tüm ortamlara 30 g/l sakaroz ilave edilmiştir. Bu besin ortamlarına her türden 10'ar adet petri kutusuna tohum ekimi yapılmıştır.

3.2.1.4 *In vitro* bitkilerin dış koşullara alıştırılması

Tohumların çimlenmesiyle oluşan ve önce protokorm, sonra da bitkiye dönüşen eksplantlar, dış koşullara alıştırılmak üzere zaman içerisinde farklı uygulamalara tabi tutulmuştur. Bu uygulamalar aşağıda açıklanmıştır:

I. Uygulama

Orchis coriophora, *Serapias vomeracea* ve *Dactylorhiza neschalkiorum* türlerine ait *in vitro* koşullarda gelişen bitkicikler, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait ısıtılmayan cam serada sisleme sistemine yerleştirilmiştir. İnce zerrecikler halinde belirli aralıklarla su püskürten bu sistemin altındaki 'perlit + pomza' karışımı içerisine köklerindeki agarlı besin ortamı yıkanıp temizlendikten sonra dikilen orkide

bitkileri (Şekil 3.21), ilk günler 5 dakikada bir kez, ilerleyen günlerde susuz geçen zaman aralığı dereceli olarak artırılan bir biçimde sislemeye bırakılmıştır. Seradaki ortalama sıcaklık 26 ± 5 °C olarak kaydedilmiştir.

Orchis coriophora türüne ait ve iki farklı gelişme döneminde bulunan (yumru oluşmuş ve oluşmamış aşamalarda) toplam 485 adet bitki, *Serapias vomeracea* türüne ait 80 adet bitki ve *Dactylorhiza neschalkiorum* türüne ait 225 adet bitki sisleme ünitesindeki yetiştirme ortamlarına aktarılmıştır.



Şekil 3.21 Sisleme ünitesindeki ‘perlit+pomza’ karışımına aktarılan orkide bitkileri

II. Uygulama

Doku kültüründe elde edilen orkide bitkiciklerinin dış koşullara alıştırılması ve gelişimlerinin sürdürülmesi amacıyla, farklı yetiştirme ortamlarının ve fide tutumunu artırmada kullanılan Crop-Set adlı ticari bir ürünün (*Lactobacillus acidophilus* sıvı fermentasyon ürünü 893.80 g/l, bitki ekstraktı 147.15 g/l, mangan sülfat 27.25 g/l, demir sülfat 16.35 g/l, bakır sülfat 5.45 g/l)’in etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla *Orchis morio* ve *Dactylorhiza neschalkiorum* türlerine ait bitkicikler, Bartın Üniversitesi Bartın Meslek Yüksekokulu Uygulama Seraları’nda, içerisinde yaklaşık 5 cm³ hacminde üç farklı yetiştirme ortamı (perlit, Bolu torfu ve vermikulit) bulunan viyollere aktarılmıştır (Şekil 3.22). Her viyolde tek bitkicik olacak şekilde dikim yapılmış, ayrıca örneklerin yarısı Crop-Set ile dikim öncesi muamele edilmiştir. Her uygulama için her bir türden

45 adet bitkicik kullanılmıştır. Seradaki ortalama sıcaklık 24 ± 4 °C ve ortalama nisbi nem %80 civarlarında ölçülmüştür.



Şekil 3.22 Farklı yetiştirme ortamlarında dış koşullara adaptasyon için serada aktarılmış orkide bitkicikleri

III. Uygulama

Üçüncü olarak ise *in vitro*'da elde edilen bitkilerin dış koşullara alıştırılması çalışması tümüyle sıcaklık ve nemi sabit kontrollü koşullarda (iklim odası) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla *Orchis laxiflora* ve *Orchis morio* türlerinden doku kültürü koşullarında elde edilen bitkiler vermikulit içine aktarılmıştır. Taşıyıcı olarak 140 x 185 x 70mm ebatlarındaki kapaklı (her kapakta 5 adet havalandırma deliği açılmış) PE (Polietilen) kutular kullanılmıştır. Kutularda 3 hafta tutulan fideler, Bolu torfu doldurulan saksılara aktarılmıştır. 16 cm çapındaki saksılara yaklaşık 1.5 l yetiştirme ortamı doldurulmuştur. Vermikulit içeren PE kutulara 4-6 adet bitki dikimi yapılmıştır. Dikimi tamamlanan tüm örnekler, can suyu verilerek, sıcaklığı 23 ± 1 °C, nem oranı %60-70 arasında değişen iklim odasına alınmıştır. Örneklerin günlük kontrolleri yapılarak bitkilerin su ihtiyacı yetiştirme ortamının nemine göre karşılanmıştır. Kapaklı PE kutularda kültüre alınan örneklerde ilk hafta kapak tamamen kapatılmış, ancak bitkilerde görülen gelişme geriliği nedeniyle 2. hafta yarı açık duruma getirilmiş ve el pulverizatörüyle günde 2-3 kez su püskürtülmüştür. 3. hafta ise tamamen kapaklar tümüyle açılmıştır. Kültüre

alınan tüm örneklerde canlılık durumları haftalık olarak kaydedilmiştir. Saksılara aktarılan bitkiler seraya alınmışlardır.

IV. Uygulama

Orkide türlerinin dış koşullara alıştırılması için yapılan bir diğer uygulama, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Seraları'nda yürütölmüş olup, iki farklı mikoriza (*Glomus etunicatum* ve *Glomus mossea*) ile bir alg (*Spirulina platensis*) türünün aktarma aşamasındaki ilavesidir. Mikoriza ve alg uygulamaları, Deneme VII'de bitkicik elde edilen *Orchis coriophora* (iki farklı gelişme dönemi), *Orchis morio* ve *Serapias vomaracea* türlerine ait örneklerde yapılmıştır. Bu amaçla 'Kontrol' grubu ile 'Alg' uygulaması yapılacak bitkicikler, viyol içërisine doldurulan sphagnum torfuna dikilmiştir. Alg uygulama grubuna ait olanlara, dikimden sonra her gün (8 hafta boyunca) bitkicik başına 5 ml olacak şekilde 'Spiriluna', solüsyon olarak sulama suyu şeklinde verilmiştir. 'Mikoriza' uygulamasında ise, dikim öncesi viyoldeki her bir göze önce mikoriza aşılana 20 g kompost (bitkicik başına 20 g mikoriza inokulumu) konulmuş, üzerine spagnum torfu ilave edildikten sonra bitkicikler dikilmiştir. Bu şekilde kurulan denemede her uygulama için her bir türden 120 adet bitkicik kullanılmıştır.

Viyollere dikimi yapılan bitkicikler kontrolsüz koşullara sahip bir cam serada, yerden 1 m yükseklikteki tezgahların üzerine konulmuştur. Dikimden itibaren sekiz hafta süresince haftalık gözlemler yapılmış ve her uygulamadaki canlı bitkicikler kaydedilerek toplam bitkicik sayısına oranlanmıştır. Deneme süresince serada ortalama hava sıcaklığı 27 ± 6 °C olmuş, oransal hava nemi ise %80'in üzerinde seyretmiştir. Şekil 3.23'te viyollere dikimi yapılmış bitkiciklerden görüntüler verilmiştir.



Şekil 3.23 Mikoriza ve alg uygulaması yapılmış orkide bitkiciklerinin dış koşullara alıştırma aşamasına ait Adana’da yapılan denemeye ait görüntüler

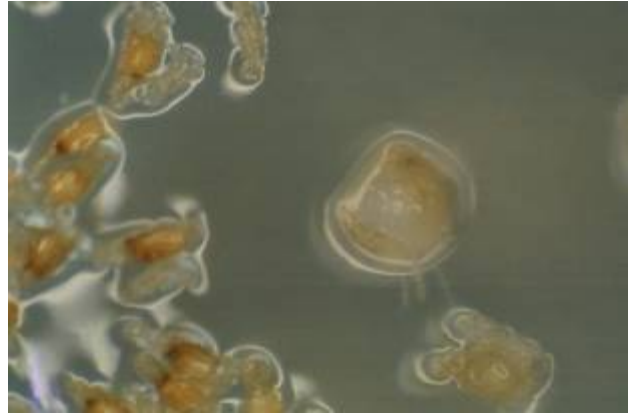
3.2.1.5 Değerlendirmelerin yapılması

Denemelerde uygulamalara göre çimlenme, protokorm ve bitkicik sayıları belirlenerek toplam tohum sayısına oranlanmıştır. Bunlar metin içerisindeki çizelgelerde çimlenme oranı (%), protokorm oluşturma oranı (%) ve bitki gelişme oranı (%) olarak verilmiştir. Tohum kabuğunun çatlayarak embriyonun beyaz bir küre şeklini aldığı dönem “çimlenme”, büyüme konisinin belirginleştiği dönem “protokorm”, protokormlardan yaprakların geliştiği dönem ise “bitkicik” olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.24).

Faktöriyel tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulan denemelerden elde edilen sayısal değerler, Statistica 6.0 istatistik programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş ve uygulamalar arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önemlilik derecesi $p \leq 0.05$ hata sınırına göre ortaya konulmuştur. Bunun için Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmış ve farklılık dereceleri, %0.5 düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir. Yüzde olarak oransal değerlendirme yapıldığından bunların varyans analizlerinde açı transformasyon değerleri kullanılmıştır.



a



b



c



d

Şekil 3.24 a ve b. Orkide tohumlarının in vitro’da çimlenmesi, c. Protokorm oluşumu, d. Bitki gelişimi

3.2.2 Salep elde edilen orkideleri doğal koşullarda çoğaltma çalışmaları

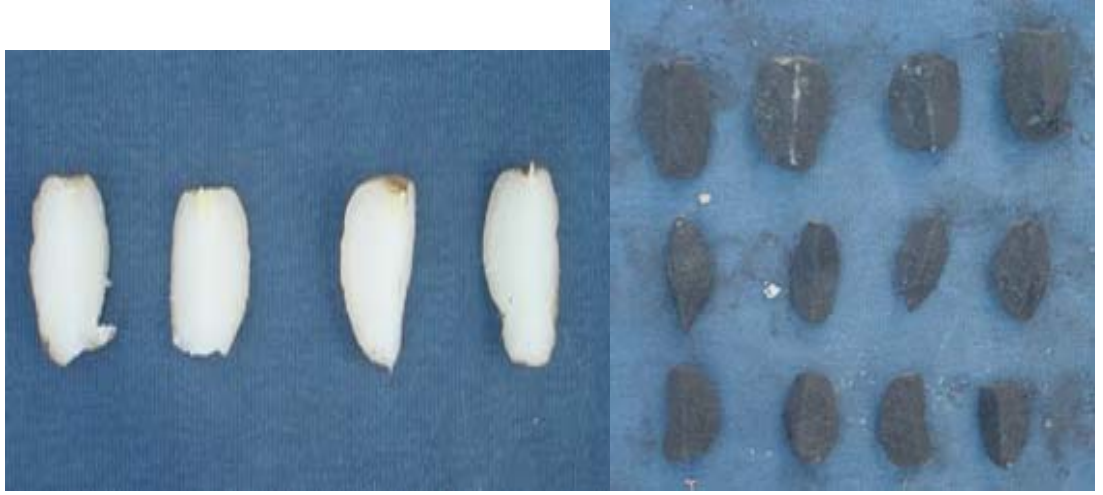
Doku kültürü yoluyla salep orkidesi tohumlarının çimlendirilmesi çalışmalarının yanı sıra, bu bitkilerin yumrularından yararlanarak vegetatif yollarla çoğaltma konusunda da deneyler yapılması amaçlanmıştır. Doğal koşullarda (*in vivo*) çoğaltıma yönelik çalışmalarda iki değişik yöntem kullanılmıştır. Bunlardan birincisi, orkide bitkilerinin çiçeklenmesi ile birlikte olgunlaşma aşamasına geçen yeni oluşmuş yumrularının birkaç parçaya ayrılarak bölünmesidir. İkincisi ise, yeni oluşan yavru yumrunun kopartılıp ana yumru üzerinde bırakılan bitkinin yeniden doğal ortamında geliştirilmesidir. Böylece

bitkinin bir sonraki yıl tekrar yeni yumru oluşturabilme olasılığı incelenmeye çalışılmıştır. Uygulamalar şu şekilde yapılmıştır:

Yeni yumruların bölünmesi: Bitkiler bu yöntemle hem sera koşullarında (Bartın Meslek Yüksekokulu Uygulama Seraları), hem de doğal ortamlarında çoğaltılmaya çalışılmıştır. Orkidelerin, taze yumruları toplanarak birbirine yakın büyüklükte olanlar gruplanmıştır (şekil 3.25). Bu yumrulara iki değişik bölme işlemi uygulanmıştır. Bunlardan birincisinde yumrular, her bir yumru parçası büyüme konisinden bir miktar içerecek şekilde dikey olarak dört parçaya bölünmüştür. İkinci yöntemde ise yumru ‘artı’ şeklinde dikey ve yatay kesimlerle toplam dört parçaya ayrılmıştır. Bölme işlemi tamamlanan yumruların bir kısmı, odun kömürü tozuna batırıldıktan sonra yetiştirme ortamlarına dikilmiştir (şekil 3.26).



şekil 3.25 Bölünmek üzere hazırlanmış orkide yumruları



Şekil 3.26 Dikey olarak bölünen yumru parçaları ve odun kömürü tozuna batırıldıktan sonraki görünüşleri

Doğal arazi ortamında kurulan denemede *Anacamptis pyramidalis*, *Serapias vomeracea* ve *Orchis coriophora* türleri kullanılmıştır. Toprağın yapısı mümkün olduğunca bozulmadan yumru parçaları toprağa sıralar halinde dikilmiştir. Dikim sonrası toprak üstünde bir ağ sistemi kurularak dış etkenlerden korunmaya çalışılmış, ayrıca üzerine etiketler bağlanarak her yumru parçasının yeri belirlenmiştir (Şekil 3.27).



Şekil 3.28 Bölünen yumru kısımlarının doğal ortamda kültüre alınması

Kontrollü koşullarda (serada) kurulan denemede ise *Anacamptis pyramidalis*, *Serapias vomeracea*, *Dactylorhiza romana*, *Orchis coriophora*, *Orchis purpurea* ve *Orchis pinetorum* türleri kullanılmıştır. Yumru parçaları, içerisinde perlit, Bolu torfu ve vermikulit bulunan viyollerde kültüre alınmış ve tezgahlar üzerine dizilmişlerdir.

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 4 yumru parçası olacak şekilde planlanmıştır. Doğal arazi koşullarında kurulan denemede ilk iki ay boyunca haftalık, daha sonra iki haftada bir kontrol yapılmış; serada kurulan denemede ise ilk iki ay boyunca günlük kontroller yapılarak bölünen yumru parçalarından toprak yüzeyine çıkış (sürme) gözlemleri yapılmıştır. Denemeler 1 yıl boyunca bekletilmiş, gözlemlere devam edilmiş, ancak gelişme olmaması nedeniyle birinci yılın sonunda deneme sonlandırılmıştır.

Ana yumruya sahip bitkinin doğal ortamda geliştirilmesi: *Anacamptis pyramidalis*, *Serapias vomeracea* ve *Orchis coriophora* türlerinde yeni yumru alındıktan sonra ana yumruyu taşıyan çiçekli bitki doğal ortamlarına korunaklı bir orman alanı içerisinde sıralar halinde dikilmiştir. Dikim sonrası toprak üstünde bir ağ sistemi kurulmuş ve her bitkinin yeri tespit edilmiştir.

Deneme 3 tekerrürlü ve her tekerrürde ana yumruya sahip 5 adet çiçekli bitki olacak şekilde planlanmıştır. Denemede, ana yumruya sahip çiçekli bitkinin yaşamaya devam etmesi ve bir sonraki vejetasyon periyodunda yeni yumru oluşturma yeteneğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kurulan deneme, haftalık kontrolleri yapılarak ertesi yıl Ağustos ayında sonlandırılmıştır.

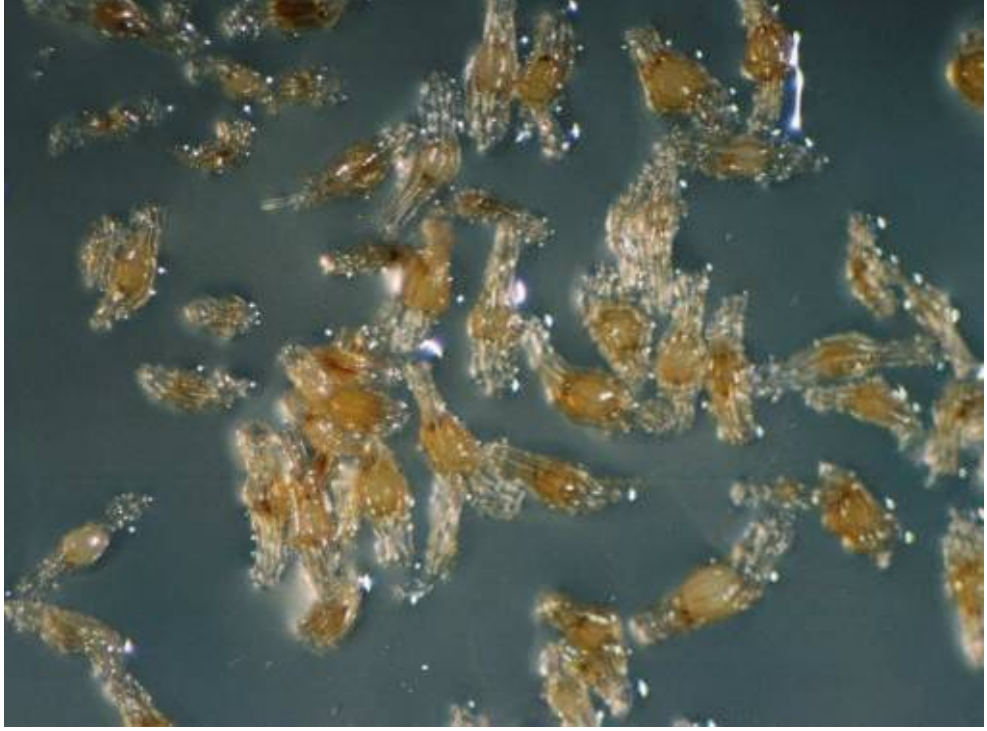
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Batı Karadeniz Bölgesi doğal alanlarında yetişen salep orkidelerinde tohum çimlendirme ve bitki elde etme çalışmaları *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yapılan bir dizi uygulama ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular, ana ve alt başlıklar çerçevesinde, çizelge, grafik ve şekiller ile desteklenerek açıklanmıştır.

4.1 *In vitro* Koşullarda Bitki Elde Etmek için Yapılan Çalışmalar

Tohumlarının çimlendirilmesi aşamasında toprak funguslarına gereksinim duyan ve simbiyotik bir çimlenme süreci geçiren salep orkidelerinin asimbiyotik olarak *in vitro* koşullarda, doku kültüründe çimlendirilmesi amacıyla birbirinden bağımsız yedi adet deneme kurulmuştur. Her bir denemenin kurulması aşamasında, önceki deneylerden elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulmuş ve besin ortamı bileşimleri, ışıklandırma düzeni, farklı türler ile oluşturulan yeni kombinasyonlar kullanılmıştır. Bir yandan yeni uygulamalar denenirken, bir yandan da tekrarlamalar ile elde edilen bulgular teyit edilmeye çalışılmıştır. Esas olarak çok sayıdaki orkide türünde, literatürde belirtilen belli başlı besin ortamı bileşimleri ve çimlenme oranını artırmak amacıyla besin ortamına gibberellik asit ilave edilmesi konularında yoğunlaşmıştır. Böylece dünyada ve ülkemizde yapılmış olan önceki çalışmaların ışığında, Batı Karadeniz Bölgesi'nde yetişen karasal orkidelerin doku kültürüyle çoğaltılabilme potansiyelleri ortaya konulmaya gayret edilmiştir.

Kültüre alınan tohumların içerisindeki embriyolar, ilk hafta içerisinde hafifçe şişmeye başlamışlardır. Endospermi olmadığı net olarak görünen tohumların orta kısmında embriyolar şiştiğinde bu tohumların canlı oldukları anlaşılmıştır. Bazı tohumların da tamamen boş yapıda oldukları rahatlıkla gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 *In vitro* koşullarda kültüre alınan orkide tohumlarının embriyo hacimlerindeki artış ve boş tohumlardan ayırt edilme aşaması

Doku kültürü çalışmalarından elde edilen bulgular, ‘denemeler bazında’ ve ‘türler bazında’ olmak üzere iki farklı biçimde sunulmuştur. Birbiri ardına kurulan yedi denemedeki çimlenme oranları, protokorm oranları ve bitki gelişme oranları 4.1.1 – 4.1.7 no’lu alt başlıklarda ayrı ayrı verilmiştir.

4.1.1 Deneme I

4.1.1.1 Çimlenme oranı

Orchis pinetorum, *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza nieschalkiorum*, *Orchis purpurea*, *Orchis pallens*, *Orchis tridentata* türlerine ait tohumlar, kültüre alma işleminden üç ay sonra incelenerek çimlenme oranları belirlenmiştir. Buna göre; farklı orkide türü, besin ortamı bileşimi ve ‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonunun çimlenme oranları üzerine etkisi incelenmiş; yapılan istatistiksel analizler sonucunda tür, besin

ortamı ve ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonun %5 düzeyinde önemli olduğu ortaya konmuştur.

Her bir orkide türüne ait tohumların, denemede yer alan besin ortamlarının tümündeki sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi ile elde edilen verilerin karşılaştırılması sonucunda ‘türlerin çimlenme oranına etkisi’ ortaya konmuştur. Orkide türlerinin çimlenme oranı üzerindeki etkisi incelendiğinde, bu oranın % 17.43 ile % 1.28 arasında değiştiği görülmektedir (sırasıyla *D. nieschalkiorum* ve *O.tridentata*) (Çizelge 4.1). Bu denemede *D. nieschalkiorum*, diğer türlerden oldukça belirgin biçimde farklılık göstermiş, en yüksek çimlenme oranına sahip olmuştur. Bunu *O. pinetorum* izlemiş (% 6.95), *A. pyramidalis* üçüncü sırada yer alırken (% 4.60) diğer türler gerilerde kalmıştır.

Çizelge 4.1 Deneme I’de, farklı orkide türlerine ait tohumların dört besin ortamında çimlenme oranı (%)

Tür	Çimlenme oranı (%)
<i>Orchis pinetorum</i>	6.95 b
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	4.60 c
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	17.43 a
<i>Orchis purpurea</i>	2.19 d
<i>Orchis pallens</i>	2.66 d
<i>Orchis tridentata</i>	1.28 e

Türler bazındaki farklılığın yok sayılmasıyla oluşturulan ve besin ortamları arasındaki sonuçların toplu olarak değerlendirilmesini sağlayan karşılaştırmada, besin ortamlarının genel performansları anlaşılmaya çalışılmıştır. Farklı besin ortamlarının, ‘Deneme I’de yer alan tüm türlere ait tohumların çimlenme oranları üzerindeki etkileri farklı olmuş; en yüksek çimlenme oranı, aynı istatistiksel grup içinde yer alan VW&DB (% 7.34) ile KC (% 6.5) besin ortamlarından elde edilmiştir. Bunları % 5.17’lik çimlenme oranı ile ½ MS ortamı izlemiş ve en düşük çimlenme oranı değeri % 4.41 ile MS ortamında belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Deneme I’de farklı besin ortamlarının altı orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
½ MS	5.17 bc
MS	4.41 c
KC	6.50 ab
VW&DB	7.34 a

Yapılan istatistik analizleri, ‘Tür + Besin ortamı’ düzeyinde interaksyon bulunduğunu ortaya koymuştur. Esasen interaksyon bulunan tablolarda diğer parametrelerin tek başlarına ifade ettikleri sonuçlar üzerinde yorum yapılmasına gerek duyulmamakta ise de, bizim çalışmamızda türlerin çimlenme ve bitki oluşturmaya yatkınlıkları ve kullanılan besin ortamı bileşimlerinin genel olarak yeterlilikleri de incelendiğinden, yukarıdaki çizelgeler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Çizelge 4.3’te ise Deneme I’de kullanılan orkide türleri ile besin ortamı kombinasyonlarından elde edilen çimlenme oranları detaylı bir biçimde verilmiş, aralarındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre harflendirilerek gösterilmiştir. ‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonu % 5 seviyesinde önemli bulunan bu deneme aşamasında en yüksek çimlenme oranı % 24.41 ile ‘*D. nieschalkiorum* + VW&DB’ ve % 20.34 ile ‘*D. nieschalkiorum* + KC’ kombinasyonlarından elde edilmiştir. *D. nieschalkiorum* türü, ½ MS ve MS ortamlarında da istatistiksel olarak önemli olmakla birlikte yine de en başarılı iki kombinasyona yakın çimlenme oranlarına sahip olmuştur. *O. pinetorum* türünün besin ortamlarıyla olan kombinasyonları ile ‘*A. pyramidalis* + KC’ kombinasyonu “orta derecede çimlenme başarısına sahip olanlar” olarak gruplaşma göstermişlerdir (% 9.58-4.50 arasında çimlenme oranı). Denemede yer alan diğer kombinasyonlar düşük çimlenme oranlarına sahip olmuştur. *O. purpurea*, *O. pallens* ve *O. tridentata* türlerine ait tohumlar, genel bir değerlendirmeye MS ve ½ MS ortam bileşimlerinde %0.80-2.28 arasında çok düşük çimlenme oranları sergilemiştir. KC ve VW&DB ortamları, *O. purpurea* ve *O. pallens* türlerinde çimlenme değerleri bakımından daha olumlu bir etkiye sahip olmuştur (% 1.56- 4.48).

Çizelge 4.3 Deneme I’de, ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
<i>Orchis pinetorum</i>	½ MS	7.27 cd
	MS	9.58 c
	KC	6.46 cd
	VW&DB	4.50 d-f
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	½ MS	4.19 d-f
	MS	2.19 f-h
	KC	5.76 c-e
	VW&DB	6.27 cd
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	½ MS	14.81 b
	MS	10.16 c
	KC	20.34 ab
	VW&DB	24.41 a
<i>Orchis purpurea</i>	½ MS	1.74 f-h
	MS	0.98 h
	KC	1.56 f-h
	VW&DB	4.48 d-f
<i>Orchis pallens</i>	½ MS	2.22 f-h
	MS	2.28 f-h
	KC	3.62 d-g
	VW&DB	2.51 e-h
<i>Orchis tridentata</i>	½ MS	0.80 h
	MS	1.25 gh
	KC	1.23 h
	VW&DB	1.85 f-h

4.1.1.2 Protokorm oluşturma oranı

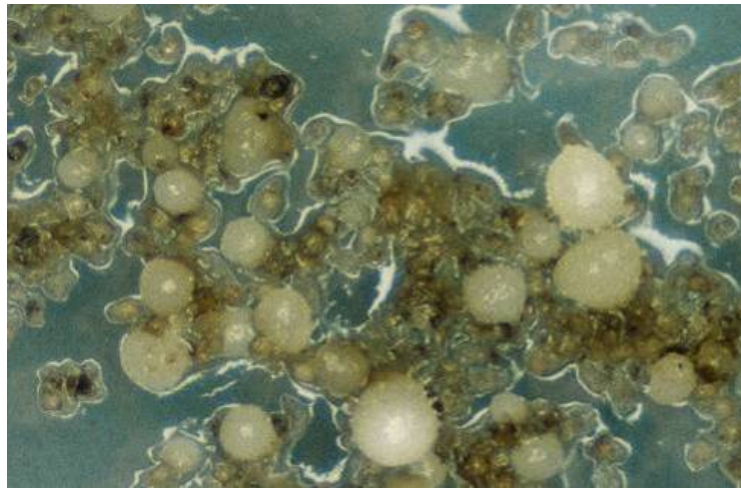
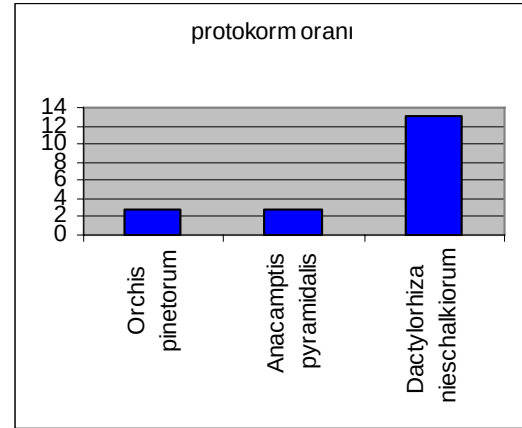
O. pinetorum, *A. pyramidalis*, *D.nieschalkiorum*, *O. purpurea*, *O. pallens*, *O. tridentata* türleri ile kurulan I.Deneme aşamasında bütün türlerde az veya çok çimlenme meydana gelmiş olmakla birlikte, yalnızca üç türde (*O. pinetorum*, *A.pyramidalis* ve *D.nieschalkiorum*) protokorm elde edilebilmiştir. Protokorm oluşturma oranı bakımından ortaya çıkan farklılıkların değerlendirilmesi amacıyla yapılan varyans analizleri sonucunda türler arasında ve ‘Tür + Besin ortamı’ kombinasyonları arasındaki

farklılığın, % 5 seviyesinde istatistiksel anlamda önemli olduğu; besin ortamları arasındaki farklılığın ise tesadüften kaynaklandığı belirlenmiştir.

Protokorm oluşturan türler arasında *D.nieschalkiorum*, bu özellik bakımından diğer iki türden üstün bulunmuştur (% 13.10). *A. pyramidalis* (% 2.86) ile *O. pinetorum* (% 2.83) türleri, aralarında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmaksızın düşük protokorm oluşturma kapasitesi göstermişlerdir (Çizelge 4.4, Şekil 4.2). Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de protokorm oluşturma aşamasında (tohum ekiminden üç-dört ay sonra) yapılan gözlemlerde değişik türlerden elde edilen bazı görüntülere yer verilmiştir.

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2 Deneme I’de, farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Protokorm Oluşturma oranı (%)
<i>O. pinetorum</i>	2.83 b
<i>A. pyramidalis</i>	2.86 b
<i>D. nieschalkiorum</i>	13.10 a



Şekil 4.3 *Orchis pinetorum*’da protokorm oluşumu (0.67 X 10 büyütme)



a



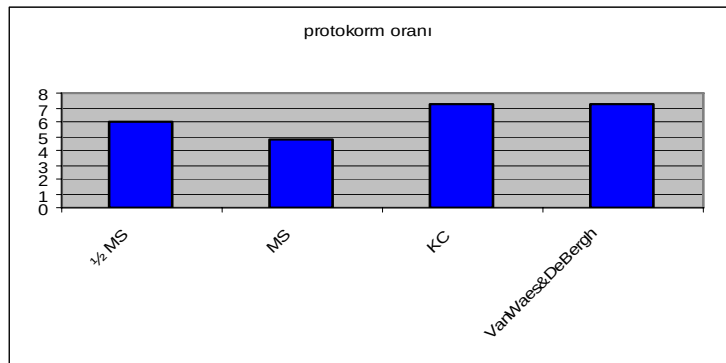
b

Şekil 4.4 a. *Dactylorhiza neschalkiorum*'da protokorm oluşumu (1.5 X 10)
b. *Anacamptis pyramidalis* 'de protokorm oluşumu (3 X 10 büyütme)

Farklı besin ortamlarının, 'Deneme I'de protokorm oluşturan üç orkide türünün protokorm oluşturma kapasitesini etkileme bakımından bir etkisi olmamıştır. Üç türün (*D.neschalkiorum*, *A. pyramidalis*, *O. pinetorum*) protokorm sayıları birlikte değerlendirilerek besin ortamı bazında yorumlandığı bu analiz aşamasında; MS, ½ MS, KC ve VW&DB ortamlarından hiçbirisi özel olarak öne çıkmamıştır. Her ne kadar KC ve VW&DB ortamları, çimlenme oranlarında olduğu gibi daha olumlu etki yapmışsa da, sayısal değerlerin ve tüm tekerrürlerin birlikte değerlendirilmesi söz konusu olduğunda istatistiksel olarak önemli bir fark çıkmamıştır (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5).

Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5 Deneme I'de, farklı besin ortamlarının üç orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

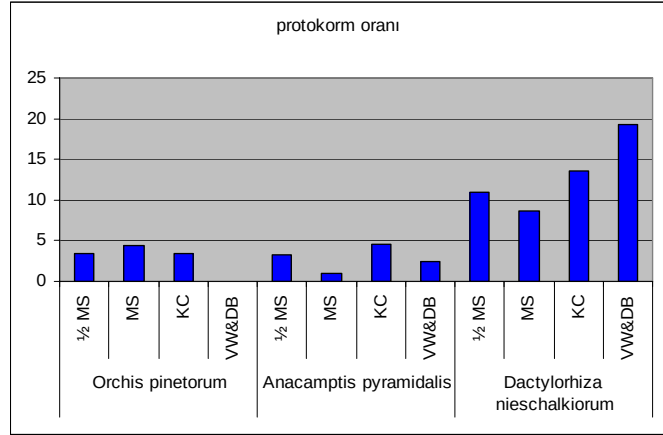
Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
½ MS	5.93 a
MS	4.70 a
KC	7.19 a
VW&DB	7.23 a



Protokorm oluşturma oranı bakımından ‘Tür + Besin ortamı’ düzeyinde interakşiyon bulunduğu belirlenmiştir. Protokorm elde edilen üç tür ve dört farklı besin ortamı bileşimi kombinasyonu arasında % 19.21 ile en yüksek orana sahip olan kombinasyon ‘*D. nieschalkiorum* + VW&DB’ olmuştur. Aynı türün KC ve ½ MS ile yaptığı kombinasyonlar da aynı istatistiksel grup içinde yer almış ve diğerlerine göre üstünlük sağlamışlardır. ‘*O. pinetorum* + VW&DB’; denemedeki protokorm oluşturmayan diğer kombinasyonlara benzer davranış sergilemiş, diğer kombinasyonlar ise %1.04 ile %8.70 arasında protokorm oranlarına sahip olmuşlardır (Çizelge 4.6 ve şekil 4.6).

Çizelge 4.6 ve şekil 4.6 Deneme I’de ‘Tür + Besin ortamı’ interakşiyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>O. pinetorum</i>	½ MS	3.47 cd
	MS	4.36 cd
	KC	3.47 cd
	VW&DB	0.00 e
<i>A. pyramidalis</i>	½ MS	3.30 cd
	MS	1.04 de
	KC	4.61 cd
	VW&DB	2.47 d
<i>D. nieschalkiorum</i>	½ MS	11.02 ab
	MS	8.70 bc
	KC	13.49 ab
	VW&DB	19.21 a

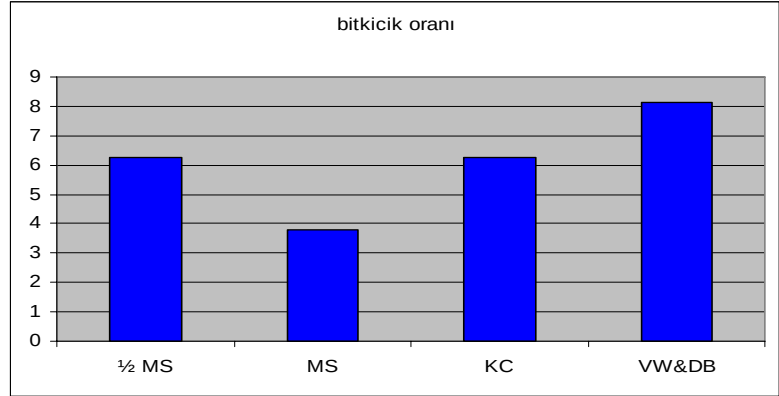


4.1.1.3 Bitki gelişme oranı

Deneme I’de çimlenme aşamasında altı tür kullanılmış, bunların tümünde değişen oranlarda çimlenme oluşmuş, protokorm oluşumu sadece üç türde meydana gelmiş ve bitkiye dönüşme ise *D. nieschalkiorum* türünde elde edilebilmiştir. Bu türde farklı besin ortamlarının bitki gelişme oranına etkisini ortaya koymak üzere yapılan varyans analizi sonucunda, besin ortamları arasındaki farklılığın önemli olmadığı anlaşılmıştır ($p \leq 0.05$) (Çizelge 4.7 ve şekil 4.7).

Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7 Deneme I’de, dört farklı besin ortamının *D. nieschalkiorum* türünde bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	6.28 a
MS	3.79 a
KC	6.25 a
VW&DB	8.11 a



D. nieschalkiorum türünde doku kültürü koşullarında oluşan protokormlar, MS ortamında en düşük olmak kaydıyla (%3.79), tüm ortamlarda bitkiye dönüşmüştür. Bitki gelişme oranı KC ortamında %6.25, ½ MS ortamında 6.28 ve VW&DB ortamında %8.11 olmuştur.

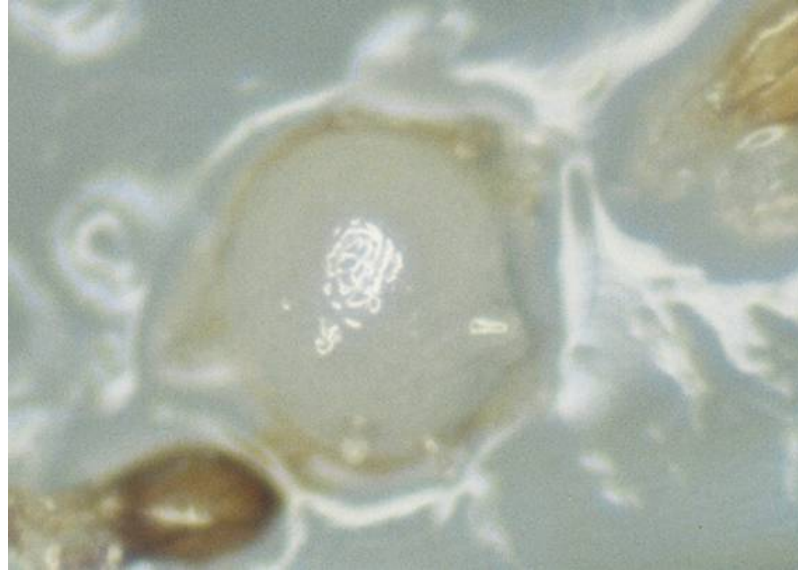
4.1.2 Deneme II

Deneme I’den elde edilen bulgular, mevcut tohum miktarı ve doğa surveyleri sırasında bulunarak tohum temin edilen yeni türler birlikte değerlendirilerek planlanan Deneme II’de toplam beş salep orkidesi türü yer almıştır. Bunlardan *A. pyramidalis* protokorm oluşumu bakımından oldukça olumlu bulunmasına karşın bitki gelişimi sağlanamayan bir türdür. *O. pallens* ve *O. purpurea* türlerinde çimlenme oranı düşük olduğu gibi protokorm oluşumu da elde edilememiştir. Denemeye iki yeni tür ilave edilmiş, *Orchis laxiflora* ve *Serapias vomeraceae* türlerine ait tohumlar da bu deneme aşamasında kullanılmıştır. Deneme I’de genel olarak performansı yüksek bulunan ½ MS ve KC ortamları seçilmiş ve GA₃ (0.1mg/l) ile birlikte deneylerde kullanılmıştır.

4.1.2.1 Çimlenme oranı

A. pyramidalis, *O. laxiflora*, *S. vomeraceae*, *O. pallens*, *O. purpurea*, türlerine ait tohumlar, kültüre alma işleminden üç ay sonra incelenerek çimlenme oranları belirlenmiştir. Farklı orkide türü, besin ortamı bileşimi ve ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun çimlenme oranları üzerine etkisi incelenmiş; yapılan istatistiksel analizler sonucunda tür, besin ortamı ve ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun %5 düzeyinde önemli olduğu ortaya konmuştur.

Farklı orkide türlerinin çimlenme oranı üzerindeki etkisi incelendiğinde, bu oranın % 48.12 (*S. vomeraceae*) ile % 1.25 (*O. purpurea*) arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.8). Bu denemede *S. vomeraceae*, diğer türlerden belirgin biçimde farklılık göstermiş, en yüksek çimlenme oranına sahip olmuştur (Şekil 4.8). Bunu *O. laxiflora* izlemiş (% 11.67), diğer üç tür ise (*A. pyramidalis*, *O. pallens*, *O. purpurea*) %2’den daha az çimlenme oranı ortaya koyabilmiştir.



Şekil 4.8 *Serapias vomeracea ssp. orientalis* türüne ait tohumlarda çimlenme (4 X 10 büyütme)

Çizelge 4.8 Deneme II’de, farklı orkide türlerine ait tohumların dört besin ortamında çimlenme oranı (%)

Tür	Çimlenme oranı (%)
<i>A. pyramidalis</i>	1.64 c
<i>O. laxiflora</i>	11.67 b
<i>S. vomeraceae</i>	48.12 a
<i>O. pallens</i>	1.83 c
<i>O. purpurea</i>	1.25 c

Farklı besin ortamlar ile bu ortamlara ilave edilen GA₃ uygulamalarının çimlenme oranlarına etkileri de farklı olmuş, en yüksek çimlenme oranı % 19.20 ile KC ortamından elde edilmiş, bunu % 11.73 ile ½ MS+0.1 GA₃ ve % 11.51 ile KC+0.1 GA₃ izlemiş, en düşük çimlenme oranı ise % 9.17 ile ½ MS ortamından elde edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 Deneme II’de farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin beş orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
½ MS	9.17 c
½ MS+0.1 GA ₃	11.73 b
KC	19.20 a
KC+0.1 GA ₃	11.51 b

‘Tür + Besin ortamı’ düzeyinde interaksiyon bulunmuştur (Çizelge 4.10). En yüksek çimlenme oranı % 76.85 değeri ile KC ortamına ekilen *S. vomeraceae* tohumlarından elde edilmiştir. Bunun ardından gelen en yüksek çimlenme değerleri yine aynı türde; ½ MS+0.1 GA₃, KC+0.1 GA₃ ve ½ MS ortamlarında ortaya çıkmıştır (sırasıyla %52.38, 32.72 ve 30.55).

Çizelge 4.10 Deneme II’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	½ MS	0.13 g
	½ MS+0.1 GA ₃	0.33 fg
	KC	0.42 e-g
	KC+0.1 GA ₃	5.70 e
<i>Orchis laxiflora</i>	½ MS	13.09 d
	½ MS+0.1 GA ₃	3.55 ef
	KC	15.60 d
	KC+0.1 GA ₃	14.44 d
<i>Serapias vomeraceae</i>	½ MS	30.55 c
	½ MS+0.1 GA ₃	52.38 b
	KC	76.85 a
	KC+0.1 GA ₃	32.72 c
<i>Orchis pallens</i>	½ MS	1.19 e-g
	½ MS+0.1 GA ₃	1.99 e-g
	KC	2.35 e-g
	KC+0.1 GA ₃	1.79 e-g
<i>Orchis purpurea</i>	½ MS	0.90 e-g
	½ MS+0.1 GA ₃	0.41 e-g
	KC	0.80 e-g
	KC+0.1 GA ₃	2.91 ef

Deneme II’de, çimlenme oranları bakımından en başarılı bulunan *S. vomeraceae* türünden sonra ikinci sırada *O. laxiflora* yer almıştır. Bu türün KC, KC+0.1 GA₃ ve ½ MS ortamına ekilen tohumlarının sırasıyla %15.60, 14.44 ve 13.09’u, aralarında p≤0.05 seviyesinde farklılık bulunmaksızın çimlendiği belirlenmiştir. ½ MS+0.1 GA₃ ile yaptığı kombinasyon ise denemenin diğer kombinasyonları ile aynı gruplar içinde kalmış ve başarılı bulunmamıştır. Bir önceki denemede çimlenme oranı düşük bulunan ve bitkicik elde edilemeyen üç orkide türünde, bu denemede de çimlenme oranları çok düşük olmuştur (% 0.13-5.70). Yine önceki denemede *A. pyramidalis* türünde KC ortamında elde edilen (%5.76) orana yakın bir değer, bu defa aynı ortamın 0.1 GA₃ katkılı olan kombinasyonundan elde edilmiştir (%5.70). KC ortamına ekimi yapılan *A.pyramidalis* tohumlarından Deneme I’de %5.76 çimlenme oranı belirlendiği halde, Deneme II’de hormonsuz KC ortamından sadece %0.42 oranında çimlenme sağlanabilmiştir.

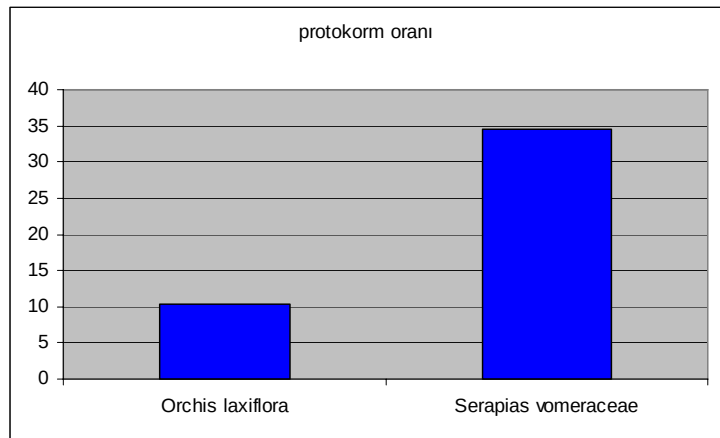
4.1.2.2 Protokorm oluşturma oranı

Çimlenme oranı düşük olan ve bir önceki deneme aşamasında (Deneme I) protokorm elde edilemeyen üç türde (*A. pyramidalis*, *O. pallens*, *O. purpurea*), bu denemede de protokorm oluşumu gerçekleşmemiştir. Deneme II’de ilk kez tohum ekimi yapılan *O. laxiflora* ve *S. vomeraceae* türleri protokorm oluşturmuştur. Protokorm elde edilen bu iki orkide türünde yapılan istatistiki analiz sonucunda; türler, besin ortamları ve ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonları arasındaki farklar % 5 seviyesinde önemli bulunmuştur.

S. vomeraceae’de protokorm oluşumu Deneme II’de kullanılan tüm ortamlar ortalaması bakımından % 34.60 ile, *O. laxiflora*’dan (%10.39) önemli düzeyde yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.9).

Çizelge 4.11 ve Şekil 4.9 Deneme II’de, farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

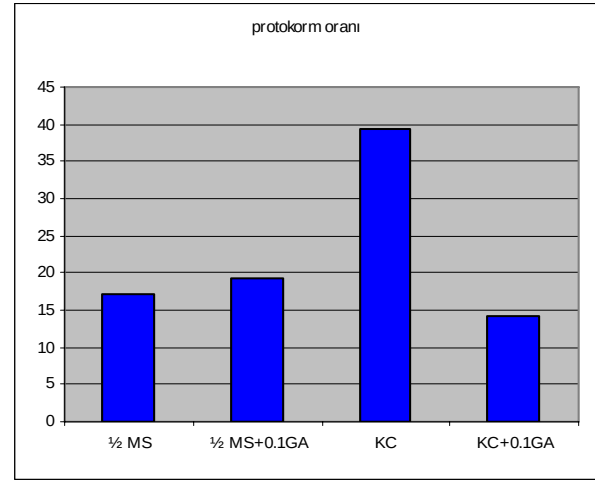
Tür	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Orchis laxiflora</i>	10.39 b
<i>Serapias vomeraceae</i>	34.60 a



KC ve ½ MS ortamlarının hormonsuz olarak kullanılması veya 0.1 mg/l GA3 ilave edilmesiyle oluşturulan bileşimlerdeki protokorm oluşturma oranlarını gösteren sayısal değerler ve grafik Çizelge 4.12 ve Şekil 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.12 ve Şekil 4.10 Deneme II’de, farklı besin ortamı bileşimlerinin iki orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
½ MS	17.07 b
½ MS+0.1GA ₃	19.41 b
KC	39.25 a
KC+0.1GA ₃	14.25 b

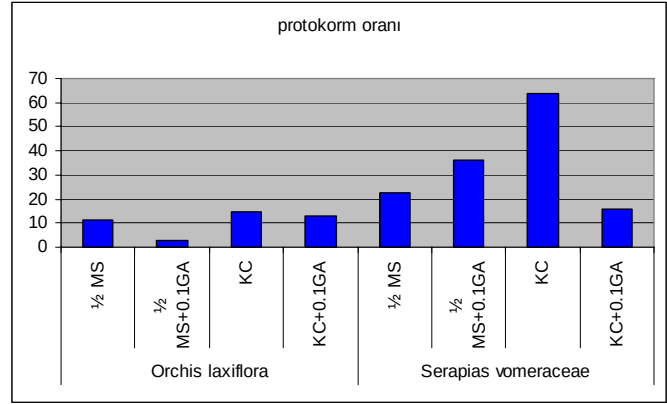


S.vomeraceae ve *O.laxiflora* türlerinden elde edilen protokorm sayıları birlikte değerlendirildiğinde, ortam bileşimleri arasındaki farklılık incelenebilmiştir. Buna göre en yüksek protokorm oluşturma oranının % 39.25 ile KC ortamından elde edildiği anlaşılmıştır. Diğer üç ortam bileşimi, aralarında önemli farklılık bulunmaksızın %19.41 ile 14.25 arasında protokorm oluşturma oranlarına sahip olmuştur.

‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonları istatistiksel olarak önemli bulunduğundan, her bir kombinasyondaki protokorm oluşturma oranı Çizelge 4.13 ve Şekil 4.11’de ayrıca gösterilmiştir.

Çizelge 4.13 ve Şekil 4.11 Deneme II’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Orchis laxiflora</i>	½ MS	11.34 cd
	½ MS+0.1GA ₃	2.79 d
	KC	14.57 c
	KC+0.1GA ₃	12.87 c
<i>Serapias vomeraceae</i>	½ MS	22.81 bc
	½ MS+0.1GA ₃	36.02 b
	KC	63.93 a
	KC+0.1GA ₃	15.63 c



Çizelgeden de izleneceği gibi en yüksek protokorm oluşturma oranı % 63.93 ile KC ortamında kültüre alınan *S.vomeraceae* türünde meydana gelmiştir. Aynı tür ½ MS+0.1 GA₃ ortamında %36.02, ½ MS ortamında % 22.81 ve KC+0.1 GA₃ ortamında % 15.63 oranında protokorm oluşumu sağlamıştır. Bu kombinasyonları, *O.laxiflora*’nın KC (%14.57), KC+0.1 GA₃ (%12.87) ve ½ MS (%11.34) ortamındaki protokorm oluşturma oranları izlemiştir. ‘*O.laxiflora* + ½ MS+0.1 GA₃’ kombinasyonu, protokorm oluşum oranı bakımından II.Deneme aşamasında en düşük başarıyı göstermiştir.

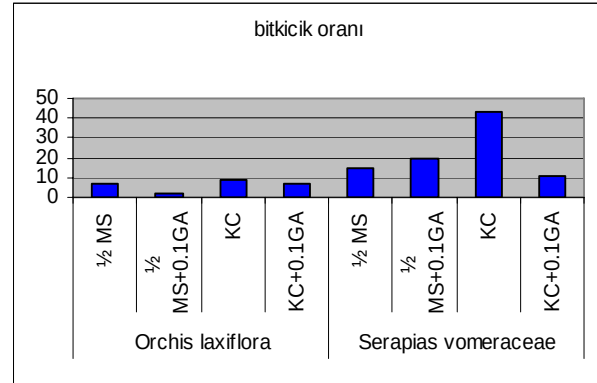
4.1.2.3 Bitki gelişme oranı

Deneme II’de çimlenme aşamasında beş tür kullanılmış fakat protokorm oluşumu sadece iki türde meydana gelmiş ve bu türlerin her ikisinde de bitkicik oluşumu sağlanmıştır. Bitki gelişme oranı bakımından; türler, besin ortamları ve ‘Tür + Besin ortamı’ kombinasyonları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan % 5 hata seviyesinde önemli bulunmuştur.

KC ve ½ MS ortamlarına 0.1mg/l GA₃ ilave edilmesi veya edilmemesi ile oluşturulan dört farklı besin ortamı bileşiminin *S.vomeraceae* ve *O.laxiflora* türlerinde bitki gelişme oranı üzerine etkisi, Çizelge 4.14’te ve Şekil 4.12’deki grafikte gösterilmiştir.

Çizelge 4.14 ve Şekil 4.12 Deneme II’de, dört farklı besin ortamı bileşiminin *S.vomeraceae* ve *O.laxiflora* türlerinde bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Bitki gelişim oranı (%)
<i>Orchis laxiflora</i>	½ MS	6.91 cd
	½ MS+0.1GA ₃	1.84 d
	KC	8.39 cd
	KC+0.1GA ₃	7.31 cd
<i>Serapias vomeraceae</i>	½ MS	15.14 bc
	½ MS+0.1GA ₃	20.02 b
	KC	42.80 a
	KC+0.1GA ₃	11.14 bc



Deneme II’de en yüksek protokorm oluşturma oranı veren *S. vomeraceae* türü, bitki gelişim oranı bakımından da *O.laxiflora* türüne göre üstün bulunmuştur. En yüksek bitki gelişim oranı ‘*S. vomeraceae* + KC ortamı’ kombinasyonundan elde edilmiş (%42.80), buna en yakın değer önemli düzeyde farklılık göstererek ‘*S. vomeraceae* + ½ MS+0.1GA₃ ortamı’nda bulunmuştur (%20.02). Diğer iki besin ortamındaki *S. vomeraceae* protokormlardan bitkiye dönüşüm üç ve dördüncü sıraları, aralarında önemli düzeyde farklılık bulunmadan alırken; *O.laxiflora* türündeki ortamlar arasında ½ MS+0.1GA₃ ortamı dışında benzer sonuçlar elde edilmiştir (%6.91- 8.39 arasında bitki gelişim oranları). ‘*O.laxiflora* + ½ MS+0.1GA₃ ortamı’ bu denemedeki en düşük performansa sahip olmuş ve bitki gelişim oranı %1.84 olarak belirlenmiştir.

4.1.3 Deneme III

Deneme II’nin devam ettiği aşamada, bir yandan da Deneme III kurulmuştur. İlk yapılan deneme aşamasında (Deneme I) yer alan türler arasında en yüksek başarıyı gösteren *Dactylorhiza nieschalkiorum* ile yine aynı denemede bulunan fakat bitki gelişimi sağlayamayan *Orchis pinetorum* ve *Orchis tridentata* türleri, bu aşamada da kullanılmıştır. ½ MS ve KC ortamlarına 0.1 mg/l GA₃ ilave edilmesi veya edilmemesi; besin ortamından azot kaynağının çıkartılması ile tohum ekiminden sonraki ilk üç ay süresince farklı ışıklandırma rejimi uygulamasının (sürekli karanlık veya ilk 30 gün karanlıkta, sonraki iki ay boyunca fotoperiyodik düzende aydınlatılan koşullarda

tutulmasının); çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişim oranları üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

4.1.3.1 Çimlenme oranı

Çimlenme oranına etkileri yönünden türler, besin ortamları, ‘Tür + Besin ortamı’, ‘Tür + Işıklandırma’, ‘Tür + Işıklandırma + Besin ortamı’ kombinasyonları arasındaki farklılık % 5 hata seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

‘Tür + Işık + Besin ortamı’ üçlü interaksyonunun önemli çıkması durumunda esasen diğer faktörlerin tek başlarına ele alınması gerekli olmayabilir. Ancak bizim araştırma amacımız, her bir türde en uygun tek bir uygulamayı belirlemekten ziyade; mümkün olabildiğince daha çok sayıda orkide türünde kabul edilebilir oranlarda başarıyı sağlayan uygulamalar üzerinde yoğunlaşmak olduğundan; türler arasındaki farklılık, besin ortamları arasındaki farklılık, inkübasyon koşulları arasındaki farklılık özellikleri ayrı ayrı incelenmiş; üçlü interaksyon ise en son olarak topluca değerlendirmeye tabi tutulmuştur.

Deneme III’te türler itibarıyla en yüksek çimlenme oranı % 22.71 ile *D.nieschalkiorum*’da belirlenmiş, bunu sırasıyla % 9.53 ve % 4.04 çimlenme oranı değerleriyle *O. pinetorum* ve *O. tridentata* türleri izlemiştir. Çizelge 4.15’te Deneme III’te, diğer tüm faktörler etkisiz kabul edildiğinde farklı orkide türlerinin çimlenme oranına etkisi gösterilmiştir.

Çizelge 4.15 Deneme III’te, farklı orkide türlerine ait tohumların iki ışıklandırma koşulu ve altı besin ortamı bileşiminde çimlenme oranı (%)

Tür	Çimlenme oranı (%)
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	22.71 a
<i>Orchis pinetorum</i>	9.53 b
<i>Orchis tridentata</i>	4.04 c

İlk iki denemede tohum ekimi yapılan tüm petri kutuları protokorm oluşuncaya kadar sürekli karanlıkta tutulmuştur. Bu denemede ise uygulamaların bir kısmı yine sürekli karanlıkta inkübe edildiği halde, diğer bir kısmı da ilk 30 gün karanlıkta tutulmuş, sonra 16/8 h fotoperiyodik düzene aktarılmıştır. Bu uygulamalar arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. İkinci ayın başından itibaren fotoperiyodik düzende bekletilen kültürlerde çimlenme oranı (% 13.77), karanlıkta tutulan kültürlerden (% 10.42) daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 Deneme III'te farklı ışık uygulamalarının üç orkide türü ve altı besin ortamı bileşimi bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Işık	Çimlenme oranı (%)
Aydınlık	13.77 a
Karanlık	10.42 b

Farklı besin ortamları ve bunların 0.1 mg/l GA₃ ile kombinasyonlarının çimlenme oranlarına olan etkileri de Çizelge 4.17'te verilmiştir. Buna göre ½ MS ortamı (% 14.58), KC-N+0.1GA₃ (% 13.75) ve ½ MS+0.1GA₃ (% 12.40) izlemiştir. En düşük çimlenme oranı (% 9.35) ise KC+0.1GA₃ ortamlarından elde edilmiştir.

Çizelge 4.17 Deneme III'te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin iki ışıklandırma koşulu ve üç orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
½ MS	14.58 a
½ MS+0.1GA ₃	12.40 ab
KC	10.71 bc
KC+0.1GA ₃	9.35 c
KC-N	11.77 b
KC-N+0.1GA ₃	13.75 ab

‘Tür + Işıklandırma’ kombinasyonlarının çimlenme oranına etkileri incelendiğinde, en yüksek çimlenme oranının (% 27.46), aydınlık ortamda kültüre alınan *D. nieschalkiorum* türüne ait kültürlerde tespit edildiği görülmektedir. ‘*D. nieschalkiorum* + karanlık’ kombinasyonu çimlenme oranı bakımından tüm türlerin ortalaması üzerinden ikinci sırada yer almış (%17.95); bunu *O. pinetorum* türünün karanlık ve aydınlık kombinasyonları izlemiştir (%10.00 ve 9.06). *O. tridentata* türü karanlık (%4.78) ve aydınlık (%3.30) uygulamalarında, denemede yer alan üç tür içerisinde en düşük çimlenme oranlarına sahip tür olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18 Deneme III’te ‘Tür + Işıklandırma’ interaksiyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Işıklandırma	Çimlenme oranı (%)
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	aydınlık	27.46 a
	karanlık	17.95 b
<i>Orchis pinetorum</i>	aydınlık	9.06 c
	karanlık	10.00 c
<i>Orchis tridentata</i>	aydınlık	4.78 d
	karanlık	3.30 e

‘Tür + Besin ortamı’ kombinasyonları, çimlenme oranı üzerinde etkili olmuştur. Çizelge 4. 19’da altı besin ortamı bileşiminde türler bazında toplu çimlenme oranları üzerinden yapılan istatistiksel değerlendirmelere ilişkin veriler gösterilmiştir. Buna göre en yüksek çimlenme oranları, *D. nieschalkiorum* türünde, % 31.25 ve % 26.80 çimlenme oranı değerleriyle KC-N+0.1GA₃ ve ½ MS ortamlarından elde edilmiştir. Çimlenme oranlarının sayısal olarak takip eden değerleri, yine aynı türde, diğer ortamlarda ortaya çıkmıştır. Çimlenme oranları arasındaki istatistiksel önem farklılıkları çizelgeden izlenebileceği gibi değişiklikler göstermektedir. Ancak genel bir değerlendirmeye *O. pinetorum*’da çimlenme oranlarının % 13.64 ile %5.58 arasında olduğu; *O. tridentata* türünde ise en yüksek çimlenme oranının KC-N ortamından (%6.30) alındığı ve diğer ortamların aralarında farklılık bulunmaksızın %4.41-2.96 arasında çimlenme oranı verdikleri söylenebilir.

Çizelge 4.19 Deneme III'te 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	½ MS	26.80 ab
	½ MS+0.1GA ₃	20.39 cd
	KC	18.83 cd
	KC+0.1GA ₃	16.17 cd
	KC-N	22.82 bc
	KC-N+0.1GA ₃	31.25 a
<i>Orchis pinetorum</i>	½ MS	13.64 ef
	½ MS+0.1GA ₃	13.07 ef
	KC	9.77 fg
	KC+0.1GA ₃	8.93 gh
	KC-N	6.20 ij
	KC-N+0.1GA ₃	5.58 ij
<i>Orchis tridentata</i>	½ MS	3.29 jk
	½ MS+0.1GA ₃	3.75 ı-k
	KC	3.53 ı-k
	KC+0.1GA ₃	2.96 k
	KC-N	6.30 hı
	KC-N+0.1GA ₃	4.41 ı-k

'Tür + Işıklandırma + Besin ortamı' üçlü interaksyonu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Çizelge 4.20'de üç farklı tür, iki ışıklandırma koşulu ve altı besin ortamı bileşiminin kombine edilmesiyle oluşturulan denemeden elde edilen sonuçlar toplu olarak verilmiştir.

Çizelge 4.20 Deneme III'te 'Tür + Işıklandırma + Besin ortamı' kombinasyonlarının çimlenme oranı üzerine etkileri (%)

Tür	Işık	Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	Aydınlık	½ MS	26.51 bc
		½ MS+0.1GA ₃	27.74 b
		KC	17.72 de
		KC+0.1GA ₃	16.59 d-g
		KC-N	31.14 b
		KC-N+0.1GA ₃	45.06 a
	Karanlık	½ MS	27.08 b
		½ MS+0.1GA ₃	13.03 e-i
		KC	19.93 cd
		KC+0.1GA ₃	15.75 d-g
		KC-N	14.50 d-h
		KC-N+0.1GA ₃	17.43 d-f
<i>Orchis pinetorum</i>	Aydınlık	½ MS	11.10 f-j
		½ MS+0.1GA ₃	10.40 g-j
		KC	9.11 h-k
		KC+0.1GA ₃	7.18 j-m
		KC-N	8.92 h-k
		KC-N+0.1GA ₃	7.65 i-l
	Karanlık	½ MS	16.18 d-g
		½ MS+0.1GA ₃	15.73 d-g
		KC	10.44 g-j
		KC+0.1GA ₃	10.67 f-j
		KC-N	3.48 mn
		KC-N+0.1GA ₃	3.52 l-n
<i>Orchis tridentata</i>	Aydınlık	½ MS	4.13 l-n
		½ MS+0.1GA ₃	4.10 l-n
		KC	3.46 l-n
		KC+0.1GA ₃	3.59 mn
		KC-N	8.56 h-k
		KC-N+0.1GA ₃	4.83 k-n
	Karanlık	½ MS	2.44 n
		½ MS+0.1GA ₃	3.40 mn
		KC	3.60 l-n
		KC+0.1GA ₃	2.33 n
		KC-N	4.04 mn
		KC-N+0.1GA ₃	4.00 l-n

'*D. nieschalkiorum* + Aydınlık + KC-N+0.1GA₃' kombinasyonu, çimlenme oranı bakımından Deneme III'te yer alan tüm uygulamalar arasında en yüksek değeri vermiştir (% 45.06). '*D. nieschalkiorum* + Aydınlık + KC-N' , '*D. nieschalkiorum* + Aydınlık + ½ MS+0.1GA₃' , '*D. nieschalkiorum* + Karanlık + ½ MS' ve '*D. nieschalkiorum* + Aydınlık + ½ MS' kombinasyonları çimlenme oranı bakımından aynı istatistiksel grup içerisinde yer almış ve ikinci sırada bulunmuşlardır (sırasıyla % 31.14, 27.74, 27.08 ve 26.51). *O. pinetorum*'da karanlık ortamda ½ MS (% 16.18) ve ½ MS+0.1GA₃ ortamlarında (% 15.73) kültüre alınan örneklerde çimlenme oranı tür içerisinde en yüksek değerleri vermiştir. *O. tridentata*'da ise aydınlık koşullarda ve KC-N ortamındaki kültürlerde en yüksek çimlenme oranı (% 8.56) tespit edilmiştir. Ancak genel olarak *O. pinetorum* türüne ait kombinasyonlar *D. nieschalkiorum* türünden sonra genel bir gruplandırma içinde kalmış; *O. tridentata* türü ise kendi içindeki kombinasyonlar çerçevesinde en düşük çimlenme değerlerini veren tür olmuştur.

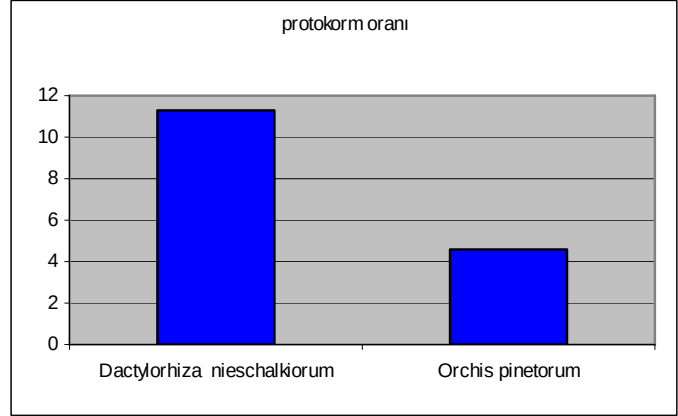
4.1.3.2 Protokorm oluşturma oranı

Deneme III'te araştırılan üç türden ikisinde (*Dactylorhiza nieschalkiorum* ve *Orchis pinetorum*) protokorm elde edilmiştir. *Orchis tridentata* türü ise çimlenme oranı bakımından düşük performansını bu aşamada da sürdürmüş ve protokorm oluşturmamıştır. Protokorm oluşturma oranına etkileri bakımından türler, ışık uygulamaları, besin ortamları arasındaki farklılıklar ile 'Tür + Işıklandırma', 'Tür + Besin ortamı', 'Işıklandırma + Besin ortamı' ve 'Tür + Işıklandırma + Besin ortamı' interaksiyonları istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı bulunmuştur ($p \leq 0.05$)

Protokorm oluşumu meydana gelen iki tür olan *D. nieschalkiorum* ile *O. pinetorum*'ait ortalama protokorm oranları % 11.26 ve % 4.58 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.21 ve Şekil 4.13).

Çizelge 4.21 ve Şekil 4.13 Deneme III’te, farklı orkide türlerinin iki ışıklandırma koşulu ve altı besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	11.26 a
<i>Orchis pinetorum</i>	4.58 b



D. neschalkiorum türü protokorm oluşturma yeteneği bakımından *O. pinetorum*’a göre daha üstün bulunmuştur.



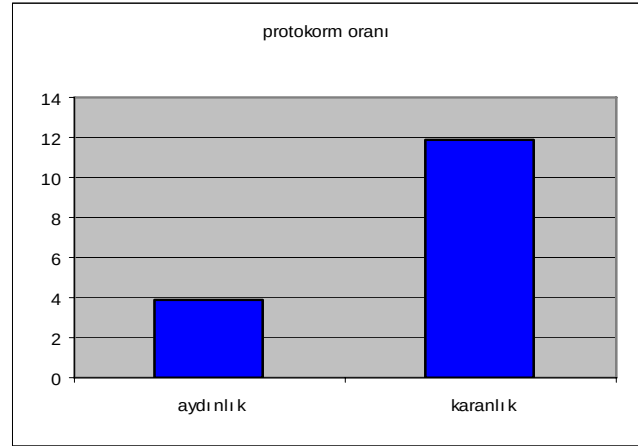
Şekil 4.14 *Orchis pinetorum*’da protokorm oluşumu (0.67X10 büyütme)

Işık uygulamalarının protokorm oluşturma oranına etkileri de belirgin bir şekilde farklı olmuş, en yüksek oran (% 11.92) karanlık uygulamalarından elde edilmiş olup aydınlık uygulamalarında ise bu oran % 3.92 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.22 ve Şekil 4. 15). Her ne kadar çimlenme oranları türler ortalaması bazında aydınlık uygulamasında daha

yüksek belirlenmiş olsa da; protokorm oluşumu için karanlık uygulamasının daha olumlu etkide bulunduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.22 ve Şekil 4.15 Deneme III'te farklı ışık uygulamalarının iki orkide türü ve altı besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

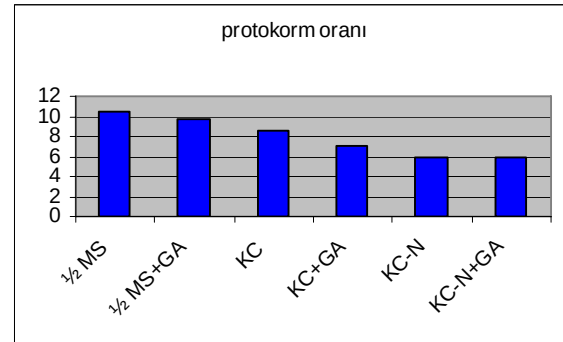
Işık	Protokorm oluşturma oranı (%)
Aydınlık	3.92 b
Karanlık	11.92 a



Diğer tüm faktörlerin ortalaması alınarak sadece besin ortamlarının etkisi incelendiğinde, en yüksek protokorm oluşum oranlarının $\frac{1}{2}$ MS (% 10.39), $\frac{1}{2}$ MS+0.1GA₃ (% 9.62) ve KC (%8.64) ortamlarından elde edildiği görülmektedir. Diğer üç ortam bileşimi, aralarında istatistiksel farklılık bulunmaksızın daha düşük protokorm oluşum oranları (% 7.09, 5.97, 5.82) vermiştir (Çizelge 4.23 ve Şekil 4.16).

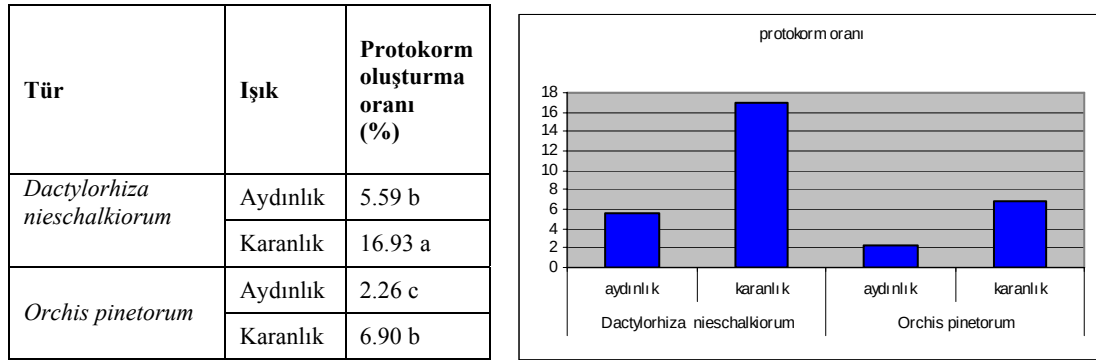
Çizelge 4.23 ve Şekil 4.16 Deneme III'te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin iki ışıklandırma koşulu ve iki orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
$\frac{1}{2}$ MS	10.39 a
$\frac{1}{2}$ MS+0.1GA ₃	9.62 a
KC	8.64 ab
KC+0.1GA ₃	7.09 bc
KC-N	5.82 c
KC-N+0.1GA ₃	5.97 c



Yukarıda, deneme faktörleri tek başlarına alınmış ve bilgi vermesi açısından ayrı ayrı incelenmiştir. Faktörlerin her birisi tek başlarına etkili olduğu gibi, ikili ve üçlü interaksyonlar da istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bunlardan ‘Tür + Işıklandırma’ interaksyonu incelendiğinde; protokorm oluşumu için her iki türde de tohum ekiminden itibaren sürekli karanlıkta tutma uygulamasının daha olumlu sonuçlar verdiği anlaşılmaktadır (Çizelge 24 ve Şekil 4.17).

Çizelge 4.24 ve Şekil 4.17 Deneme III’te ‘Tür + Işıklandırma’ interaksyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%)



Çizelge 4.24’ten de görüleceği gibi ‘Tür + Işıklandırma’ uygulamaları arasında en yüksek protokorm oluşum oranı ‘*D. neschalkiorum* + Karanlık’ uygulamasından elde edilmiş (% 16.93), bunu ‘*O. pinetorum* + Karanlık’ uygulaması (% 6.90) takip etmiştir. Şekil 4.18 a ve b’de karanlık veya aydınlık koşullarda tutmanın aynı türdeki protokorm oluşumu üzerindeki farklılıkları gösterilmiştir. Çok az bir farkla ve istatistiksel olarak önemsiz bir şekilde ‘*D. neschalkiorum* + Aydınlik’ uygulaması (%5.59) üçüncü sırayı almış; %2.26 protokorm oluşturma oranı ile ‘*O. pinetorum* + Aydınlik’ uygulaması geride kalmıştır.



a



b

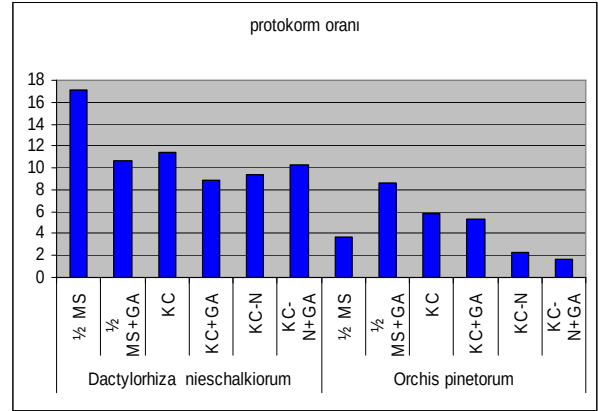
Şekil 4.18 a. *Dactylorhiza nieschalkiorum* türüne ait protokormlarda ışığın klorofil oluşumu üzerine etkisi (0.67X10 büyütme)

b. Karanlık ışık rejiminde tutulan *Dactylorhiza nieschalkiorum* türüne ait protokormlar (0.67X10 büyütme)

İkili interaksiyonlar arasında önemli olanlardan bir diğeri ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonudur (Çizelge 4.25). ‘*D. nieschalkiorum* + ½ MS’ kombinasyonu, denemede yer alan uygulamalar arasında en yüksek protokorm oluşturma oranını vermiştir (% 17.09). Yine aynı orkide türündeki ortamların diğerleri %10.59-8.81 arasında protokorm oranlarına sahip olarak; diğer orkide türüne göre daha yüksek bir performans göstermiştir. *O. pinetorum* türünde en yüksek protokorm oluşturma oranı % 8.64 değeri ile 0.1 mg/l GA₃ ilave edilen ½ MS besin ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.19).

Çizelge 4.25 ve Şekil 4.19 Deneme III'te 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	½ MS	17.09 a
	½ MS+0.1GA ₃	10.59 b
	KC	11.44 b
	KC+0.1GA ₃	8.81 bc
	KC-N	9.41 b
	KC-N+0.1GA ₃	10.22 b
<i>Orchis pinetorum</i>	½ MS	3.69 de
	½ MS+0.1GA ₃	8.64 bc
	KC	5.85 cd
	KC+0.1GA ₃	5.37 d
	KC-N	2.24 ef
	KC-N+0.1GA ₃	1.71 f

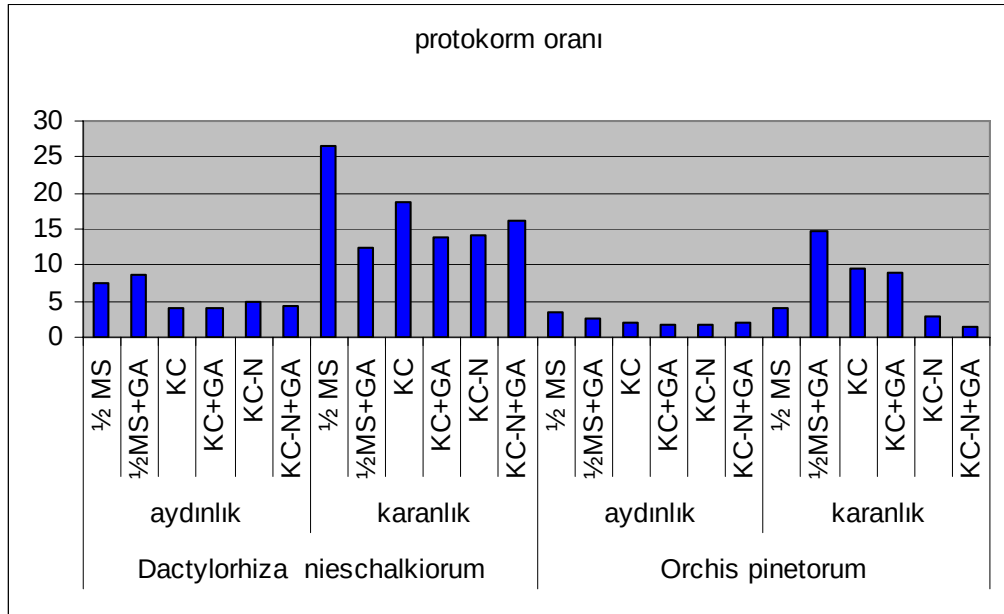


'Tür + Işıklandırma + Besin ortamı' üçlü interaksyonunun protokorm oluşum oranına etkileri Çizelge 4.26'da ve Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.26 Deneme III'te Tür + Işıklandırma + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%)

Tür	Işık	Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	aydınlık	½ MS	7.51 g-i
		½ MS+0.1GA ₃	8.79 f-h
		KC	4.09 i-l
		KC+0.1GA ₃	3.91 i-l
		KC-N	4.82 h-j
		KC-N+0.1GA ₃	4.39 h-k
	karanlık	½ MS	26.66 a
		½ MS+0.1GA ₃	12.39 c-g
		KC	18.79 b
		KC+0.1GA ₃	13.71 b-f
		KC-N	14.00 b-e
		KC-N+0.1GA ₃	16.06 bc
<i>Orchis pinetorum</i>	aydınlık	½ MS	3.46 j-l
		½ MS+0.1GA ₃	2.46 j-l
		KC	2.13 j-l
		KC+0.1GA ₃	1.71 j-l
		KC-N	1.70 kl
		KC-N+0.1GA ₃	2.12 j-l
	karanlık	½ MS	3.92 i-l
		½ MS+0.1GA ₃	14.82 b-d
		KC	9.57 d-g
		KC+0.1GA ₃	9.02 e-g
		KC-N	2.78 j-l
		KC-N+0.1GA ₃	1.30 l

En yüksek protokorm oluşturma oranı (% 26.66) $\frac{1}{2}$ MS ortamında ve karanlıkta kültüre alınan *D. nieschalkiorum*'a ait kültürlerde belirlenmiş, bunu % 18.79 ile aynı tür ve ışık koşullarındaki KC besin ortamı izlemiştir. Karanlık uygulamalardaki protokorm oluşum oranının aydınlık uygulamasına göre daha yüksek değerler verdiği, önceki ikili interaksiyon açıklamalarında verilmiş olmakla birlikte buradaki çizelgede bir kere daha belirtilmesi yararlı bulunmuştur. *O. pinetorum* türünde de benzer durum söz konusudur. Karanlıkta inkübe edilen kültürlerdeki protokorm oluşturma oranı, aydınlık uygulaması yapılan örneklerden daha yüksek bulunmuştur. Bu tür, protokorm oluşturma bakımından zayıf olmakla birlikte en yüksek protokorm oluşumunu (% 14.82) '*O. pinetorum* + Karanlık + $\frac{1}{2}$ MS+0.1GA₃' kombinasyonunda vermiştir. Diğer iki en yüksek oran ise *O. pinetorum* + Karanlık + KC' ve *O. pinetorum* + Karanlık + KC+0.1GA₃' kombinasyonlarından elde edilmiştir (sırasıyla % 9.57 ve 9.02). Ayrıca aydınlık uygulamasında yeşil renk oluşumu teşvik edilmiş, GA₃ içeren ortamlarda da protokormlardan hızla uzayan sürgünler oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.21 a ve b).



Şekil 4.20 Deneme III'te Tür + Işıklandırma + Besin ortamı' interaksiyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi (%)



a



b

Şekil 4.21 GA₃'ün ve ışıklandırma koşullarının büyüme konisi uzaması ve klorofil oluşumu üzerine etkisi

- '*D. neschalkiorum* + Karanlık + KC+0.1GA₃' kombinasyonunda protokormun gelişerek bitkiciğe dönüşmeye başlaması (0.67X10 büyütme)
- '*D. neschalkiorum* + Aydınlık + KC+0.1GA₃' kombinasyonunda protokormun gelişerek bitkiciğe dönüşmeye başlaması (0.67X10 büyütme)

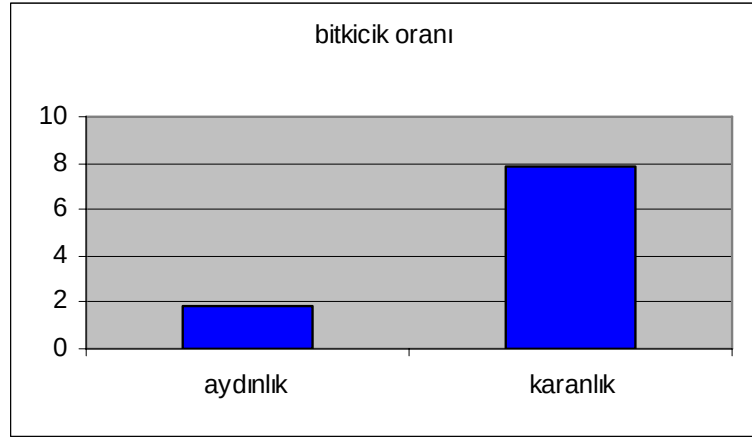
4.1.3.3 Bitki gelişme oranı

Deneme III'te çimlenme aşamasında üç tür kullanılmış fakat protokorm oluşumu sadece iki türde meydana gelmiş ve bu türlerden *Dactylorhiza neschalkiorum*'da bitki gelişimi sağlanabilmiştir. Bitki gelişme oranı bakımından besin ortamı bileşimlerinin etkisi önemsiz bulunmuş; inkübasyonun ikinci ayından itibaren uygulanan ışıklandırma koşullarının ve 'Işıklandırma + Besin ortamı' interaksiyonunun %5 seviyesinde istatistiksel açıdan önem taşıdığı belirlenmiştir.

İnkübasyonun ilk dönemlerinde karanlıkta veya aydınlıkta tutmanın bitkicik oluşumu üzerindeki etkisi, protokorm oluşumu üzerine yaptığı etkiye benzer olmuştur. Sürekli karanlıkta inkübe edilen *D. neschalkiorum* kültürlerinde bitki gelişim oranı % 7.87 ile daha yüksek olmuş, aydınlıkta inkübe edilen kültürlerde ise bu oran % 1.88'de kalmıştır (Çizelge 4.27 ve Şekil 4.22).

Çizelge 4.27 ve Şekil 4.22 Deneme III'te, farklı ışık uygulamalarının *D. nieschalkiorum* türünde altı besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

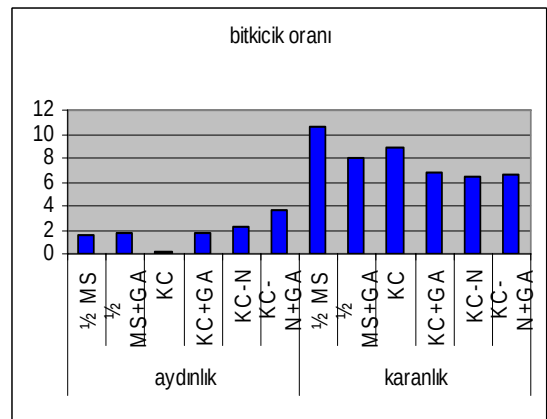
Işık	Bitki gelişme oranı (%)
Aydınlık	1.88 b
Karanlık	7.87 a

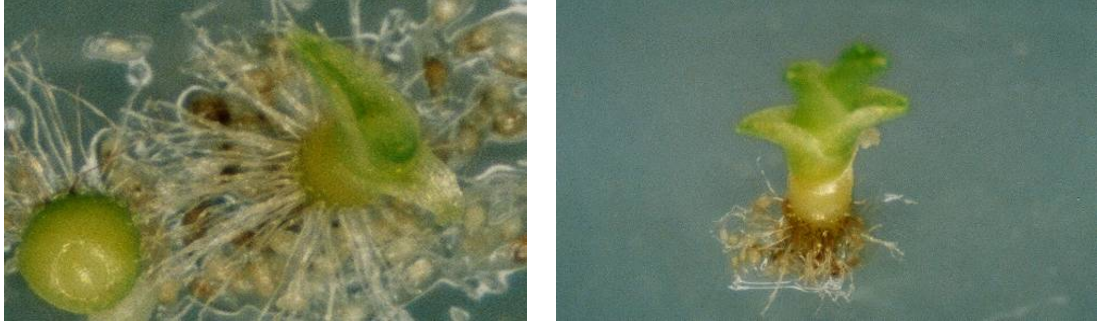


Deneme III'te *D.nieschalkiorum* türünde bitki gelişme oranı üzerine etkisi bakımından besin ortamı bileşimleri arasında istatistiki bir farklılık olmadığı anlaşılmıştır. Bu oran besin ortamı bileşimlerine göre % 6.07 ile 4.26 arasında değişiklik göstermiştir. Buna karşılık 'Işıklandırma + Besin ortamı' interaksyonunu bitki gelişme oranı bakımından önemli bulunmuştur (Çizelge 4.28 ve Şekil 4.23). Şekil 4.24'da ışıklandırılan koşullarda elde edilmiş *D.nieschalkiorum* türünde protokormlardan ilk yaprakların çıkışı ve bitkinin ilerleyen gelişme aşaması görülmektedir.

Çizelge 4.28 ve Şekil 4.23 Deneme III'te, 'Işıklandırma + Besin ortamı' interaksyonunun *D. nieschalkiorum* türünde bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Işık	Besin ortamı	Bitki gelişme oranı (%)
Aydınlık	½ MS	1.58 c
	½ MS+0.1GA ₃	1.81 c
	KC	0.25 d
	KC+0.1GA ₃	1.72 c
	KC-N	2.28 c
	KC-N+0.1GA ₃	3.61 bc
Karanlık	½ MS	10.56 a
	½ MS+0.1GA ₃	7.94 a
	KC	8.94 a
	KC+0.1GA ₃	6.81 ab
	KC-N	6.41 ab
	KC-N+0.1GA ₃	6.59 ab





Şekil 4.24 a. *Dactylorhiza nieschalkiorum* 'da ilk yaprakçıkların oluşumu 'Aydınlık + KC+0.1GA₃' kombinasyonu (0.67X10 büyütme)
b. *Dactylorhiza nieschalkiorum* 'da bitkiciğin gelişmesi (0.67X10 büyütme)

Her ne kadar 'Işıklandırma + Besin ortamı' interaksyonu $p \leq 0.05$ düzeyinde önemli çıkmış olsa da, karanlık inkübasyonda bekletmenin bitkiye dönüşme üzerindeki etkisinin daha belirgin olduğu anlaşılmaktadır. Nitekim karanlıkta tutulan altı farklı besin ortamında kültüre alınan protokormlar aralarında istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık bulunmaksızın en yüksek bitki gelişme oranlarının bulunduğu grubu oluşturmuştur (%10.56-6.41). Aydınlik uygulamalarında interaksyon daha belirgin olmuş, bitki gelişim oranları %3.61-1.58 arasında değerler vermiş, 'Aydınlık + KC ortamı' kombinasyonu ise %0.25 bitki gelişim oranıyla bu deneme aşamasının en düşük sayısal değerine sahip olmuştur.

4.1.4 Deneme IV

Deneme III'te kullanılan besin ortamı bileşimleri ile yeni altı adet salep orkidesi türünün kombinasyonları, bu deneme aşamasının konusunu oluşturmaktadır. Deneme III'ten farklı olarak ışıklandırma uygulamaları yapılmamış, tohum ekimi tamamlanan kültürlerin tümü karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Deneme IV'te kullanılan orkide türleri şunlardır: *Platanthera chlorantha*, *Orchis coriophora*, *Ophrys ferrum-equinum*, *Ophrys apifera*, *Orchis morio*, *Dactylorhiza incarnata*. Bunlardan *P. chlorantha* tohumları hiçbir gelişme göstermediğinden denemeden çıkartılmış ve hesaplamalara katılmamıştır. Böylece beş tür ve altı besin ortamı bileşimi deneme faktörlerini

oluşturmuştur. Tohum ekiminden üç ay sonra gözlem ve sayımlar yapılmış, çimlenme oranları belirlenmiştir.

4.1.4.1 Çimlenme oranı

Çimlenme oranı bakımından yapılan istatistiki analiz sonuçlarına göre türler arasındaki farklılıklar ile ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonu önemli olduğu halde; besin ortamları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemsiz bulunduğu ortaya konmuştur ($p \leq 0.05$). Önceki denemelerde olduğu gibi çimlenme oranı bakımından yine türler arasındaki farklılık önemli olmuştur. En yüksek çimlenme oranı % 31.60 değeri ile *Orchis coriophora*’da tespit edilmiş, bunu % 26.92 ile *Ophrys apifera* izlemiştir. *Ophrys ferrum-equnium*’un üçüncü (%18.82) ve *Orchis morio*’nun dördüncü (15.02) olduğu bu deneme aşamasında en düşük çimlenme oranı *Dactylorhiza incarnata* türünden (% 2.13) elde edilmiştir (Çizelge 4.29).

Çizelge 4.29 Deneme IV’te, farklı orkide türlerine ait tohumların altı besin ortamında çimlenme oranı (%)

Tür	Çimlenme oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	31.60 a
<i>Ophrys ferrum-equnium</i>	18.82 c
<i>Ophrys apifera</i>	26.92 b
<i>Orchis morio</i>	15.02 d
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	2.13 e

Türlerin tümü birlikte değerlendirildiğinde besin ortamı bileşimleri, çimlenme oranı bakımından önemli düzeyde bir farklılık göstermemiştir (Çizelge 4.30). Çimlenme oranlarının %19.83-17.13 arasında olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.30 Deneme IV’de farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin beş orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

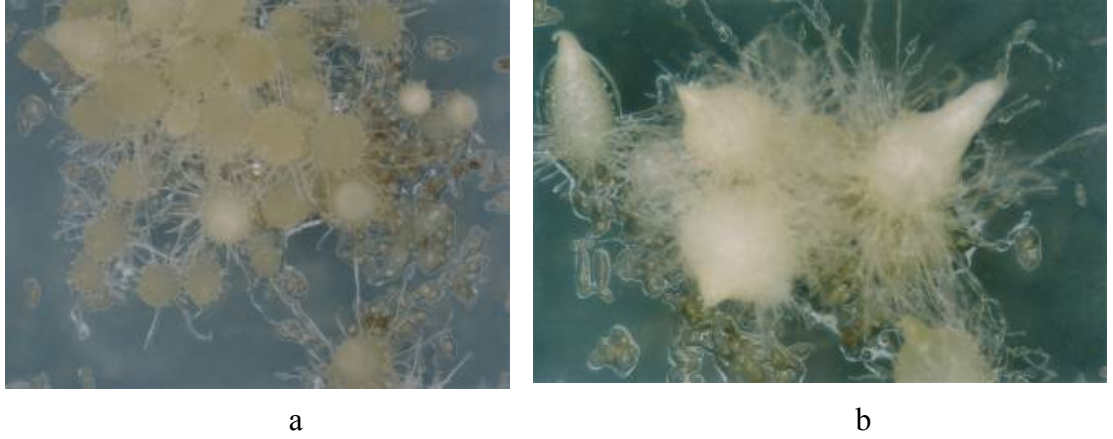
Besin ortamı	Çimlenme Oranı (%)
½ MS	19.32 ab
½ MS+0.1GA ₃	19.51 ab
KC	18.44 ab
KC+0.1GA ₃	19.83 a
KC-N	19.16 ab
KC-N+0.1GA ₃	17.13 b

‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonu çimlenme oranı üzerinde etkili bulunmuştur (Çizelge 4.31). En yüksek çimlenme oranı % 39.42 ile KC ortamında kültüre alınan *O. coriophora* tohumlarından elde edilmiştir. ‘*O. coriophora* + KC-N’ (%38.84), ‘*O. apifera* + KC+0.1GA₃’ (%36.72), ‘*O. apifera* + ½ MS+0.1GA₃’ (%33.02), ‘*O. coriophora* + ½ MS+0.1GA₃’ (%30.37), ‘*O. coriophora* + ½ MS’ (%29.73), ‘*O. coriophora* + KC-N+0.1GA₃’ (%29.44), ‘*O. apifera* + ½ MS’ (%29.21) kombinasyonlarının tümü aralarındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz olduğundan ‘*O. coriophora* + KC’ kombinasyonu ile birlikte birinciliği paylaşmışlardır.

Denemedeki türlerden *Ophrys ferrum-equinum*’da çimlenme oranı en yüksek olan besin ortamı KC-N+0.1GA₃ (% 25.28) olmuş; *Orchis morio*’da KC+0.1GA₃ ortamı öne çıktığı halde (% 22.05); *Dactylorhiza incarnata*’da ise inorganik azot içermeyen KC ortamı (KC-N, %4.39) olumlu bulunmuştur.

Çizelge 4.31 Deneme IV’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	½ MS	29.73 a-c
	½ MS+0.1GA ₃	30.37 a-c
	KC	39.42 a
	KC+0.1GA ₃	21.82 c-f
	KC-N	38.84 a
	KC-N+0.1GA ₃	29.44 a-c
<i>Ophrys ferrum-equinum</i>	½ MS	19.91 c-g
	½ MS+0.1GA ₃	20.09 c-g
	KC	17.19 d-g
	KC+0.1GA ₃	15.10 fg
	KC-N	15.37 e-g
	KC-N+0.1GA ₃	25.28 b-d
<i>Ophrys apifera</i>	½ MS	29.21 a-c
	½ MS+0.1GA ₃	33.02 ab
	KC	20.06 c-g
	KC+0.1GA ₃	36.72 a
	KC-N	24.84 b-e
	KC-N+0.1GA ₃	17.65 d-g
<i>Orchis morio</i>	½ MS	16.11 d-g
	½ MS+0.1GA ₃	13.26 fg
	KC	13.38 fg
	KC+0.1GA ₃	22.05 c-f
	KC-N	12.35 g
	KC-N+0.1GA ₃	12.96 g
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	½ MS	1.65 h-j
	½ MS+0.1GA ₃	0.80 ij
	KC	2.17 hi
	KC+0.1GA ₃	3.46 hi
	KC-N	4.39 h
	KC-N+0.1GA ₃	0.29 j



Şekil 4.25 $\frac{1}{2}$ MS+0.1GA₃ ortamında kültüre alınan *Ophrys apifera* (a) ve *Ophrys ferrum-equnium* (b) türlerinde tohum ekiminden 3 ay sonra yapılan gözlemlerde çimlenme ve protokorm oluşum aşamasına geçiş (1x10 büyütme)

4.1.4.2 Protokorm oluşturma oranı

Denemede yer alan türlerden *Orchis coriophora*, *Ophrys ferrum-equnium*, *Ophrys apifera*, *Orchis morio* protokorm oluşturmuş, sadece *Dactylorhiza incarnata* türünde çimlenme aşamasından sonra kayda değer bir gelişme gözlenmemiştir. Ancak yine de gelişen az sayıda protokormdan sağlıklı görünmese ve yaşamalarını sürdüremese de az sayıda bitki gelişimi belirlenmiştir (Şekil 4.26). Protokorm elde edilen dört türde yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda türler arasındaki farklılığın ve ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun $p \leq 0.05$ hata sınırına göre önemli; besin ortamları arasındaki farkların ise önemsiz olduğu belirlenmiştir.

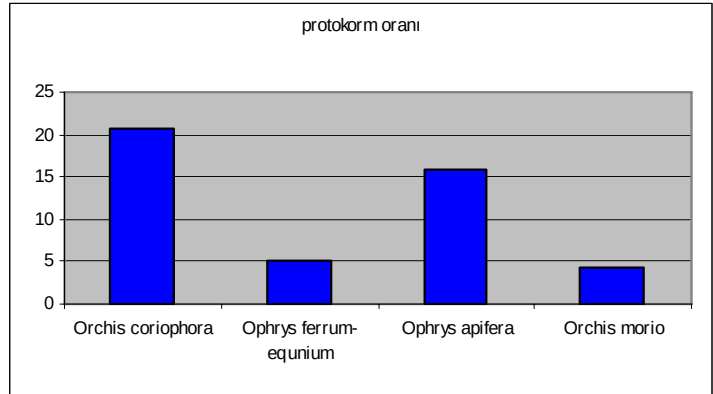


Şekil 4.26 *D. incarnata*'da (VW&DB ortamı) az sayıda elde edilen fakat kayıt altına alınmayan birkaç bitki gelişim örneği

Çizelge 4.32'de ve Şekil 4.27'de, dört farklı orkide türünde protokorm oluşum oranı bakımından ortaya çıkan farklılıklar gösterilmiştir.

Çizelge 4.32 ve Şekil 4.27 Deneme IV'te, farklı orkide türlerinin altı besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	20.77 a
<i>Ophrys ferrum-equnium</i>	5.11 c
<i>Ophrys apifera</i>	15.89 b
<i>Orchis morio</i>	4.32 c



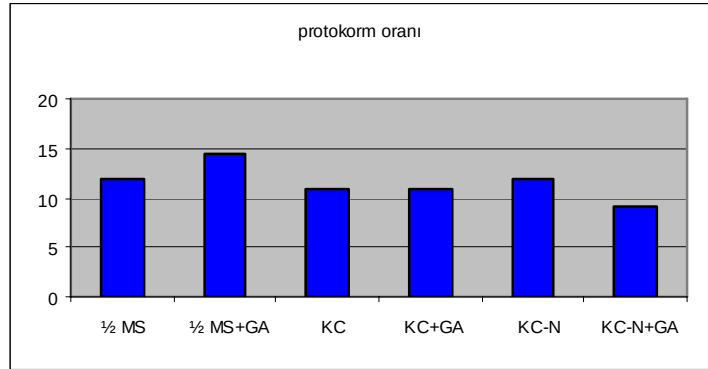
Bu denemede de tür farkı, en önemli etken olarak kendisini göstermiştir. Dört farklı türe ait kültürlerde ortam farkı ayırt edilmeden ortalamalar üzerinde yapılan değerlendirmeler sonucunda, protokorm oluşturma oranının tür farkından etkilendiği ortaya konulmuştur. En yüksek protokorm oluşturma oranı % 20.77 ile *O. coriophora*'da tespit edilmiş, bunu % 15.89 ile *O. apifera* izlemiştir (Şekil 4.27). *O.*

ferrum-equnium türündeki protokorm oluşturma oranı tüm besin ortamı bileşimlerinin ortalaması üzerinden hesaplandığında %5.11, *O.morio* türünde ise %4.32 olmuştur.

Protokorm oluşturma oranına etkisi bakımından besin ortamı bileşimleri çoğunlukla istatistiki olarak aynı grupta yer almış, farklılık düşük düzeyde önem arz etmiştir (Çizelge 4.33 ve Şekil 4.28). Ancak yine de GA₃ uygulaması, protokorm gelişimi bakımından farklılıklara neden olmuştur. Şekil 4.29 ve Şekil 4.30’da da görüleceği gibi aynı tür ve besin ortamı kombinasyonunda GA₃ ilave edilmesi, büyüme ucunun uzamasına yol açmaktadır.

Çizelge 4.33 ve Şekil 4.28 Deneme IV’te, farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin dört orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Besin Ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
½ MS	11.96 ab
½ MS+0.1GA ₃	14.36 a
KC	10.81 ab
KC+0.1GA ₃	10.89 ab
KC-N	11.88 ab
KC-N+0.1GA ₃	9.22 b



a



b

Şekil 4.29 GA₃’ün aynı tür ve besin ortamı bileşiminde büyüme konisi üzerine yaptığı etki

- ½ MS ortamında kültüre alınan *O.coriophora* protokormları (0.67x10 büyütme)
- 0.1 mg/l GA₃ ilave edilen ½ MS besin ortamında kültüre alınan *O.coriophora* protokormları (0.67x10 büyütme)

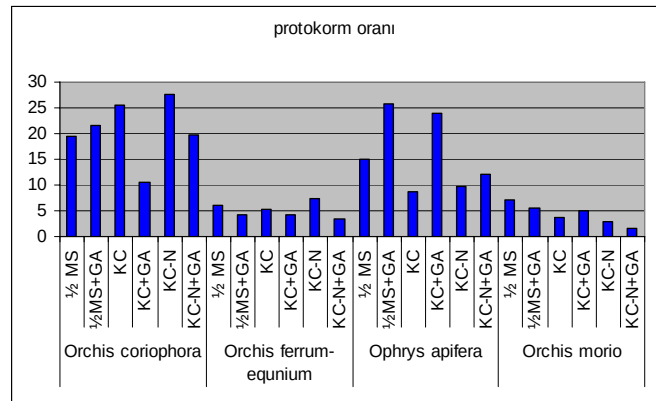


Şekil 4.30 KC+0.1GA₃ ortamında geliştirilen *O. apifera* protokormları (0.67X10 büyütme)

‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonu protokorm oluşturma oranı üzerinde etkili bulunmuştur (Çizelge 4.34 ve Şekil 4.31).

Çizelge 4.34 ve Şekil 4.31 Deneme IV’te, ‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	½ MS	19.53 a-d
	½ MS+0.1GA ₃	21.63 a-c
	KC	25.57 ab
	KC+0.1GA ₃	10.44 d-g
	KC-N	27.61 a
	KC-N+0.1GA ₃	19.82 a-c
<i>Orchis ferrum-equnium</i>	½ MS	6.14 f-i
	½ MS+0.1GA ₃	4.33 g-i
	KC	5.32 f-i
	KC+0.1GA ₃	4.23 g-i
	KC-N	7.28 e-i
	KC-N+0.1GA ₃	3.37 g-i
<i>Ophrys apifera</i>	½ MS	15.09 b-e
	½ MS+0.1GA ₃	25.86 a
	KC	8.77 e-h
	KC+0.1GA ₃	23.97 ab
	KC-N	9.61 d-g
	KC-N+0.1GA ₃	12.04 c-f
<i>Orchis morio</i>	½ MS	7.10 e-i
	½ MS+0.1GA ₃	5.61 f-i
	KC	3.61 g-i
	KC+0.1GA ₃	4.93 g-i
	KC-N	3.01 hi
	KC-N+0.1GA ₃	1.66 i



En yüksek protokorm oluşum oranı % 27.61 değeri ile '*O. coriophora* + KC-N' kombinasyonundan elde edilmiş, aynı istatistik grubu içerisinde '*O. apifera* + ½ MS+0.1GA₃' (%25.86), '*O. coriophora* + KC (%25.57), '*O. apifera* + KC+0.1GA₃' (%23.97), '*O. coriophora* + ½ MS+0.1GA₃' (%21.63), '*O. coriophora* + KC-N+0.1GA₃' (%19.82), '*O. coriophora* + ½ MS' (%19.53) uygulamaları da yer almıştır. *O. ferrum-equnium* türündeki protokorm oluşturma oranları %7.28-3.37 arasında hesaplanmış ve bunların arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. *O.morio* türünde de besin ortamları arasında protokorm oluşturma bakımından önemli bir farklılık belirlenmemiş olup bu değer %7.10-1.66 arasında değişkenlik göstermiştir.

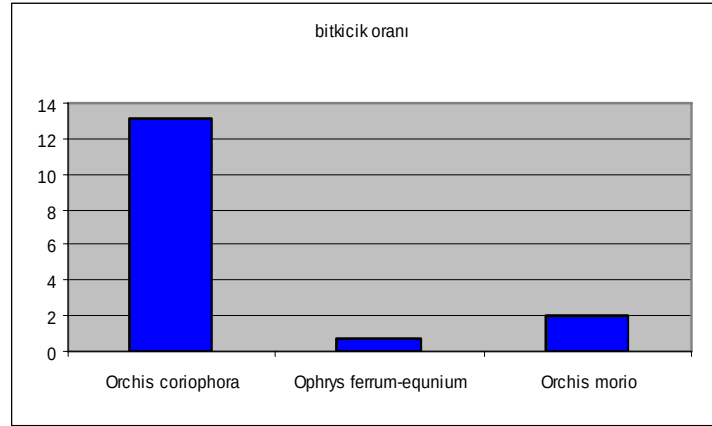
4.1.4.3 Bitki gelişme oranı

Deneme IV'te protokorm oluşturan tüm türlerden bitkicik elde edilmiş olmakla birlikte, *O. apifera*'da bu oran çok düşük olduğu için (%0.12) istatistiki değerlendirmeye alınmamıştır. Tür ve 'Tür + Besin ortamı' interaksyonu bitki gelişme oranını etkilemektedir. Bu iki özellik, $p \leq 0.05$ hata sınırına göre önemli düzeyde bitki oluşumunu etkilediği halde, besin ortamı bileşimleri arasındaki farklar önemsiz görünmektedir.

Çizelge 4.35'te ve Şekil 4.32'de, üç farklı orkide türünde bitki gelişme oranı bakımından ortaya çıkan farklılıklar gösterilmiştir.

Çizelge 4.35 ve Şekil 4.32 Deneme IV'te, farklı orkide türlerinin altı besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Bitki gelişim oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	13.20 a
<i>Ophrys ferrum-equnium</i>	0.79 b
<i>Orchis morio</i>	1.96 b



Protokormlardan bitki oluşturma özelliği bakımından üç tür arasında *Orchis coriophora*, belirgin bir farkla birinci sırayı almıştır (%13.20). Diğer iki türdeki bitki gelişme oranları çok daha düşük düzeylerde meydana gelebilmiştir. *Orchis morio* türü %1.96, *Ophrys ferrum-equnium* türü ise sadece %0.79 oranında bitki gelişimi gerçekleştirebilmiştir. Bu bitkiler her ne kadar normal yapılı görünseler de gelişmelerine devam edememişler ve serpilememişlerdir (Şekil 4.33).

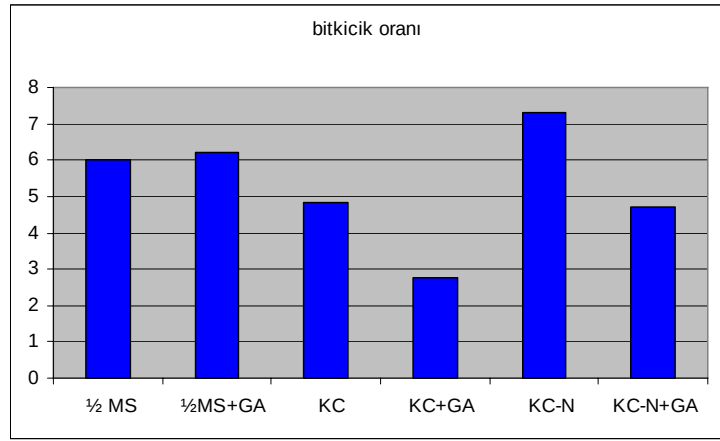


Şekil 4.33 0.1mg/l GA₃ ilave edilen ½ MS besin ortamında kültüre alınan ancak gelişme göstermeyen *Ophrys ferrum-equnium* bitkileri

Denemede kullanılan farklı besin ortamları, bitki gelişim oranı bakımından birbirinden çok uzak sayısal değerlere sahip olmamıştır (Çizelge 4.36 ve Şekil 34). En düşük bitki gelişme oranı KC+0.1GA₃ ortamında (%2.77) meydana gelmiş, KC (%4.85) ve KC-N+0.1GA₃ (%4.73) ortamlarında bir miktar artış olmuş; ½ MS (%6.02), ½ MS+0.1GA₃ (%6.22) ve KC-N (%7.31) ortamlarında ise denemedeki en yüksek ortalama bitki gelişme oranları elde edilmiştir.

Çizelge 4.36 ve Şekil 4.34.Deneme IV’de farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin üç orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

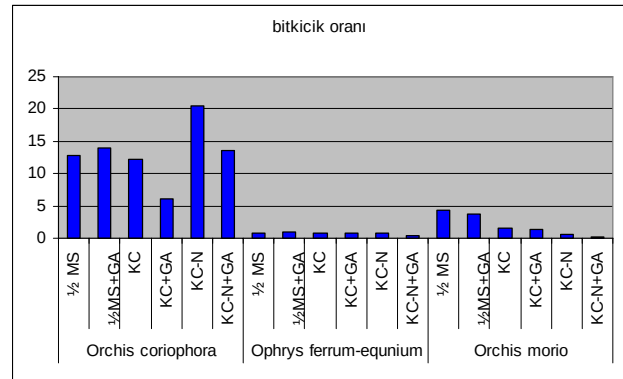
Besin ortamı	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	6.02 a
½ MS+0.1GA ₃	6.22 a
KC	4.85 ab
KC+0.1GA ₃	2.77 b
KC-N	7.31 a
KC-N+0.1GA ₃	4.73 ab



Tür etkisinin daha kuvvetli olduğu gözlemi edinilen Çizelge 4.37 ve Şekil 4.35’in incelenmesinden, ‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmaktadır. *O.coriophora*’nın bulunduğu kombinasyonlar bitki gelişim oranı özelliği bakımından ilk sıraları almıştır. Bunların arasında da en yüksek bitki gelişme oranını % 20.44 değeri ile inorganik azot içermeyen KC ortamı vermiştir. ½ MS+0.1GA₃ (%13.99) ve ½ MS (%12.88) ile yapılan *O. coriophora* kombinasyonları da bu en yüksek oranı, önemli bir farklılık olmaksızın paylaşmışlardır. *O.morio*’da en yüksek bitki gelişme oranı % 4.33 ile ½ MS ortamında meydana gelmiştir. *O.ferrum-equnium* türünde tüm ortamlarda önemsiz düzeydeki ($p \leq 0.05$) farklılık ile çok düşük oranlarda (%0.41-0.90) bitki gelişme oranı elde edilmiştir.

Çizelge 4.37 ve Şekil 4.35.Deneme IV’te, ‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Bitki gelişme oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	½ MS	12.88 a-c
	½ MS+0.1GA ₃	13.99 ab
	KC	12.16 bc
	KC+0.1GA ₃	6.17 cd
	KC-N	20.44 a
	KC-N+0.1GA ₃	13.55 ab
<i>Ophrys ferrum-equinum</i>	½ MS	0.86 e-g
	½ MS+0.1GA ₃	0.90 e-g
	KC	0.88 e-g
	KC+0.1GA ₃	0.82 e-g
	KC-N	0.87 e-g
	KC-N+0.1GA ₃	0.41 g
<i>Orchis morio</i>	½ MS	4.33 de
	½ MS+0.1GA ₃	3.78 d-f
	KC	1.51 e-g
	KC+0.1GA ₃	1.32 e-g
	KC-N	0.61 fg
	KC-N+0.1GA ₃	0.24 g



4.1.5 Deneme V

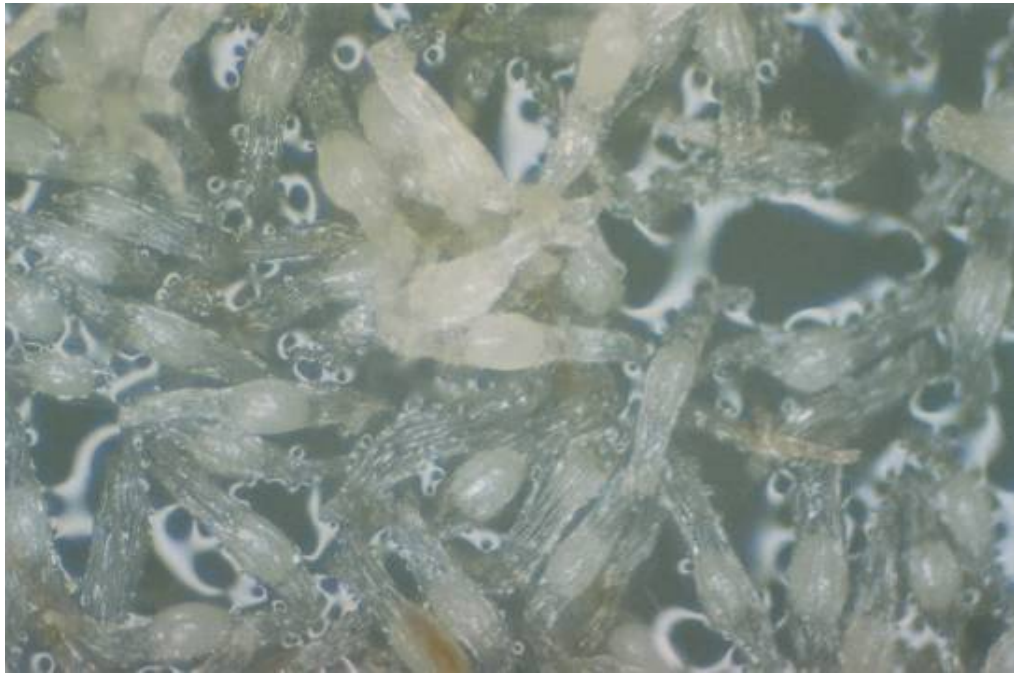
Denemelerimizin önceki aşamalarında kullanılmayan üç yeni tür, Deneme V ile çalışmalarımıza katılmıştır. Bunlar *Orchis simia*, *Platanthera chlorantha* ve *Dactylorhiza romana* türleridir. Ayrıca önceki aşamalarda protokorm ve bitki oluşumu bakımından olumlu bulunan bir tür olan *Dactylorhiza nieschalkiorum* da bu deneme aşamasında yeni türlerle birlikte yeniden kültüre alınmıştır.

Denemedeki besin ortamlarının belirlenmesinde genel olarak bütün türlerde olumlu etkileri gözlemlenen ½ MS ortamı ile orkide tohumlarının çimlendirilmesinde dünya literatüründe ve ülkemizdeki çalışmalarda da kullanımı yaygın olan KC ortamı öne çıkmıştır. Bu ortamlara önceki deneme aşamalarında 0.1 mg/l GA₃ ilave edildiğinde çok belirgin farklılıklar ortaya çıkmamış olması nedeniyle bu defa doz yükseltilerek 0.5 mg/l GA₃ ilavesi kullanılmıştır. Dört adet orkide türü ve dört farklı besin ortamı bileşimi kombine edilerek gerçekleştirilen bu aşamada da, öncekilerde olduğu gibi çimlenme oranı, protokorm oluşturma oranı ve bitki gelişme oranı özellikleri incelenmiştir.

4.1.5.1 Çimlenme oranı

D.nieschalkiorum, *O.simia*, *P.chlorantha* ve *D.romana* türlerinin kullanıldığı Deneme V'te, çimlenme oranları bakımından türler arasındaki farkın ve 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun % 5 seviyesinde önemli olduğu belirlenmiştir. Besin ortamları arasında ise istatistiksel olarak önemli düzeyde bir farklılık bulunmamıştır.

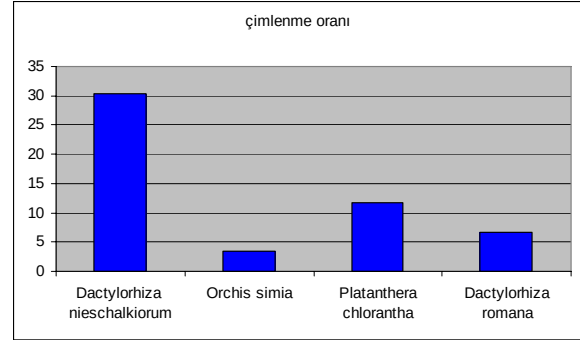
Türler arasında, önceki tüm deneme aşamalarında olduğu gibi çimlenme oranı bakımından farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.38 ve Şekil 4.37). *D. nieschalkiorum* türü, önceki denemelerde olduğu gibi bu aşamada da en yüksek çimlenme oranına sahip olmuştur (%30.37). *P. chlorantha* türü çimlenme oranı bakımından ikinci sırada yer almış (%11.67) (Şekil 4.36), bunu *D. romana* (%6.70) ve *O.simia* (%3.34) türleri izlemiştir.



Şekil 4.36 Çimlenme aşamasına yakın *P. chlorantha* türüne ait tohumlar (KC ortamı, 10x4 büyütme)

Çizelge 4.38 ve Şekil 4.37 Deneme V'te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin dört orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Çimlenme oranı (%)
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	30.37 a
<i>Orchis simia</i>	3.34 c
<i>Platanthera chlorantha</i>	11.67 b
<i>Dactylorhiza romana</i>	6.70 c



Çimlenme oranına etki bakımından, farklı besin ortamları istatistiki olarak aynı grupta yer almıştır. ½ MS ortamında %9.31 ile en düşük, KC ortamında ise %16.58 ile en yüksek çimlenme oranları belirlenmiş olup, arada kalan %12.44 (½ MS+0.5GA₃) ve %13.74'lük (KC+0.5GA₃) değerlerin tümü birlikte analizlere tabi tutulduğunda istatistiksel olarak önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır.

Çimlenme oranına 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun etkisi Çizelge 4.39'da görülmektedir. Çizelgeden de anlaşılabacağı gibi tür bazında besin ortamlarının etkisi yalnızca *D.neschalkiorum*'da önemli düzeyde farklı bulunmuş ve yüksek oranla kendini göstermiştir. Diğer kombinasyonlar genel olarak birbirine yakın gruplar içinde yer almıştır. *D.neschalkiorum*'u takip eden tür *P. chlorantha* olmuş, diğer türler ise düşük çimlenme oranlarıyla gerilerde kalmıştır. En yüksek çimlenme oranının elde edildiği kombinasyonlar '*D.neschalkiorum* + KC' (% 42.15), '*D.neschalkiorum* + ½ MS+0.5GA₃' (% 32.98), '*D.neschalkiorum* + KC+0.5GA₃' (% 32.74) olmuştur.

Çizelge 4.39 Deneme V’te, ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	½ MS	13.59 bc
	½ MS+0.5GA ₃	32.98 a
	KC	42.15 a
	KC+0.5GA ₃	32.74 a
<i>Orchis simia</i>	½ MS	4.52 b-d
	½ MS+0.5GA ₃	2.62 d
	KC	2.83 d
	KC+0.5GA ₃	3.41 cd
<i>Platanthera chlorantha</i>	½ MS	11.70 b-d
	½ MS+0.5GA ₃	10.90 b-d
	KC	17.58 b
	KC+0.5GA ₃	6.50 b-d
<i>Dactylorhiza romana</i>	½ MS	7.44 b-d
	½ MS+0.5GA ₃	8.47 b-d
	KC	3.77 cd
	KC+0.5GA ₃	7.14 b-d

P. chlorantha kombinasyonları arasında istatistiksel olarak aralarında farklılık bulunmaksızın %6.50 ile %17.58 arasında değişen çimlenme oranları belirlenmiştir. *D. romana* türüne ait kombinasyonlar arasında önemli düzeyde farklılık bulunmamış olup çimlenme oranı değerleri %3.77 ile % 8.47 arasında meydana gelmiştir. *O. simia* türü de daha düşük çimlenme değerleri vermekle birlikte, aynı istatistiksel gruplar içinde yerini almış, %2.62 ile %4.52 arasında çimlenme oranlarına sahip olmuştur.

4.1.5.2 Protokorm oluşturma oranı

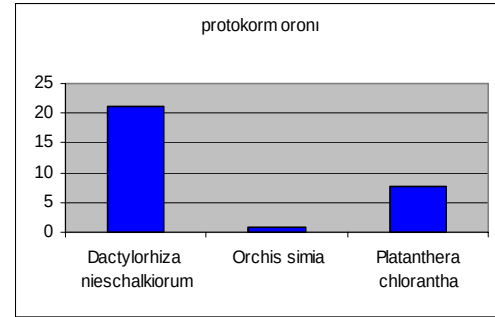
Önceki aşamalarda protokorm oluşturma özelliği bakımından başarılı bulunan *D. neschalkiorum* türünün yanı sıra Deneme V’te ilk kez tohum ekimi yapılan *O. simia* ve *P. chlorantha* türlerinde protokorm oluşumu meydana gelmiştir. *D. romana* türünde ise protokorm oluşumu sağlanamamıştır. Protokorm elde edilen orkide türlerinde yapılan istatistiki analiz sonucunda; türler arasındaki farklılık çok belirgin olurken, besin ortamları arasındaki farklılık daha az bir gruplaşma ile kendini ifade etmiş; ‘Tür +

Besin ortamı' interaksyonu ise genel olarak istatistiki bakımdan % 5 seviyesinde önemsiz bulunmuştur.

Türler arasında protokorm oluşturma oranı bakımından ortaya çıkan farklılık, çok belirgin biçimde besin ortamı bileşimi faktöründen ayrılmıştır. Çizelge 4.40 ve Şekil 4.38'de türlere göre protokorm oluşturma oranları gösterilmiştir.

Çizelge 4.40 ve Şekil 4.38 Deneme V'de farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Dactylorhiza nischalkiorum</i>	21.16 a
<i>Orchis simia</i>	0.78 c
<i>Platanthera chlorantha</i>	7.59 b

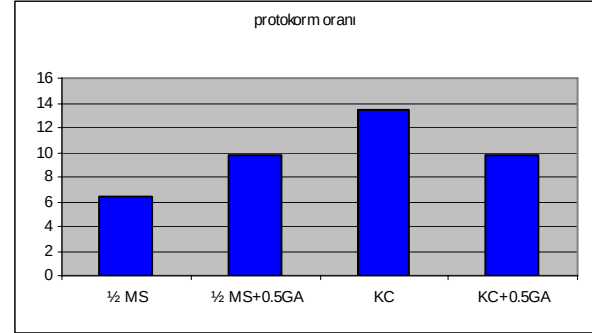


En yüksek protokorm oluşturma oranı % 21.16 ile *D.nischalkiorum* türünde gerçekleşmiş, bunu % 7.59 ile *P.chlorantha* izlemiştir. En düşük protokorm oluşturma oranı ise % 0.78 ile *Orchis simia*'da tespit edilmiştir.

Protokorm oluşturma oranına etkisi bakımından besin ortamları arasında farklılık tespit edilmiş olup KC ortamı, 1/2 MS ortamına göre daha iyi performansa sahip olmuştur. En yüksek protokorm oluşturma oranı % 13.40 ile KC ortamında saptanmış, bunu sırasıyla (% 9.82, % 9.75) 0.5mg/l GA₃ ilave edilen KC ve ½ MS ortamları izlemiştir. ½ MS ortamı, protokorm oluşturma özelliği bakımından geride kalarak sadece %6.39'luk bir performans sergileyebilmiştir (Çizelge 4.41 ve Şekil 4.39).

Çizelge 4.41 ve Şekil 4.39 Deneme V'te farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin üç orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

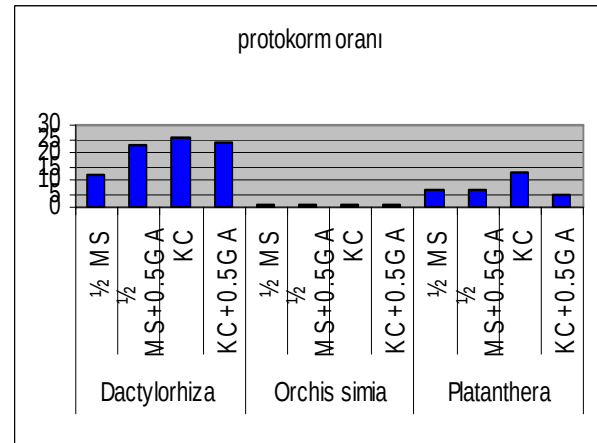
Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
½ MS	6.39 b
½ MS+0.5GA ₃	9.75 ab
KC	13.40 a
KC+0.5GA ₃	9.82 ab



“Tür + Besin ortamı” interaksiyonunun protokorm oluşum oranına etkisi incelendiğinde *D. neschalkiorum*’a ait kombinasyonların ilk sırada yer aldıkları gözlenmektedir (Çizelge 4.42 ve Şekil 4.40). En yüksek protokorm oluşturma oranının elde edildiği kombinasyonlar ‘*D.neschalkiorum* + KC’ (% 25.82), ‘*D.neschalkiorum* + KC+0.5GA₃’ (% 24.06), ‘*D.neschalkiorum* + ½ MS+0.5GA₃’ (% 22.52) olmuştur.

Çizelge 4.42 ve Şekil 4.40 Deneme V'te ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	½ MS	12.22 b-d
	½ MS+0.5GA ₃	22.52 a-c
	KC	25.82 a
	KC+0.5GA ₃	24.06 a-c
<i>Orchis simia</i>	½ MS	0.48 e
	½ MS+0.5GA ₃	0.68 e
	KC	1.25 e
	KC+0.5GA ₃	0.69 e
<i>Platanthera chlorantha</i>	½ MS	6.46 de
	½ MS+0.5GA ₃	6.06 de
	KC	13.12 b-d
	KC+0.5GA ₃	4.71 de



P. chlorantha kombinasyonları arasında istatistiksel olarak aralarında farklılık bulunmaksızın %4.71 ila %13.12 arasında değişen protokorm oluşturma oranları

belirlenmiştir. *O.simia* türü çok düşük protokorm oluşturma değerleri vermekle birlikte, *P. chlorantha*'ya yakın istatistiksel gruplar içinde yerini almış, %0.48 ila %1.25 arasında protokorm oluşturma oranlarına sahip olmuştur.

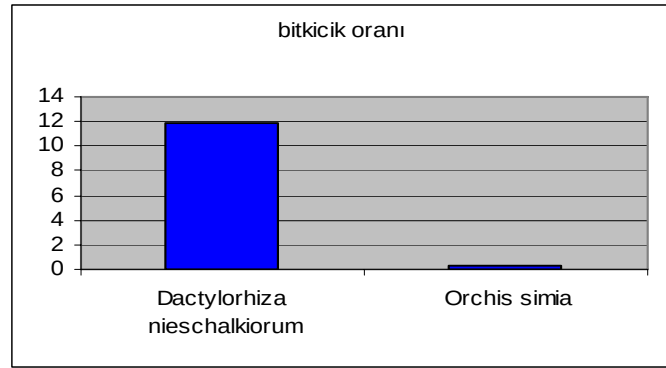
4.1.5.3 Bitki gelişme oranı

Deneme V'te protokorm oluşturan türlerden *Dactylorhiza neschalkiorum* ile *Orchis simia*'da bitkicik oluşumu sağlanabilmiştir. *Platanthera chlorantha*'da ise protokormdan bitkiye dönüşüm gerçekleşmemiştir. Bitki gelişme oranına türler, besin ortamları ve "Tür x Besin ortamı" interaksiyonunun etkisi istatistiki olarak % 5 seviyesinde önemli bulunmuştur.

Türler arasında bitki gelişme oranı bakımından çok belirgin bir farklılık ortaya çıkmış olup *D. neschalkiorum*'da bu oran % 11.80, *O. simia*'da ise % 0.26 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.43 ve Şekil 4.41).

Çizelge 4.43 ve Şekil 4.41 Deneme V'te farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Bitki gelişme oranı (%)
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	11.80 a
<i>Orchis simia</i>	0.26 b



O.simia, çok az sayıda bitki oluşturmuştur. Fakat bunların düzgün bir gelişime sahip olması, sonraki çalışmalar için umut vericidir (Şekil 4.42).

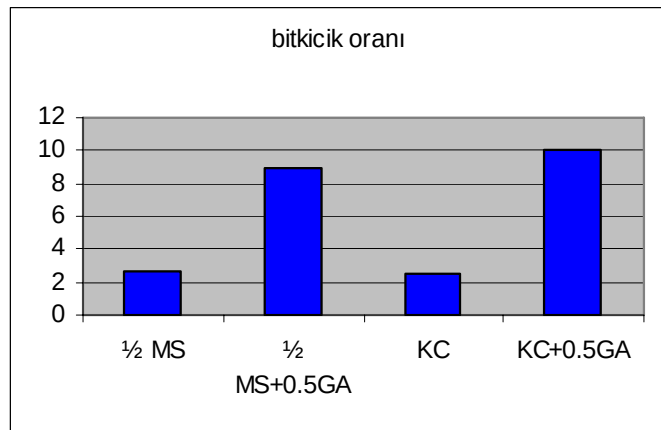


Şekil 4.42 *O.simia* türünde az sayıdaki bitki gelişimi (KC+0.5mg/l GA₃)

İki türün ortalaması üzerinden yapılan hesaplamalar esas alınarak karşılaştırıldığında besin ortamları arasında bitki gelişme oranı bakımından farklılıklar önemli görülmüştür (Çizelge 4.44 ve Şekil 4.43). Her iki besin ortamına da 0.5 mg/l GA₃ ilave edilmesi, bitki gelişme oranını önemli düzeyde artırmıştır. En yüksek bitki gelişme oranları % 10.02 ve % 8.99 değerleriyle KC+ 0.5mg/l GA₃ ve ½ MS+0.5mg/l GA₃ ortamlarında tespit edilmiş ve istatistiki olarak aynı grupta yer almışlardır. ½ MS ve KC ortamları arasında bitki gelişme oranı bakımından önemli farklılık ortaya çıkmamıştır (sırasıyla %2.66 ve 2.45).

Çizelge 4.44 ve Şekil 4.43 Deneme V'te farklı besin ortamı bileşimi ve GA₃ ilavesinin iki orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

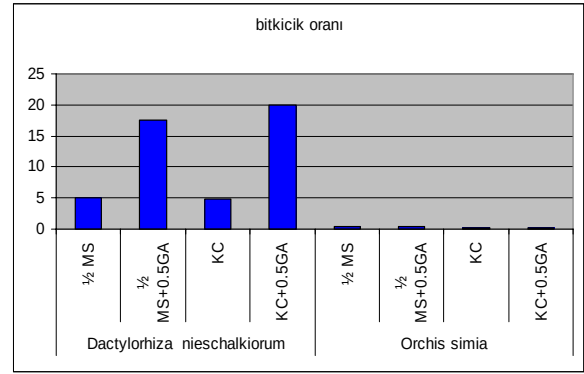
Besin ortamı	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	2.66 b
½ MS+0.5GA ₃	8.99 a
KC	2.45 b
KC+0.5GA ₃	10.02 a



Bitki gelişme oranı bakımından her ne kadar ‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonu etkisi bulunmuş olsa da; tür faktörünün belirleyici etkisi daha baskındır (Çizelge 4.45 ve Şekil 4.44). Deneme V’ten elde edilen sonuçlar; *D. nieschalkiorum*’da bitki gelişme oranının denemedeki diğer türden belirgin olarak yüksek olduğu; ½ MS ve KC ortamlarına 0.5 mg/l GA₃ ilave etmenin bitki gelişme oranı üzerinde olumlu etki yaptığı biçiminde özetlenebilir.

Çizelge 4.45 ve Şekil 4.44 Deneme V’te ‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Bitki gelişme oranı (%)
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	½ MS	5.02 b
	½ MS+0.5GA ₃	17.56 a
	KC	4.77 b
	KC+0.5GA ₃	19.87 a
<i>Orchis simia</i>	½ MS	0.31 c
	½ MS+0.5GA ₃	0.42 c
	KC	0.13 c
	KC+0.5GA ₃	0.16 c



Her ne kadar *Platanthera chlorenta* türü bitki gelişimi kayıtlarına dahil edilmemişse de, az miktarda yavaş gelişen bitkicikler oluşturmuştur. Şekil 4.45’de de görüleceği gibi gelişmesi bir miktar yavaş ve küçük habitüslü bitkicikler oluşmasına rağmen, bunlarda da başarı elde edilebileceği yönünde bir ışık yakmaktadır.



Şekil 4.45 Kuvvetli protokormlar geliştiren ancak az sayıda bitkiye dönüşen *Platanthera chlorantha* türüne ait örnekler (KC)

4.1.6 Deneme VI

Deneme VI'da, çalışmamızın önceki aşamalarında türler arasında üstün performanslarıyla dikkat çeken türlerden *Orchis coriophora*, *Dactylorhiza nischalkiorum* ve *Serapias vomeracea* türleri kullanılmıştır. Bunların yanında, *Dactylorhiza* cinsine ait olmasına rağmen başarı gösteremeyen *Dactylorhiza romana* da yeniden denemelere dahil edilmiştir. Temel besin ortamı olarak sadece KC ile bunun inorganik azot ilave edilmemiş formu kullanılmış; ayrıca 0.5 mg/l GA₃ katkısı bir kez daha incelemeye alınmıştır.

4.1.6.1 Çimlenme oranı

Çimlenme oranı için yapılan varyans analizi sonucunda türler, besin ortamları arasındaki farklılıklar ile 'Tür + Besin ortamı' interaksyonu $p \leq 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. *D.romana* türünde çimlenme meydana gelmediği için deneme dışı bırakılmıştır.

Deneme VI'da incelenen ve önceki deneme aşamalarında diğer türlere göre yüksek oranda çimlenme elde edilen üç orkide türünde de tohum çimlenmesi meydana gelmiştir. Bu türler arasında en yüksek çimlenme oranı % 64.24 değeri ile *O. coriophora*'da belirlenmiş; bu türü % 46.06 ile *S.vomeracea* izlemiş ve *D. nieschalkiorum* % 29.80'luk bir oranla çimlenme bakımından üçüncü sırada yer almıştır (Çizelge 4.46).

Çizelge 4.46 Deneme VI'da farklı orkide türüne ait tohumların dört besin ortamında çimlenme oranı (%)

Tür	Çimlenme oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	64.24 a
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	29.80 c
<i>Serapias vomeracea</i>	46.06 b

Besin ortamı bileşimindeki değişikliklerin çimlenme oranı üzerindeki etkileri farklı olmuştur. İnorganik azotunda azaltma yapılmayan ve gibberellik asit ilave edilmeyen KC ortamı, genel ortalamalar esas alınarak yapılan değerlendirmede; en yüksek çimlenme oranını veren ortam olmuştur (%55.24). KC-N ortamı %47.39, KC+0.5 GA₃ ortamı %44.72 çimlenme oranlarıyla KC'nin gerisinde kalmış ve en düşük çimlenme oranı ise KC-N+0.5GA₃ ortamından elde edilmiştir (Çizelge 4.63).

Çizelge 4.47 Deneme VI'da farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin üç orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
KC	55.24 a
KC+0.5GA ₃	44.72 bc
KC-N	47.39 b
KC-N+0.5GA ₃	39.45 c

'Tür + Besin ortamı' interaksyonu önemli bulunduğundan Çizelge 4.48'de türlerden elde edilen sonuçlar besin ortamlarına göre verilmiştir. Buna göre en yüksek çimlenme

oranının ‘*S. vomeracea* + KC’ kombinasyonunda ortaya çıktığı görülmektedir (%71.98). Bununla aynı istatistiksel grup içinde yer alan kombinasyonlar şunlardır: ‘*O. coriophora* + KC-N’ (%70.40), ‘*O. coriophora* + KC-N+0.5GA₃’ (%66.16), ‘*O. coriophora* + KC’ (%62.22) ve ‘*O. coriophora* + KC+0.5GA₃’ (%58.19).

0.5 mg/l GA₃ katkısı, Deneme V’te olduğu gibi *D. nieschalkiorum* türünde çimlenme oranı üzerinde bir miktar olumlu etki yapmış ve bu oranı artırmıştır. Ancak sayısal olarak bir miktar yükselen bu değer, istatistiksel anlamda aynı tür içerisinde diğer ortamlardan önemli sayılabilecek bir düzeyde olmamıştır. Diğer iki türde de GA₃ katkısının çimlenme oranını artırma yönünde çok önemli katkısının olmadığı, hatta bir miktar azaltıcı etkilerinin de olduğu gözlenmiştir. Ayrıca *O. coriophora* türü hariç tutulduğunda inorganik azot kaynağının besin ortamından uzaklaştırılması da *D. nieschalkiorum* ve *S. vomeracea* türlerinde çimlenme üzerinde olumsuz etki yapmıştır. *O. coriophora* türü ise besin ortamındaki azot kaynağının varlığı veya yokluğu, bunun 0.5 mg/l GA₃ ile kombine edilmesi veya edilmemesi gibi durumlardan önemli düzeyde etkilenmemiştir. Tüm bu özellikler birlikte değerlendirildiğinde *O. coriophora* türünün diğerlerine göre doku kültüründe çimlenme potansiyelinin daha yüksek olduğu kanaati oluşmuştur.

Çizelge 4.48 Deneme VI’da ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	KC	62.22 a
	KC+0.5GA ₃	58.19 ab
	KC-N	70.40 a
	KC-N+0.5GA ₃	66.16 a
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	KC	31.52 de
	KC+0.5GA ₃	41.62 cd
	KC-N	24.27 e
	KC-N+0.5GA ₃	21.80 e
<i>Serapias vomeracea</i>	KC	71.98 a
	KC+0.5GA ₃	34.34 c-e
	KC-N	47.51 bc
	KC-N+0.5GA ₃	30.41 de

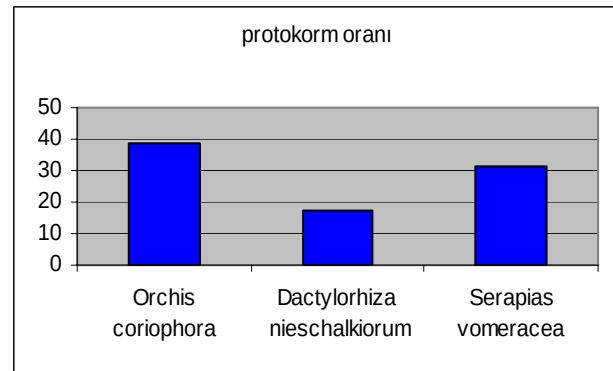
4.1.6.2 Protokorm oluşturma oranı

Deneme VI'da çimlenme meydana gelen türlerin hepsinde protokorm elde edilmiş ve protokorm oluşturma oranına etki eden faktörlerin tamamı istatistiki olarak $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur.

Türler itibariyle ve tüm ortamlardan elde edilen değerlerin ortalaması üzerinden yapılan hesaplamalar sonucunda, en yüksek protokorm oluşumu % 38.35 ile *O. coriophora*'dan sağlanırken, bunu % 31.27'lik oran ile *S. vomeracea* izlemiş ve en düşük protokorm oluşumu ise % 17.26 ile *D. nieschalkiorum*'da saptanmıştır (izelge 4.49 ve şekil 4.46).

Çizelge 4.49 ve şekil 4.46 Deneme VI'da farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

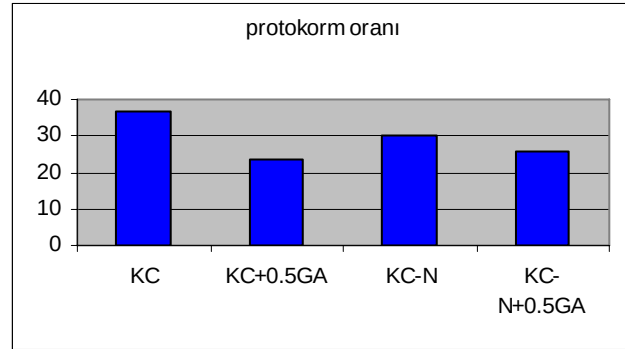
Tr	Protokorm oluşum oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	38.35 a
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	17.26 c
<i>Serapias vomeracea</i>	31.27 b



Her üç türden elde edilen protokorm oluşturma değerlerinin ortalaması üzerinden yapılan hesaplamalarda besin ortamı bileşimleri arasında farklılık önemli bulunmuştur. Azot içeriği, KC ortam reçetesinde verildiği gibi kullanılan ortamlar, genel olarak en yüksek başarıyı sağlamıştır (%36.87). Bunun ardından ikinci sırada gibberellik asit ilave edilmeyen ortam yer almıştır (%30.02). KC-N+0.5GA₃ ortamı ikinci sıradakiyle önemsiz düzeyde bir farklılık göstermiş (%25.51), aynı zamanda kendinden sonra gelen KC+0.5GA₃ ortamından elde edilen oranla (%23.43) da aynı Duncan harfini paylaşmıştır (izelge 4.50 ve şekil 4.47).

Çizelge 4.50 ve Şekil 4.47 Deneme VI'da farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin üç orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

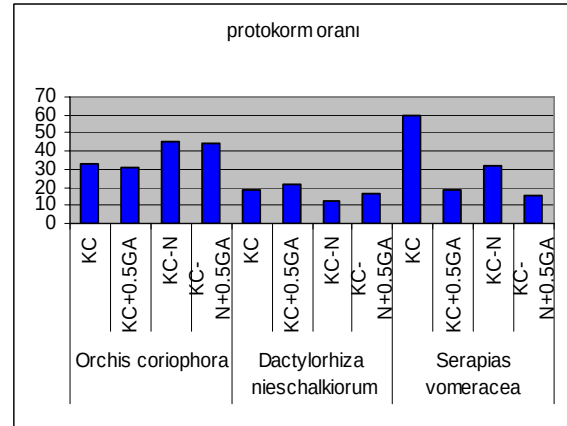
Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
KC	36.87 a
KC+0.5GA ₃	23.43 c
KC-N	30.02 b
KC-N+0.5GA ₃	25.51 bc



Çizelge 4.51'e ve Şekil 4.48'e bakıldığında, denemeye alınan türlerde besin ortamı içeriği ile türler arasındaki interaksyonun önemi açıkça görülmektedir. Bu tablonun en dikkat çeken kombinasyonu '*S. vomeracea* + KC' dir ve %59.21'lik protokorm oluşum oranı ile ilk sırayı almaktadır. Bunun ardından ikinci sırayı '*O. coriophora* + KC-N' (%45.02), '*O. coriophora* + KC-N+0.5GA₃' (%44.69) almaktadır. *O. coriophora* + KC' ile *O. coriophora* + KC+0.5GA₃' kombinasyonları sırasıyla % 33.30 ve %30.37'lik protokorm oluşum oranlarıyla üçüncülüğü, '*S. vomeracea* + KC-N' (%32.42) ile paylaşmaktadır. Diğer kombinasyonların tümü aynı grubu paylaşmakta ve dördüncülüğü temsil etmektedir.

Çizelge 4.51 ve Şekil 4.48 Deneme VI'da 'Tür + Besin ortamı' interaksyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	KC	33.30 c
	KC+0.5GA ₃	30.37 c
	KC-N	45.02 b
	KC-N+0.5GA ₃	44.69 b
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	KC	18.09 d
	KC+0.5GA ₃	21.51 d
	KC-N	12.62 d
	KC-N+0.5GA ₃	16.81 d
<i>Serapias vomeracea</i>	KC	59.21 a
	KC+0.5GA ₃	18.39 d
	KC-N	32.42 c
	KC-N+0.5GA ₃	15.04 d



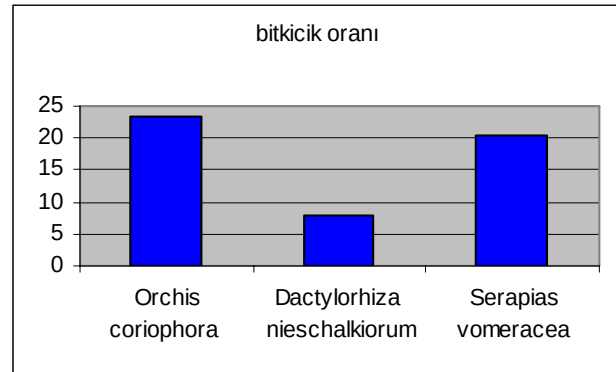
4.1.6.3 Bitki gelişme oranı

Deneme VI'da ele alınan türlerin hepsinde bitki gelişmesi sağlanmış, yapılan varyans analizi sonucunda ise, türler, besin ortamları ve “Tür + Besin ortamı” interaksyonu arasındaki farklılıkların önemli olduğu görülmüştür.

Bundan önceki denemelerde olduğu gibi, protokormlardan bitkicik oluşumu üzerine türlerin etkisi farklı olmuş ve en yüksek bitki gelişme oranı % 23.22 ile *O. coriophora* türünde meydana gelmiştir. Bunu % 20.43 ile *S. vomeracea* izlemiş, en düşük oran ise % 8.01 ile *D. nieschalkiorum*'da hesaplanmıştır (Çizelge 4.52 ve Şekil 4.49).

Çizelge 4.52 ve Şekil 4.49 Deneme VI'da farklı orkide türlerinin dört besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

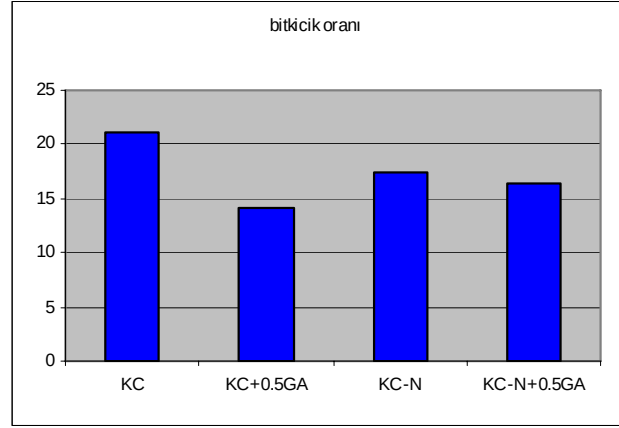
Tür	Bitki gelişme oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	23.22 a
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	8.01 c
<i>Serapias vomeracea</i>	20.43 b



Besin ortamları itibariyle en yüksek bitki gelişme oranı (% 21.02) KC ortamında belirlenmiş olup diğer ortamlardan farklılık göstermiştir. Diğer üç ortam arasında bitki gelişme oranı bakımından önemli düzeyde farklılık belirlenmemiştir (Çizelge 4.53 ve Şekil 4.50).

Çizelge 4.53 ve Şekil 4.50 Deneme VI'da farklı besin ortamı bileşimi ve GA₃ ilavesinin iki orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Bitki gelişme oranı (%)
KC	21.02 a
KC+0.5GA ₃	14.18 b
KC-N	17.39 b
KC-N+0.5GA ₃	16.30 b



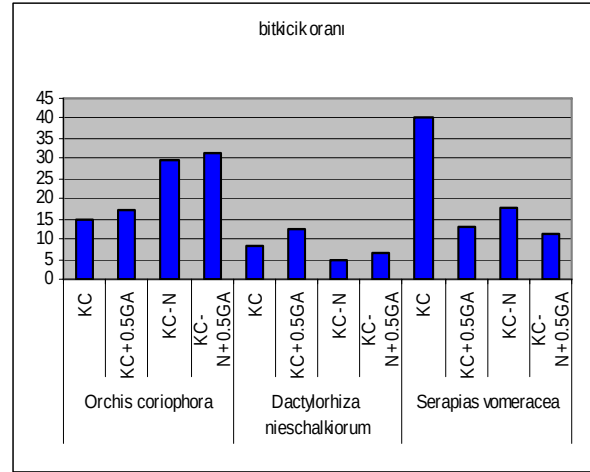
Çizelge 4.54 ve Şekil 4.52’te ise “Tür + Besin ortamı” interaksyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi gösterilmiştir. Buna göre en yüksek oranda bitkicik oluşumu *S. vomeracea*’de % 40.24’lik oran ile KC ortamında, elde edilmiştir. Bunun ardından *O. coriophora*’da % 31.13 ile inorganik azotun ilave edilmediği ancak 0.5 mg/l GA₃’ün ilave edildiği KC ortamından ve %29.90’lık değer ile inorganik azotun ve 0.5 mg/l GA₃’ün ikisinin birden ilave edilmediği ortamdan en yüksek oranda bitki gelişiminin sağlandığı görülmektedir. Şekil 4.51’de KC-N ortamında gelişen *O. coriophora* bitkicikleri gösterilmiştir. Bu iki türün haricinde *D. nieschalkiorum*’da bitki gelişme oranı oldukça düşük meydana gelmiş ve genel olarak inorganik azot kaynağının ortamda bulunması tür tarafından tercih edilir bulunmuştur.



Şekil 4.51 İnorganik azot içermeyen KC ortamında (KC-N) gelişen *O.coriophora* bitkicikleri

Çizelge 4.54 ve Şekil 4.52. Deneme VI'da 'Tür + Besin ortamı' interaksiyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Bitki gelişme oranı (%)
<i>Orchis coriophora</i>	KC	14.83 cd
	KC+0.5GA ₃	17.02 c
	KC-N	29.90 b
	KC-N+0.5GA ₃	31.13 b
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	KC	8.00 e-g
	KC+0.5GA ₃	12.57 c-e
	KC-N	4.73 g
	KC-N+0.5GA ₃	6.74 fg
<i>Serapias vomeracea</i>	KC	40.24 a
	KC+0.5GA ₃	12.94 c-e
	KC-N	17.54 c
	KC-N+0.5GA ₃	11.02 d-f



4.1.7 Deneme VII

Deneme VII, final aşaması deneylerini kapsamaktadır. İki yılı aşkın çimlendirme ve bitkiye dönüşüm aşamalarının çok sayıdaki türde değişik kombinasyonlar halinde denenmesi sonucunda önemli bilgilere ayrı ayrı ulaşılmıştır. Deneme VII'nin amacı, bitki elde edilebilen türlerde, başarılı sonuç verdiği gözlemlenen besin ortamı bileşimleriyle yeni bir çalışma yapılması ve tüm bu kombinasyonların bir arada değerlendirilebilmesidir. Bunun için başarı elde edilen beş orkide türü, yine önceki çalışmalarımızda kullandığımız üç değişik temel besin ortamı ile üç farklı GA₃ uygulamasının çimlenme oranı, protokorm oluşum oranı ve bitki gelişme oranı üzerine etkileri araştırılmıştır.

4.1.7.1 Çimlenme oranı

Dactylorhiza neschalkiorum, *Orchis coriophora*, *Orchis morio*, *Serapias vomeracea* ve *Orchis laxiflora* türlerine ait tohumlar, diğer denemelerde olduğu gibi Deneme VII'de de kültüre alma işleminden üç ay sonra incelenerek çimlenme oranları belirlenmiştir. Farklı orkide türü, besin ortamı bileşimi ve 'Tür + Besin ortamı' interaksiyonunun çimlenme oranları üzerine etkisi incelenmiş; yapılan istatistiksel analizler sonucunda tür, besin ortamı ve 'Tür + Besin ortamı' interaksiyonun $p \leq 0.05$ düzeyinde önemli olduğu ortaya konmuştur.

Çimlenme oranları bakımından tür bazında tüm ortamlardan elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilip ortalamalar üzerinden hesaplamalar yapıldığında her türün çimlenme oranı bir diğerinden farklı bulunmuş ve farklı Duncan harflerine sahip olmuştur (Çizelge 4.55). *O.morio*, çimlenme oranı bakımından tüm türlerden önemli farklılık göstererek birinci sıraya oturmuştur (%84.94). Bunun ardından sırasıyla *O.coriophora* (% 46.72) ve *S. vomeracea* (% 39.57) ikinci ve üçüncü sıraları almışlardır. *D. neschalkiorum* ve *O. laxiflora* ise son iki sırada kalmışlardır (%23.08 ve %15.67).

Çizelge 4.55 Deneme VII’de farklı orkide türüne ait tohumların dokuz besin ortamında çimlenme oranı (%)

Tür	Çimlenme Oranı (%)
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	23.08 d
<i>Orchis coriophora</i>	46.72 b
<i>Orchis morio</i>	84.94 a
<i>Serapias vomeracea</i>	39.57 c
<i>Orchis laxiflora</i>	15.67 e

Çimlenme oranına etkisi bakımından besin ortamı bileşimleri karşılaştırıldığında, en yüksek çimlenme oranının (% 60.11) hormonsuz KC ortamından elde edildiği anlaşılmaktadır. KC ile 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ kombinasyonu yapıldığında, bu ortam bileşimleri de türler ortalamasında çimlenme oranı bakımından yüksek değerlere sahip olmaktadır (%50.16 ve % 48.06). Hormonsuz VW&DB ortamı, çimlenme oranı bakımından üçüncü sırayı tek başına almış (%44.16) ve bu ortamın 0.1 mg/l veya 0.5 mg/l GA₃ ilave eden kombinasyonları ile ½ MS+0.1 GA₃ kombinasyonu sırasıyla %38.17, %37.30 ve %38.15 çimlenme oranlarına sahip olmuşlar ve dördüncü sırada yer almışlardır. En düşük çimlenme oranını veren ortam kombinasyonları ise %31.68 ve % 30.16 değerleriyle ½ MS ve ½ MS+0.5 GA₃ olmuştur (Çizelge 4.56).

Çizelge 4.56 Deneme VII’de farklı besin ortamı bileşimi ve GA₃ ilavesinin beş orkide türü bazında çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme Oranı (%)
½ MS	31.68 e
½ MS+0.1 GA ₃	38.15 d
½ MS+0.5 GA ₃	30.16 e
VW&DB	44.16 c
VW&DB +0.1 GA ₃	38.17 d
VW&DB +0.5 GA ₃	37.30 d
KC	60.11 a
KC+0.1 GA ₃	50.16 b
KC+0.5 GA ₃	48.06 bc

Çizelge 4.57’de ise farklı türler ile farklı besin ortamlarının çeşitli kombinasyonlarındaki çimlenme oranları, detaylarıyla ve interaksyonu gösteren Duncan harfleriyle birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.57 Deneme VII’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonunun çimlenme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	½ MS	13.22 tu
	½ MS+0.1 GA ₃	13.64 s-u
	½ MS+0.5 GA ₃	32.75 l-o
	VW&DB	20.71 p-u
	VW&DB +0.1 GA ₃	12.00 u
	VW&DB +0.5 GA ₃	14.81 s-u
	KC	33.07 l-o
	KC+0.1 GA ₃	32.41 l-o
	KC+0.5 GA ₃	35.14 l-n
<i>Orchis coriophora</i>	½ MS	32.45 l-o
	½ MS+0.1 GA ₃	40.48 k-m
	½ MS+0.5 GA ₃	23.14 o-s
	VW&DB	56.28 g-i
	VW&DB +0.1 GA ₃	38.59 k-m
	VW&DB +0.5 GA ₃	46.90 i-k
	KC	64.69 e-g
	KC+0.1 GA ₃	59.70 e-h
	KC+0.5 GA ₃	58.26 f-g
<i>Orchis morio</i>	½ MS	65.43 ef
	½ MS+0.1 GA ₃	80.02 d
	½ MS+0.5 GA ₃	68.54 e
	VW&DB	89.16 bc
	VW&DB +0.1 GA ₃	92.40 b
	VW&DB +0.5 GA ₃	88.57 bc
	KC	98.10 a
	KC+0.1 GA ₃	93.14 b
	KC+0.5 GA ₃	89.08 bc
<i>Serapias vomeracea</i>	½ MS	31.98 l-o
	½ MS+0.1 GA ₃	51.70 h-j
	½ MS+0.5 GA ₃	21.26 p-t
	VW&DB	29.37 m-p
	VW&DB +0.1 GA ₃	31.47 l-o
	VW&DB +0.5 GA ₃	19.16 r-u
	KC	83.44 cd
	KC+0.1 GA ₃	46.16 i-k
	KC+0.5 GA ₃	41.56 j-l
<i>Orchis laxiflora</i>	½ MS	15.33 s-u
	½ MS+0.1 GA ₃	4.93 v
	½ MS+0.5 GA ₃	5.13 v
	VW&DB	25.29 n-r
	VW&DB +0.1 GA ₃	16.41 r-u
	VW&DB +0.5 GA ₃	17.04 r-u
	KC	21.24 p-t
	KC+0.1 GA ₃	19.40 r-u
	KC+0.5 GA ₃	16.27 r-u

30 değişik ‘Tür + Besin ortamı’ arasından ‘*O. morio* + KC’ kombinasyonu %98.10 ‘luk çimlenme oranıyla birinci sıraya yerleşmiştir. Bunun ardından *O.morio*’nun KC ortamı ve GA₃ katkılarıyla oluşturulan ve Van Waes& DeBurgh ortamının üç kombinasyonu, çimlenme oranı bakımından tüm diğer kombinasyonlardan üstün olmuştur. ‘*S. vomeracea* + KC’ (% 83.44), ‘*O. coriophora* + KC’ (% 64.69) de yüksek oranlarda çimlenme değeri veren başka bazı kombinasyonlar olarak görünmüştür. *D. nieschalkiorum* ve *O. laxiflora* türlerinin dokuz değişik ortam bileşimindeki sonuçları da genelde çimlenme oranları bakımından en alt sıralarda bulunmuşlardır.

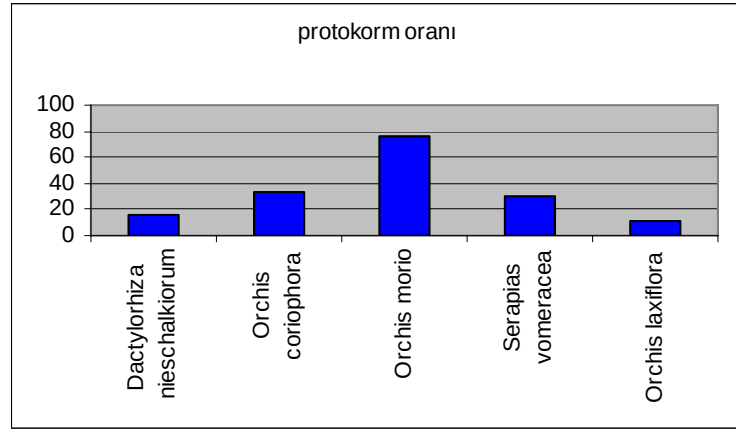
4.1.7.2 Protokorm oluşturma oranı

Çimlenmenin ardından protokorm oluşum oranına etkileri yönüyle türler, besin ortamları ve “Tür + Besin ortamı” interaksyonu arasındaki farklar istatistiki olarak $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur.

Deneme VII’de protokorm oluşum oranı bakımından türlerin etkisi çimlenme oranlarında elde edilen sonuca benzer şekilde sonuçlanmış, en yüksek protokorm oluşumu % 76.26 ile *O. morio*’da tespit edilmiştir. % 33.78 protokorm oluşum oranı ile *O.coriophora* ve % 29.64 ile *S. vomeracea* türleri ikinci ve üçüncü sırayı alan türler olmuştur (Çizelge 4.58 ve Şekil 4.53). *D. nieschalkiorum* ve *O. laxiflora* türleri, ilk üç türe göre daha düşük protokorm oluşturma kapasitesi sergilemişler ve son sıralarda yer almışlardır (% 15.88 ve % 11.20).

Çizelge 4.58 ve Şekil 4.53 Deneme VII’de farklı orkide türlerinin dokuz besin ortamı bileşimi bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

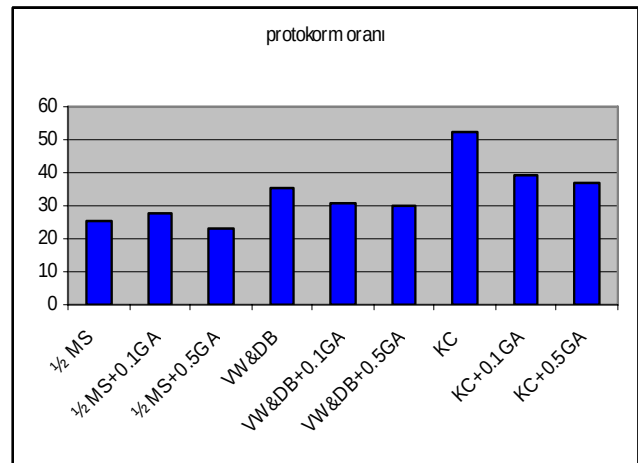
Tür	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Dactylorhiza nischalkiorum</i>	15.88 d
<i>Orchis coriophora</i>	33.78 b
<i>Orchis morio</i>	76.26 a
<i>Serapias vomeracea</i>	29.64 c
<i>Orchis laxiflora</i>	11.20 e



Farklı besin ortamlarının protokorm oluşturma oranına etkileri de farklı olmuş, yine çimlenme oranındaki etkilerine benzer şekilde sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek protokorm oluşumu (% 52.12) türlerin birlikte değerlendirildiği Çizelge 4.59’da da görüleceği gibi KC ortamında belirlenmiştir (Şekil 4.54).

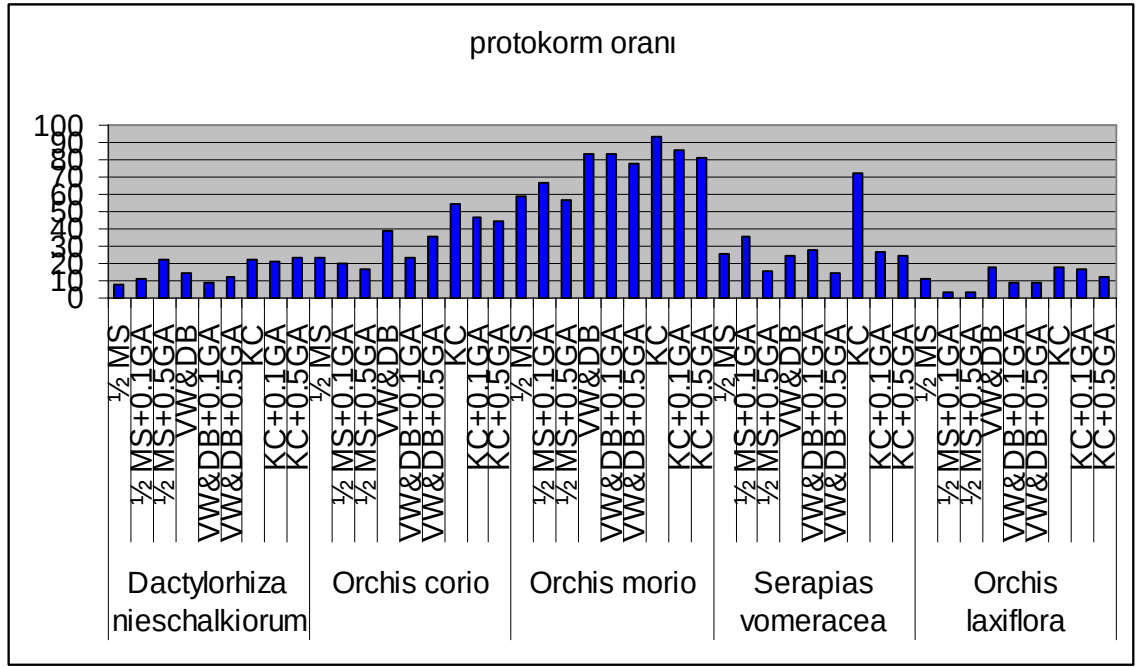
Çizelge 4.59 ve Şekil 4.54 Deneme VII’de farklı besin ortamı bileşimleri ile GA₃ ilavesinin beş orkide türü bazında protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
½ MS	25.26 de
½ MS+0.1 GA ₃	27.39 c-e
½ MS+0.5 GA ₃	23.03 e
VW&DB	35.65 b
VWD+0.1 GA ₃	30.42 c
VW&DB+0.5 GA ₃	29.82 cd
KC	52.12 a
KC+0.1 GA ₃	39.33 b
KC+0.5 GA ₃	37.14 b



KC ortamında olduğu gibi 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ ilavesi yapılmış KC ortamlarında ve hormonsuz VW&DB ortamında protokorm oluşturma oranı bakımından yüksek değerlerin ortaya çıktığı görülmektedir (%39.33, % 37.14 ve %35.65). VW&DB ortamının 0.1 mg/l veya 0.5 mg/l GA₃ ilave eden kombinasyonları ile ½ MS+0.1 GA₃ kombinasyonu sırasıyla %30.42, %29.82 ve %27.39 protokorm oluşturma oranlarına sahip olmuşlar ve üçüncü sırada yer almışlardır. En düşük protokorm oluşturma oranını veren ortam kombinasyonları ise %25.26 ve % 23.03 değerleriyle hormonsuz ½ MS ve ½ MS+0.5 GA₃ olmuştur.

Çizelge 4.60'da ve Şekil 4.55'de 'Tür + Besin ortamı' interaksiyonunun protokorm oluşturma oranına etkisi gösterilmiştir. 'Tür + Besin ortamı' kombinasyonları arasında '*O. morio* + KC' kombinasyonu %93.07'lik protokorm oluşturma oranıyla birinci sıraya yerleşmiştir. Bunun ardından *O.morio*'nun KC ortamı ve GA₃ katkılarıyla oluşturulan ve Van Waes& DeBurgh ortamının üç kombinasyonu, protokorm oluşturma oranı bakımından diğer tüm kombinasyonlardan üstün bulunmuştur (%85.40-%77.81). '*S. vomeracea* + KC' (%72.75), '*O. coriophora* + KC' (%54.94) de yüksek oranlarda protokorm oluşturma değeri veren başka bazı kombinasyonlar olarak görünmüştür. *D. nieschalkiorum* ve *O. laxiflora* türlerinin dokuz değişik ortam bileşimindeki sonuçları da genelde protokorm oluşturma oranları bakımından en alt sıralarda kalmışlardır.*D. nieschalkiorum* türünde KC ortamının üç kombinasyonu ile 0.5mg/l GA₃ ilave edilen ½ MS ortamından en yüksek protokorm oluşturma oranları elde edilmiştir (%23.05 - %21.42). *O. laxiflora*'da ise hormonsuz VW&DB (% 17.72), KC (% 17.41) ve KC + 0.1 GA₃ (%16.39) ortamları en iyi değerleri vermiştir.



Şekil 4.55 Deneme VII’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Çizelge 4.60 Deneme VII’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun protokorm oluşturma oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Protokorm oluşturma oranı (%)
<i>Dactylorhiza nischalkiorum</i>	½ MS	7.28 vy
	½ MS+0.1 GA ₃	11.66 s-v
	½ MS+0.5 GA ₃	22.37 l-r
	VW&DB	14.18 p-v
	VW&DB +0.1 GA ₃	8.65 u-y
	VW&DB +0.5 GA ₃	11.83 s-v
	KC	22.45 l-r
	KC+0.1 GA ₃	21.42 m-s
<i>Orchis coriophora</i>	KC+0.5 GA ₃	23.05 l-p
	½ MS	23.31 l-r
	½ MS+0.1 GA ₃	19.94 m-t
	½ MS+0.5 GA ₃	16.63 m-u
	VW&DB	39.00 h-j
	VW&DB +0.1 GA ₃	22.87 l-r
	VW&DB +0.5 GA ₃	35.68 i-l
	KC	54.94 fg
<i>Orchis morio</i>	KC+0.1 GA ₃	47.21 gh
	KC+0.5 GA ₃	44.48 g-i
	½ MS	58.84 ef
	½ MS+0.1 GA ₃	66.59 de
	½ MS+0.5 GA ₃	56.43 e-g
	VW&DB	83.01 b
	VW&DB +0.1 GA ₃	83.81 b
	VW&DB +0.5 GA ₃	77.81 bc
<i>Serapias vomeracea</i>	KC	93.07 a
	KC+0.1 GA ₃	85.40 b
	KC+0.5 GA ₃	81.40 bc
	½ MS	25.49 k-o
	½ MS+0.1 GA ₃	35.14 i-k
	½ MS+0.5 GA ₃	15.94 n-u
	VW&DB	24.36 k-p
	VW&DB +0.1 GA ₃	27.65 j-m
<i>Orchis laxiflora</i>	VW&DB +0.5 GA ₃	14.90 o-v
	KC	72.75 cd
	KC+0.1 GA ₃	26.22 k-n
	KC+0.5 GA ₃	24.35 k-p
	½ MS	11.40 t-v
	½ MS+0.1 GA ₃	3.64 y
	½ MS+0.5 GA ₃	3.77 y
	VW&DB	17.72 m-u
<i>Orchis laxiflora</i>	VW&DB +0.1 GA ₃	9.12 u-y
	VW&DB +0.5 GA ₃	8.89 u-y
	KC	17.41 m-u
	KC+0.1 GA ₃	16.39 m-u
	KC+0.5 GA ₃	12.42 r-v

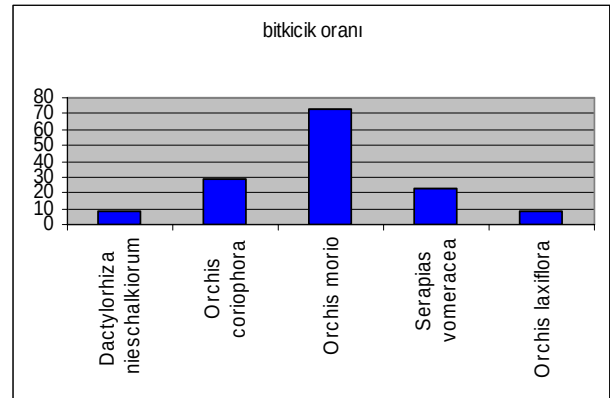
4.1.7.3 Bitki gelişme oranı

Deneme VII’de ele alınan türlerin hepsinde bitki gelişmesi sağlanmış, yapılan varyans analizi sonucunda ise türler, besin ortamları ve “Tür + Besin ortamı” interaksyonu arasındaki farklılıkların önemli olduğu görülmüştür.

Bitki gelişme oranı bakımından türler karşılaştırıldığında, en yüksek oran % 73.36 ile denemenin en başarılı türü olan *O.morio*’da tespit edilmiş, bunu % 28.87 ile *O.corioophora* ve % 22.54 ile *S. vomeracea* izlemiştir (Çizelge 4.61 ve Şekil 4.56)

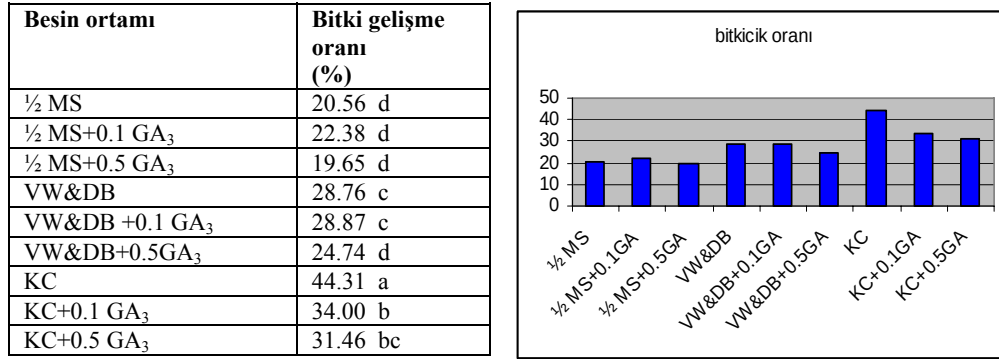
Çizelge 4.61 ve Şekil 4.56 Deneme VII’de farklı orkide türlerinin dokuz besin ortamı bileşimi bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Bitki gelişme oranı (%)
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	8.61 d
<i>Orchis coriophora</i>	28.87 b
<i>Orchis morio</i>	73.36 a
<i>Serapias vomeracea</i>	22.54 c
<i>Orchis laxiflora</i>	8.14 d



Besin ortamlarının (Çizelge 4.62 ve Şekil 4.57) bitki gelişme oranına etkisi incelendiğinde, en yüksek oranın (% 44.31) yine hormonsuz KC ortamından elde edildiği görülmektedir. En düşük oranlar ise ½ MS ve bunun kombinasyonlarında belirlenmiştir (Çizelge 4.83 ve Şekil 4.40). Çimlenme ve protokorm oluşturma özelliklerinde olduğu gibi aynı sıralama bitki gelişme oranı bakımından da ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.62 ve Şekil 4.57 Deneme VII’de farklı besin ortamı bileşimi ve GA₃ ilavesinin beş orkide türü bazında bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)



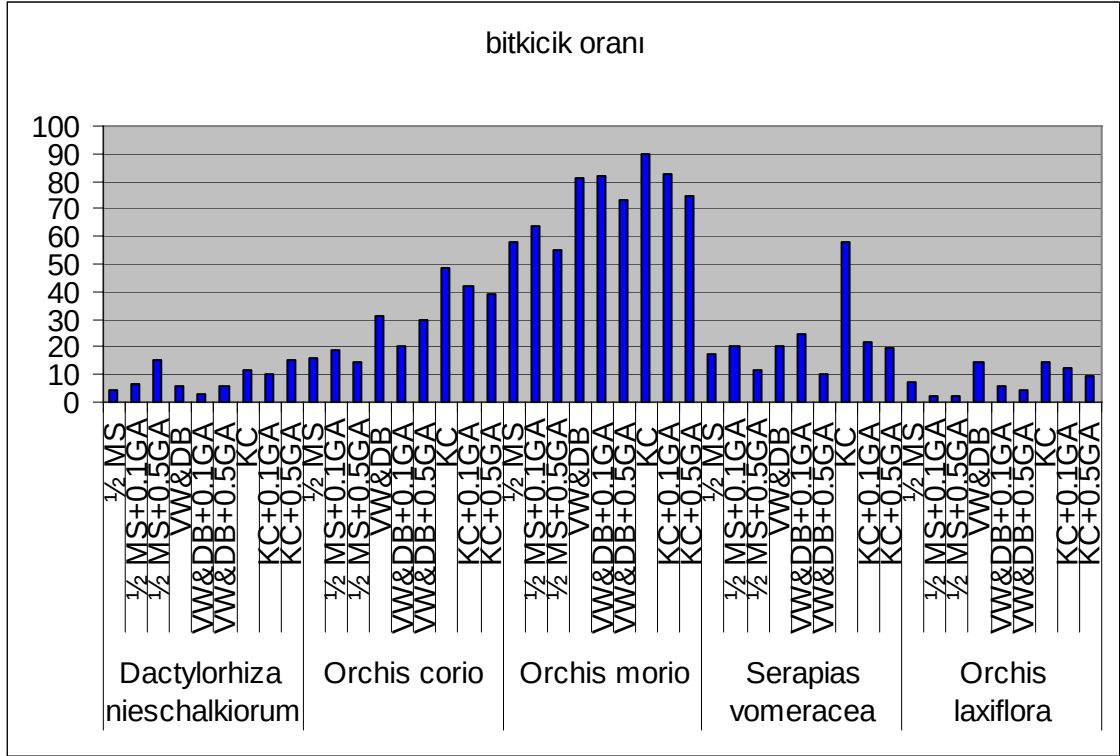
KC ile 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ kombinasyonu yapıldığında, bu ortam bileşimleri de bitki gelişme oranı bakımından yüksek değerlere sahip olmaktadır (%34.00 ve % 31.46). Hormonsuz VW&DB ile bu ortamın 0.1 mg/l GA₃ ilave edileni, bitki gelişme oranı bakımından üçüncü sırayı almışlardır (%28.76 ve 28.87). Diğer ortam bileşimlerinin tümünde bitki gelişme oranı bakımından istatistiksel farklılık olmaksızın daha düşük değerler elde edilmiştir (%24.74 - %19.65).

“Tür + Besin ortamı” interaksyonunun bitki gelişme oranına etkisi de Çizelge 4.63’te gösterilmiştir. Buna göre en yüksek bitki gelişme oranları *O. morio* (% 89.88), *S.vomeracea* (% 57.65) ve *O. coriophora* (% 48.35)’da KC ortamında; *O.laxiflora*’da KC (% 14.41) ve VW&DB+0.1 GA₃ (% 14.18) ortamında; *D.nieschalkiorum*’da ise 0.5 mg/l GA₃ ilave edilen KC ortamında (% 15.32) saptanmıştır.

Çizelge 4.63 Deneme VII’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

Tür	Besin ortamı	Bitki gelişme oranı (%)
<i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	½ MS	4.38 uv
	½ MS+0.1GA ₃	6.74 r-v
	½ MS+0.5GA ₃	14.99 k-o
	VW&DB	5.89 t-v
	VW&DB +0.1 GA ₃	3.07 v
	VW&DB +0.5 GA ₃	5.48 t-v
	KC	11.26 m-t
	KC+0.1 GA ₃	10.38 n-u
	KC+0.5 GA ₃	15.32 k-o
<i>Orchis coriophora</i>	½ MS	15.65 k-o
	½ MS+0.1GA ₃	18.51 k-n
	½ MS+0.5GA ₃	14.60 l-p
	VW&DB	30.81 hi
	VW&DB +0.1 GA ₃	20.60 i-m
	VW&DB +0.5 GA ₃	29.95 ij
	KC	48.35 fg
	KC+0.1 GA ₃	42.28 g
	KC+0.5 GA ₃	39.05 gh
<i>Orchis morio</i>	½ MS	57.94 ef
	½ MS+0.1GA ₃	63.87 de
	½ MS+0.5GA ₃	54.97 ef
	VW&DB	80.92 bc
	VW&DB +0.1 GA ₃	82.14 ab
	VW&DB +0.5 GA ₃	73.27 cd
	KC	89.88 a
	KC+0.1 GA ₃	82.97 a-c
	KC+0.5 GA ₃	74.31 b-d
<i>Serapias vomeracea</i>	½ MS	17.68 k-n
	½ MS+0.1GA ₃	20.31 i-m
	½ MS+0.5GA ₃	11.32 m-t
	VW&DB	20.01 i-m
	VW&DB +0.1 GA ₃	24.37 i-k
	VW&DB +0.5 GA ₃	10.28 n-u
	KC	57.65 ef
	KC+0.1 GA ₃	21.71 i-l
	KC+0.5 GA ₃	19.52 j-m
<i>Orchis laxiflora</i>	½ MS	7.16 p-v
	½ MS+0.1GA ₃	2.48 v
	½ MS+0.5GA ₃	2.38 v
	VW&DB	14.18 l-r
	VW&DB +0.1 GA ₃	6.14 s-v
	VW&DB +0.5 GA ₃	4.71 uv
	KC	14.41 l-p
	KC+0.1 GA ₃	12.65 l-s
	KC+0.5 GA ₃	9.10 o-u

Bitki gelişme oranı bakımından beş tür ve dokuz besin ortamı bileşiminden oluşturulan uygulama kombinasyonlarındaki sayısal değerler kullanılarak çizilen grafik Şekil 4.58’de gösterilmiştir. Şekilde *O.morio* türünün yüksek başarı performansı açıkça görülmektedir.



Şekil 4.58 Deneme VII’de ‘Tür + Besin ortamı’ interaksiyonunun bitki gelişme oranı üzerine etkisi (%)

4.2 Bitki Elde Edilen Türlerde Toplu Sonuçlar

Çalışmamızda toplam onaltı değişik karasal orkide türü materyal olarak kullanılmıştır. Başlangıçta toplanan tür ve bunlara ait tohumlar kullanılarak denemeler kurulmaya başlanmış, bu sırada arazi surveylerine devam edilerek yeni türlere ait bitkiler de bulunarak bunların tohumları alınmıştır. Böylece denemenin farklı aşamalarında yeni türlerin ilave edilmesi söz konusu olmuştur. Çalışmamızın ana hedefinin tek bir türde en yüksek bitki oluşumunu sağlamak üzere yoğunlaşmaktan ziyade, genel olarak salep elde edilen orkide türlerinde *in vitro* koşullarda çimlenme ve bitki oluşumunu sağlayacak besin ortamı bileşimi/ bileşimlerini belirlemek, doku kültürü ile çoğaltmaya olumlu yanıt veren türleri ortaya koymak olduğu daha önce de belirtilmiştir. Bu amaç doğrultusunda yapılan deneylerde bazı türler birden fazla kullanılmış, tekrarlanan denemelerde yer almıştır. Bunlardan elde edilen bulgular deneme bazında önceki bölümlerde açıklanmıştır. Ancak tekrarlanan deneylerde tek bir türden elde edilen bulguların ayrıca değerlendirilmesinin de bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı düşünülerek bu bölüm hazırlanmıştır. Çimlenme, protokorm oluşumu ve bitkiye dönüşüm özellikleri bakımından başarılı bulunan beş türde yapılan deneylerin sonuçları aşağıdaki alt başlıklarda ayrı ayrı sunulmaktadır:

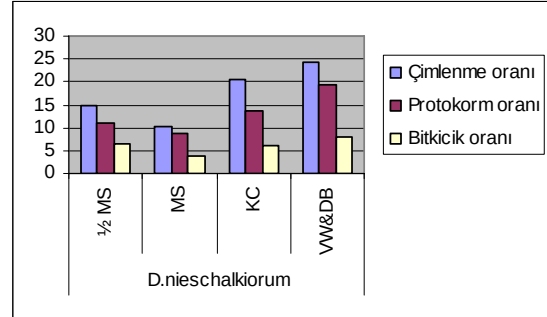
4.2.1 *Dactylorhiza nieschalkiorum*

Yumrularının el gibi görünüşü ve parmakları andıran parçalı yapısından ismini alan *Dactylorhiza nieschalkiorum*'da toplanan bitki sayısının diğerlerine göre fazla olması ve böylece tohum miktarının yeterli olması, bitki oluşumu konusunda başarılı sonuç vermesi; çalışma süresince en çok tekrarlanan tür olmasına neden olmuştur.

D.nieschalkiorum türünün yer aldığı ilk denemede (Deneme I) dört adet temel besin ortamı, hormon katkısı yapılmaksızın çimlenme ve diğer aşamalar için kullanılmıştır. Çizelge 4.64'te ve Şekil 4.59'da bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.64 ve Şekil 4.59 *Dactylorhiza nischalkiorum*'da dört temel besin ortamı bileşiminin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Besin Ortamı	Çimlenme Oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	14.81 b	11.02 ab	6.28 a
MS	10.16 c	8.70 b	3.79 b
KC	20.34 ab	13.49 ab	6.25 a
VW&DB	24.41 a	19.21 a	8.11 a



Denemede en yüksek çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişme oranını veren besin ortamı VW&DB olarak görünmektedir (sırasıyla %24.41, 19.21 ve 8.11). Ancak KC ortamı da sayısal değer olarak bir miktar geride gibi görünse de istatistiksel açıdan birinci sırayı paylaşmaktadır (%20.34, 13.49 ve 6.25). Şekil 4.60'da KC ortamında gelişen protokormlar görünmektedir. ½ MS ortamı da bu iki ortama nazaran çimlenme oranı ve nisbeten de protokorm oluşturma oranı bakımından düşük bir performans göstermiştir (%14.81 ve 11.02). Fakat başlangıçta ortama ekilen tohum miktarına göre değerlendirme yapıldığında %6.28 bitki gelişme oranı ile diğer iki başarılı ortamla aynı grup içinde kalmayı başarmıştır. Bu deneme sonuçlarında MS ortamı en düşük değerlere sahip olan temel besin ortamı olarak kaydedilmiştir. %10.16 çimlenme oranı, %8.70 protokorm oluşturma oranı ve %3.79 bitki gelişme oranı değerleriyle son sırada kalmıştır.



Şekil 4.60 KC ortamında gelişen *D.nieschalkiorum* türüne ait protokormlar

D.nieschalkiorum türünün yer aldığı ikinci denemede (Deneme III) üç adet temel besin ortamı bileşimi ve bununla birlikte 0.1 mg/l GA₃ ilavesi denenmiş olup kültürün ilk 30 gününde karanlıkta tutma ve daha sonra fotoperiyodik aydınlatma veya ilk üç ay sürekli karanlıkta tutmanın çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

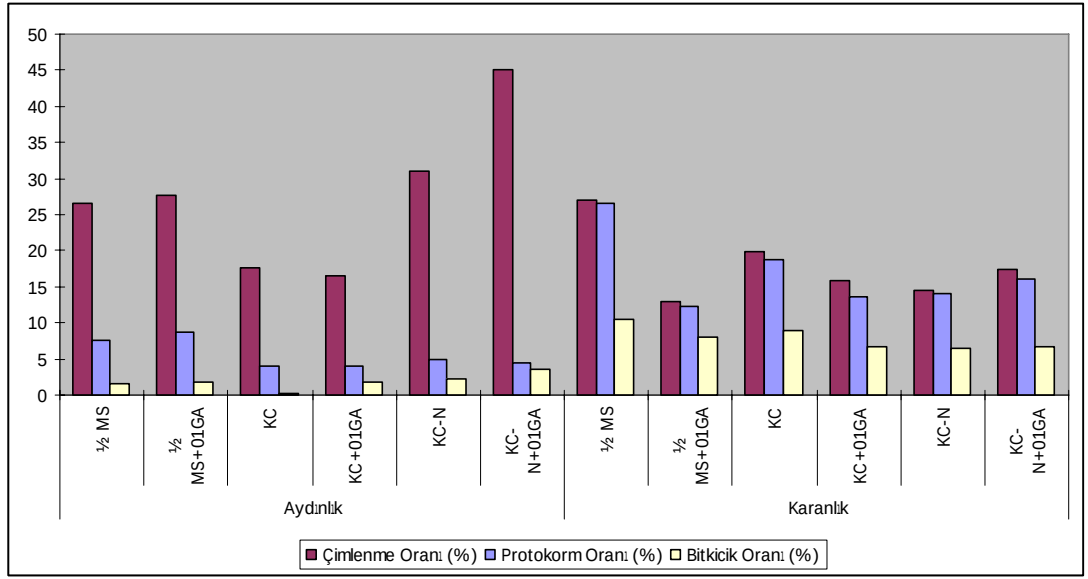
Çizelge 4.65 *Dactylorhiza nieschalkiorum*'da üç temel besin ortamı bileşimi ve 0.1 mg/l GA₃ katkısı ile aydınlık-karanlık uygulamasının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Tür	Işık	Besin Ortamı	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
<i>D.nieschalkiorum</i>	Aydınlık	½ MS	26.51 bc	7.51 e-g	1.58 b
		½ MS+0.1GA ₃	27.74 b	8.79 d-f	1.81 b
		KC	17.72 de	4.09 g	0.25 c
		KC+0.1GA ₃	16.59 de	3.91 g	1.72 b
		KC-N	31.14 b	4.82 fg	2.28 b
		KC-N+0.1GA ₃	45.06 a	4.39 fg	3.61 b
	Karanlık	½ MS	27.08 b	26.66 a	10.56 a
		½ MS+0.1GA ₃	13.03 e	12.39 c-e	7.94 a
		KC	19.93 cd	18.79 b	8.94 a
		KC+0.1GA ₃	15.75 de	13.71 b-d	6.81 a
		KC-N	14.50 de	14.00 bc	6.41 a
		KC-N+0.1GA ₃	17.43 de	16.06 bc	6.59 a

Çizelge 4.65 incelendiğinde en belirgin faktörün inkübasyon koşullarında yapılan aydınlık-karanlık uygulaması olduğu anlaşılmaktadır. Kültürlerin başlangıçtaki ilk 30 gün karanlık ve daha sonra 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyodisite koşullarında bekletilmesi, çimlenme aşamasında bir miktar olumlu etki yapmış görünmektedir. Ayrıca bu kültürlerde henüz başlangıç aşamasında bile yeşerme durumu ortaya çıkmıştır. En yüksek çimlenme oranı %45.06 değeriyle KC-N+0.1GA₃ ortamından ve aydınlık uygulamasından elde edilmiştir. ½ MS ortamı ve karanlık uygulamasından %27.08, ½ MS+0.1GA₃ ortamı ve aydınlık uygulamasından %27.74, ½ MS ortamı ve aydınlık uygulamasından %26.51 oranında çimlenme elde edilmiş olup, bu uygulamaların tümü istatistiksel olarak ikinci sırada yer almışlardır. Diğer uygulamalar ise gerilerde kalmışlardır.

Protokorm oluşturma aşamasına gelindiğinde durum değişmeye başlamıştır. Aydınlık uygulamalarında çimlenen tohumların aynı başarıyı protokorm oluşturma aşamasına taşıyamadıkları, buna karşın karanlıkta tutulan tohumlardan protokorm aşamasına geçme miktarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sıralama tamamen ters dönmüş, karanlıktaki kültürler sıralamada ilk dereceleri almışlardır. En yüksek protokorm oluşturma oranı ½ MS ortamı ve karanlık uygulamasından elde edilmiş (%26.66), bunu diğer karanlık uygulamaları ile yapılan kombinasyonlar izlemiştir (Şekil 4.61).

Bitki gelişme oranı bakımından da sonuçlar protokorm oluşturma aşamasındakilere benzer bir şekilde ortaya çıkmıştır. Karanlıkta inkübe edilen kültürlerde bitki gelişme oranları daha yüksek bulunmuştur. En yüksek bitki gelişme oranı %10.56 değeriyle ½ MS ortamında ve sürekli karanlıkta tutulan kombinasyondan elde edilmiş; ancak karanlıkta olan diğer tüm ortam bileşimlerindeki kültürler aralarında istatistiksel farklılık bulunmaksızın birinci sırada olma özelliğini paylaşmışlardır (%6.41-8.94). Aydınlık uygulamalar olarak kısaca adlandırılan fotoperiyodik düzende kültürün ilk 30 günü bekletilen kültürler ise tümüyle ikinci grubu oluşturmuşlardır (bitki gelişimi bakımından sadece %0.25'lik en düşük değeri veren KC ortamı hariç). Deneme II'nin bu sonuçlarına göre, bundan sonraki deney aşamalarının hiçbirinde karanlık dışında bir uygulama yapılmamıştır.

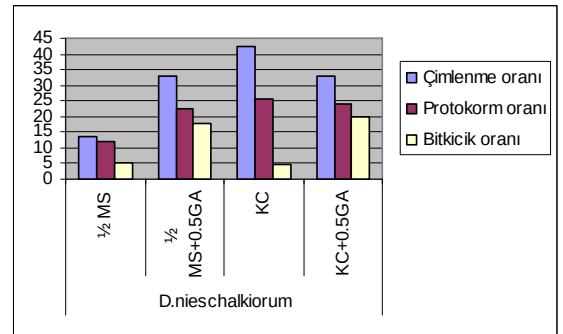


Şekil 4.61 *Dactylorhiza neschalkiorum*'da üç temel besin ortamı bileşimi ve 0.1 mg/l GA₃ katkısı ile aydınlık-karanlık uygulamasının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

D.neschalkiorum türünün yer aldığı üçüncü denemede (Deneme V) iki adet temel besin ortamı bileşimi ve bununla birlikte 0.5 mg/l GA₃ ilavesi denenmiş olup çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları belirlenmiştir. Çizelge 4.66'da ve Şekil 4.62'de bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.66 ve Şekil 4.62 *Dactylorhiza neschalkiorum*'da iki temel besin ortamı bileşimi ve 0.5 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

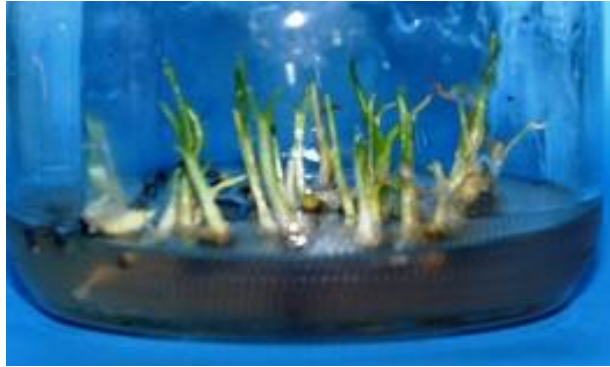
Besin Ortamı	Çimlenme Oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
1/2 MS	13.59 b	12.22 b	5.02 b
1/2 MS+0.5GA ₃	32.98 a	22.52 ab	17.56 a
KC	42.15 a	25.82 a	4.77 b
KC+0.5GA ₃	32.74 a	24.06 ab	19.87 a



Genel bir yaklaşımla KC ortamı, $\frac{1}{2}$ MS ortamına göre çimlenme oranı bakımından daha olumlu görülmüştür. Sadece hormonsuz $\frac{1}{2}$ MS ortamındaki çimlenme oranı %13.59 ile diğer üç uygulamanın gerisinde kalmış; KC, $\frac{1}{2}$ MS+0.5GA₃ ve KC+0.5GA₃ ortamlarında sırasıyla %42.15, 32.98 ve 32.74 çimlenme oranları elde edilmiş ve bunların arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Protokorm oluşturma oranları bakımından sıralama yine aynı kalmış, fakat oranlar birbirine daha yakın sayısal değerlere sahip olmuştur. KC, yine en yüksek oranla ilk sırada olmuştur (%25.82).

Bitki gelişme oranı değerleri, ilk iki ölçüm aşamasındaki bulgulardan farklılık göstermiştir. 0.5 mg/l GA₃ ilave edilen ortamlar, bitki gelişme oranı bakımından ilk sırayı almıştır. Şekil 4.63’de KC+0.5GA₃ ortamında gelişmekte olan genç bitkicikler gösterilmiştir. KC+0.5GA₃ ortamında %19.87, $\frac{1}{2}$ MS+0.5GA₃ ortamında %17.56 bitki gelişimi sağlanmıştır. Diğer iki ortam ($\frac{1}{2}$ MS ve KC), %5.02 ve 4.77 bitki gelişme oranlarıyla geride kalmışlardır.



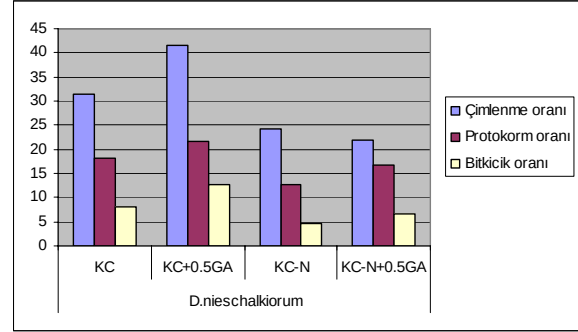
Şekil 4.63 0.5mg/l GA₃ ilave edilen KC ortamında gelişmekte olan genç *D. nieschalkiorum* bitkicikleri

D.nieschalkiorum türünün yer aldığı dördüncü denemede (Deneme VI) sadece KC temel besin ortamı bileşimi kullanılmış, bu formülden inorganik azotun çıkartılmasının ve bununla birlikte 0.5 mg/l GA₃ ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki

gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.67’de ve Şekil 4.64’te bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.67 ve Şekil 4.64 *Dactylorhiza neschalkiorum*’da KC ve KC-N ortamlarının ve 0.5 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Besin Ortamı	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
KC	31.52 b	18.09 a	8.00 ab
KC+0.5GA ₃	41.62 a	21.51 a	12.57 a
KC-N	24.27 b	12.62 a	4.73 b
KC-N+0.5GA ₃	21.80 b	16.81 a	6.74 b



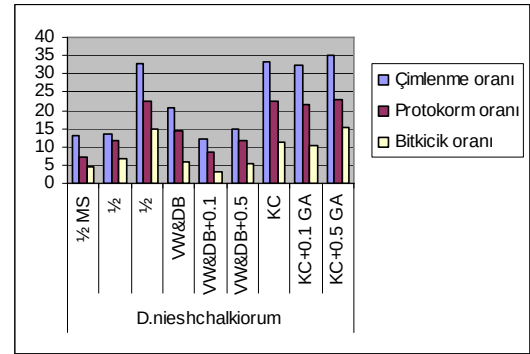
Önceki deneme aşamalarında bu tür için en uygun kombinasyonun KC+0.5GA₃ olduğu görülmüştür. Bu aşamada hem hormonsuz KC hem de 0.5 mg/l GA₃ ilave edilmiş KC ortamı denemeye alınmıştır. Aynı zamanda ortamdaki azot kaynağının azaltıldığı uygulama da bunlarla kombine edilmiştir. Ancak besin ortamındaki inorganik azotun çıkartılması, bu türde olumlu bir etkiye bulunmamıştır. Çimlenme oranları bakımından bir değerlendirme yapıldığında, KC+0.5GA₃ ortamından en yüksek oranın elde edildiği söylenebilmektedir (%41.62). Diğer üç ortam bileşimindeki çimlenme oranları % 31.52 ile %21.80 arasında değişmiş olup, bunlar istatistiksel olarak aynı grup içerisinde kalmıştır.

Protokorm oluşturma bakımından uygulamalar arasında istatistiksel anlamda önemli bir farklılık ortaya çıkmamıştır (%21.51-12.62). Oysa bitki gelişme oranları bakımından uygulamalar karşılaştırıldığında KC+0.5GA₃ ortamının öne çıktığı fark edilmektedir (%12.57). Hormonsuz KC ortamı da nisbeten iyi bir bitki gelişme oranı (%8.00) sergilemiş; inorganik azot içermeyen diğer iki ortam ise %6.74 ve %4.73 bitki gelişme oranları ile geride kalmıştır.

D.nieschalkiorum türünün yer aldığı beşinci denemede (Deneme VII) üç adet temel besin ortamı bileşimi kullanılmış, bu ortamlara 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.68’de ve Şekil 4.65’de bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.68 ve Şekil 4.65 *Dactylorhiza nieschalkiorum*’da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	13.22 b	7.28 c	4.38 cd
½ MS+0.1GA ₃	13.64 b	11.66 bc	6.74 b-d
½ MS+0.5GA ₃	32.75 a	22.37 a	14.99 a
VW&DB	20.71 b	14.18 a-c	5.89 b-d
VW&DB+0.1GA ₃	12.00 b	8.65 c	3.07 d
VW&DB+0.5GA ₃	14.81 b	11.83 bc	5.48 b-d
KC	33.07 a	22.45 a	11.26 ab
KC+0.1 GA ₃	32.41 a	21.42 ab	10.38 a-c
KC+0.5 GA ₃	35.14 a	23.05 a	15.32 a



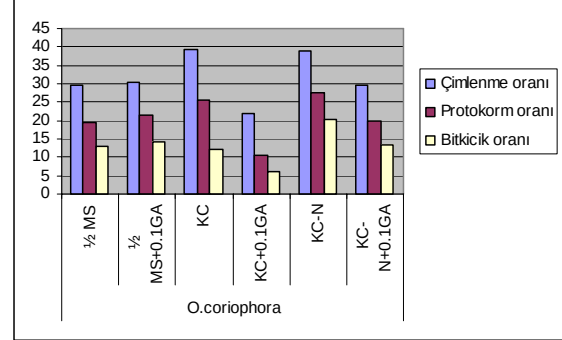
Çimlenme oranı bakımından en yüksek rakamlar KC, KC+0.1 GA₃ ve KC+0.5 GA₃ kombinasyonları ve ½ MS+0.5GA₃’dan elde edilmiştir (%33.07-32.41). Protokorm oluşumu konusunda da benzer bir durum gözlenmiş, aynı gruba VW&DB ortamı da dahil olmuştur. (%23.05-14.18). Bitki oluşumu bakımından öne çıkan dört ortam vardır, bunlar sırasıyla KC+0.5 GA₃ (%15.32), ½ MS+0.5GA₃ (%14.99), KC (%11.26) ve KC+0.1 GA₃ (%10.38)’dır.

4.2.2 *Orchis coriophora*

Orchis coriophora türünün yer aldığı ilk denemede (Deneme IV) üç adet temel besin ortamı bileşimi kullanılmış, bu ortamlara 0.1 mg/l GA₃ ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.69 ve Şekil 4.66’da bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.69 ve Şekil 4.66 *Orchis coriophora*'da ½ MS, KC ve KC-N ortamlarının ve 0.1 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Besin Ortamı	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	29.73 ab	19.53 ab	12.88 a-c
½ MS+0.1GA ₃	30.37 ab	21.63 a	13.99 ab
KC	39.42 a	25.57 a	12.16 bc
KC+0.1GA ₃	21.82 b	10.44 b	6.17 c
KC-N	38.84 a	27.61 a	20.44 a
KC-N+0.1GA ₃	29.44 ab	19.82 a	13.55 ab



Çimlenme oranları bakımından kullanılan altı ortam bileşimi de birbirinden çok uzak olmayan sayısal değerler vermiştir. En yüksek çimlenme oranı %39.42 ile KC ve %38.84 ile KC-N ortamından sağlanmış, en düşük çimlenme oranı ise %21.82 ile KC ortamına 0.1 mg/l GA₃ ilave edilmesiyle oluşturulan ortamda meydana gelmiştir. Diğer bileşimler, aralarında önemli düzeyde istatistiksel farklılık olmaksızın en yüksek ve en düşük değerlerle yakın bulunmuşlardır.

Protokorm oluşturma oranı bakımından sadece KC+0.1 GA₃ ortamı %10.44 ile en düşük rakamı vermiş, diğer ortamlarda bu oran %27.61-19.53 arasında ve aralarında istatistiksel olarak önemsiz farklılıklarla ortaya çıkmıştır. Benzer durum, bitki gelişme oranları bakımından da ortaya çıkmıştır. KC+0.1 GA₃ ve KC ortamı denemede yer alan diğer ortamların yanında daha düşük düzeyde bitki gelişme performansı göstermiştir. KC-N, ½ MS+0.1GA₃ (Şekil 4.67), KC-N+0.1GA₃ ortamları birlikte değerlendirilebilecek ve birbirine yakın oranlara sahip olmuştur (%20.44-13.55). ½ MS ortamı ise %12.88 ile hem ilk Duncan harflendirme grubuna, hem de son gruba dahil olmuştur. Bu durum da, bitki gelişme oranları bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık bulunmasına rağmen, bu farklılığın çok keskin ve belirleyici olmayabileceğini göstermektedir. Şekil 4 68'de ½ MS + 0.1 GA₃ ortamında çimlenen *O. coriophora* tohumlarından gelişen bitkiciklerin ekimden onbir ay sonraki durumları görülmektedir.



Şekil 4.67 $\frac{1}{2}$ MS+0.1GA₃ ortamına ekilen *O.coriphora* tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitkiler

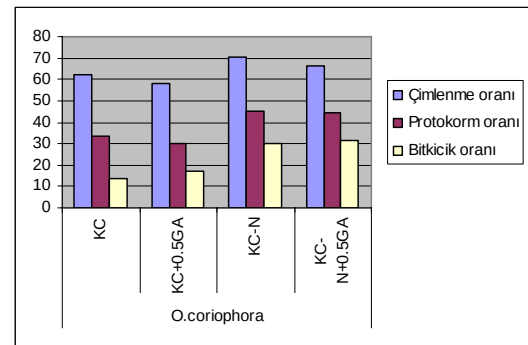


Şekil 4.68 $\frac{1}{2}$ MS ortamına ekilen *O.coriphora* tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitkiler ve yumrular

Orchis coriophora türünün yer aldığı ikinci denemede (Deneme VI) sadece KC temel besin ortamı bileşimi kullanılmış, bu formülden inorganik azotun çıkartılmasının ve bununla birlikte 0.5 mg/l GA₃ ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.70 ve Şekil 4.69’da bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.70 ve Şekil 4.69 *Orchis coriophora*’da KC ve KC-N ortamlarının ve 0.5 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
KC	62.22 b	33.30 b	14.83 b
KC+0.5GA ₃	58.19 b	30.37 b	17.02 b
KC-N	70.40 a	45.02 a	29.90 a
KC-N+0.5GA ₃	66.16 ab	44.69 a	31.13 a



Çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranı bakımından, KC ortamından inorganik azotun çıkartılması, bu türde olumlu bir etkide bulunmuştur. Çimlenme oranları bakımından bir değerlendirme yapıldığında, KC-N ve KC-N+0.5GA₃ ortamlarından en yüksek oranların elde edildiği söylenebilmektedir (%70.40 ve 66.16). Şekil 4.70’de KC-N ortamına ekilen tohumlardan 11 ay sonra elde edilmiş bitki ve *in vitro* koşullarda oluşmuş yumrular görülmektedir. Diğer iki ortam bileşimindeki çimlenme oranları % 62.22 (KC) ve %58.19 (KC+ 0.5GA₃) olup, bunlar istatistiksel olarak aynı harfleri alan ve aralarındaki farklılık önemsiz bulunan ortamlardır.



Şekil 4.70 KC-N ortamına ekilen *O.coriophora* tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitki ve *in vitro* koşullarda oluşmuş yumrular

Protokorm oluşturma oranı bakımından uygulamalar arasında istatistiksel anlamda önemli olabilecek farklılık, inorganik azot içeren veya içermeyen ortamlar bazında meydana gelmiştir. Azot içeren KC ve KC+0.5GA₃ ortamları daha düşük oranlar sergilerken (%33.30, 30.37), KC-N ve KC-N+0.5GA₃ ortamları %45.02 ve 44.69 protokorm oranları vermiştir. Bitki gelişme oranları bakımından uygulamalar karşılaştırıldığında, aynı protokorm oluşturma oranları gibi bir ayırım ortaya çıkmıştır. Azot içeren KC (Şekil 4.71) ve KC+0.5GA₃ (Şekil 4.72) ortamlarında bitki gelişimi daha düşük oranlarda olmuş (%14.83, 17.02), KC-N ve KC-N+0.5GA₃ (Şekil 4.73) ortamlarında ise bitki oluşumu daha yüksek oranlarda meydana gelmiştir (%29.90 ve 31.13).



Şekil 4.71 KC ortamına ekilen *O.coriophora* tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitki ve *in vitro* koşullarda oluşmuş yumrular



Şekil 4.72 KC+0.5GA₃ ortamına ekilen *O.coriphora* tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitki ve *in vitro* koşullarda oluşmuş yumrular

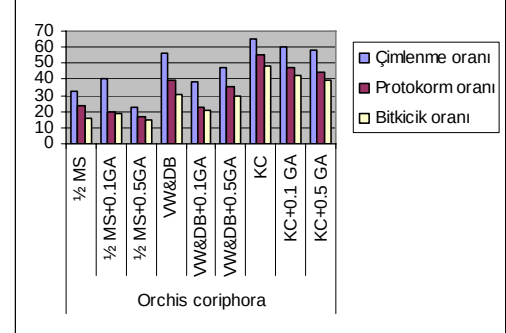


Şekil 4.73 KC-N+0.5GA₃ ortamına ekilen *O.coriphora* tohumlarından 11 ay sonra elde edilmiş bitki ve *in vitro* koşullarda oluşmuş yumrular

O. coriophora türünün yer aldığı üçüncü denemede (Deneme VII) üç adet temel besin ortamı bileşimi kullanılmış, bu ortamlara 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.71’de ve Şekil 4.74’de bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.71 ve Şekil 4.74 *Orchis coriophora*'da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	32.45 de	23.31 de	15.65 d
½ MS+0.1 GA ₃	40.48 cd	19.94 e	18.51 d
½ MS+0.5 GA ₃	23.14 e	16.63 e	14.60 d
VW&DB	56.28 ab	39.00 bc	30.81 bc
VW&DB+0.1 GA ₃	38.59 cd	22.87 de	20.60 cd
VW&DB+0.5 GA ₃	46.90 bc	35.68 cd	29.95 c
KC	64.69 a	54.94 a	48.35 a
KC+0.1 GA ₃	59.70 a	47.21 ab	42.28 a
KC+0.5 GA ₃	58.26 a	44.48 a-c	39.05 ab



Çimlenme oranı bakımından en yüksek rakamlar KC, KC+0.1 GA₃ ve KC+0.5 GA₃ kombinasyonları ve VW&DB ortamlarından elde edilmiştir (%64.69, 59.70, 58.26 ve 56.28). Protokorm oluşumu konusunda da benzer bir durum gözlenmiş KC ortamının hormonsuz veya hormonlu kombinasyonları, en yüksek oranlara sahip olmuştur (%54.94-44.48). Ancak protokorm oluşturma oranı bakımından yapılan değerlendirmeler sırasında ortamlar arasındaki farklılığın önem derecesi daha azalmış ve özellikle VW&DB ortamının kombinasyonları, ilk sıradakilere yakın sonuçlar vermiştir.

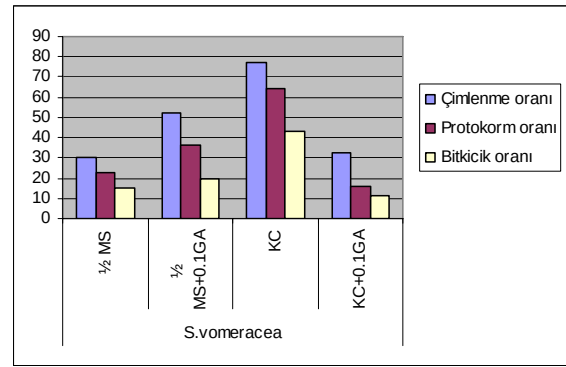
Bitki gelişme oranı bakımından en iyi sonuçlar KC ortamının hormonsuz veya hormonlu kombinasyonlarından elde edilmiştir. Aralarındaki farklılık önemsiz olacak şekilde bu ortamlarda %48.35-39.05 arasında bitki gelişimi sağlanabilmektedir. VW&DB ortamının kombinasyonları da her ne kadar istatistiksel olarak farklı harflendirme gruplarını da içerseler de, oldukça yakın bitki gelişim oranlarına sahip olmuşlardır.

4.2.3 *Serapias vomeracea*

Serapias vomeracea türünün yer aldığı ilk denemede (Deneme II) ½ MS ve KC temel besin ortamı, hormon katkısı yapılmaksızın veya 0.1 mg/l GA₃ katkılı olarak çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki geliştirme için kullanılmıştır. Çizelge 4.72 ve Şekil 4.75’de bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.72 ve Şekil 4.75 *Serapias vomeracea*’de dört temel besin ortamı bileşiminin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	30.55 c	22.81 bc	15.14 b
½ MS+0.1GA ₃	52.38 b	36.02 b	20.02 b
KC	76.85 a	63.93 a	42.80 a
KC+0.1GA ₃	32.72 c	15.63 c	11.14 b

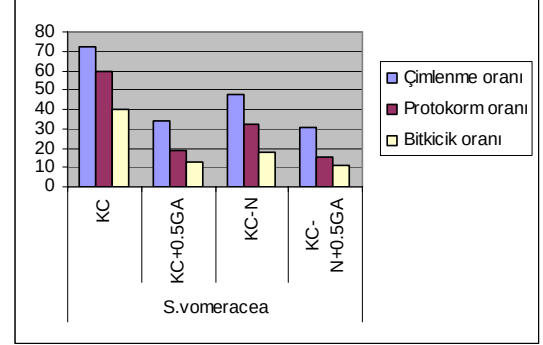


Denemede en yüksek çimlenme, protokorm oluşumu ve bitki gelişme oranını veren besin ortamı KC olarak görünmektedir (sırasıyla %76.85, 63.93 ve 42.80). Bunu ½ MS+0.1GA₃ ortamı izlemektedir (sırasıyla %52.38, 36.02 ve 20.02). Bitki gelişme oranı bakımından ise KC ortamı önemli düzeydeki farkla öne çıkmakta ve birinci sırayı almaktadır (%42.80). Diğer üç ortam arasında bu özellik bakımından istatistiksel fark bulunmamış, %20.02 ila 11.14 arasında bitki gelişme oranı kaydedilmiştir.

S. vomeracea türünün yer aldığı ikinci denemede (Deneme VI) sadece KC temel besin ortamı bileşimi kullanılmış, bu formülden inorganik azotun çıkartılmasının ve bununla birlikte 0.5 mg/l GA₃ ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.73 ve Şekil 4.76’da bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.73 ve Şekil 4.76 *Serapias vomeracea*'de KC ve KC-N ortamlarının ve 0.5 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
KC	71.98 a	59.21 a	40.24 a
KC+0.5GA ₃	34.34 bc	18.39 c	12.94 bc
KC-N	47.51 b	32.42 b	17.54 b
KC-N+0.5GA ₃	30.41 c	15.04 c	11.02 c



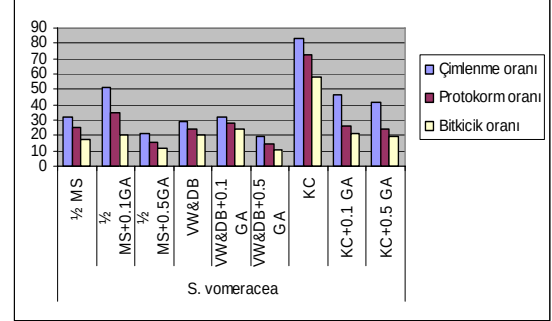
Çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranı bakımından, KC ortamından inorganik azotun çıkartılması, bu türde olumlu bir etkide bulunmamış, tam tersine tüm değerleri azaltıcı bir etkisi olmuştur. Ayrıca gibberellik asit katkısı da yine bu tür için olumlu etki yapmamıştır. Çimlenme oranları bakımından bir değerlendirme yapıldığında, KC ortamından en yüksek oranın elde edildiği görülmektedir (%71.98). Bunu KC-N (%47.51) ve KC+0.5GA₃ ortamı (%34.34) izlemiştir. KC-N+0.5GA₃ ortamı en düşük çimlenme oranını (%30.41) vermiştir.

Protokorm oluşturma oranı bakımından hormon katkısı yapılmayan ve azot dozu eksiksiz olarak kullanılan ortam, en iyi sonucu vermiştir (KC ortamı: %59.21). Bunu KC-N ortamı izlemiş (%32.42); diğer iki ortam ise birlikte en düşük grubu oluşturmuştur (KC+0.5GA₃ ortamı: %18.39, KC-N+0.5GA₃ ortamı: %15.04). Bitki gelişme oranları bakımından uygulamalar karşılaştırıldığında, KC ortamı tek başına ilk sırayı almaktadır (%40.24). Diğer üç ortamdan ise %17.54 ila 11.02 arasında bitki oluşumu elde edilmiştir.

S. vomeracea türünün yer aldığı üçüncü denemede (Deneme VII) üç adet temel besin ortamı bileşimi kullanılmış, bu ortamlara 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.74'te ve Şekil 4.77'de bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.74 ve Şekil 4.77 *Serapias vomeracea*'de ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	31.98 cd	25.49 b-d	17.68 b-d
½ MS+0.1 GA ₃	51.70 b	35.14 b	20.31 bc
½ MS+0.5 GA ₃	21.26 ef	15.94 cd	11.32 cd
VW&DB	29.37 de	24.36 b-d	20.01 bc
VW&DB+0.1 GA ₃	31.47 cd	27.65 b	24.37 b
VW&DB+0.5 GA ₃	19.16 f	14.90 d	10.28 d
KC	83.44 a	72.75 a	57.65 a
KC+0.1 GA ₃	46.16 b	26.22 bc	21.71 b
KC+0.5 GA ₃	41.56 bc	24.35 b-d	19.52 b-d



Çimlenme oranı bakımından en yüksek rakamlar KC, ½ MS+0.1 GA₃, KC+0.1 GA₃ ve KC+0.5 GA₃ kombinasyonlarından elde edilmiştir (%83.44, 51.70, 46.16 ve 41.56). Protokorm oluşumu konusunda ise sadece belirgin olarak KC ortamı diğerlerinden ayrılmış ve birinci sıraya oturmuştur (%72.75) (Şekil 4.78). Diğer ortam bileşimleri arasında az veya çok farklılıklar olsa da bunlar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan ayırt edici bulunmamıştır (%35.14-14.90).



Şekil 4.78 *Serapias vomeracea*'de KC ortamında protokormlardan yoğun bir şekilde bitki gelişimine geçiş aşaması

Bitki gelişme oranı bakımından en iyi sonuçlar KC ortamının hormonsuz kombinasyonundan elde edilmiştir (%57.65) (Şekil 4.79). Diğer ortam bileşimlerinin tümü, bu orandan oldukça düşük oluşmuştur. KC ortamına en yakın bitki gelişme oranı %24.37 ile VW&DB+0.1 GA₃ ortamında ortaya çıkmış, bundan sonra da azalarak % 10.28'e kadar azalmıştır (VW&DB+0.5 GA₃ ortamı).



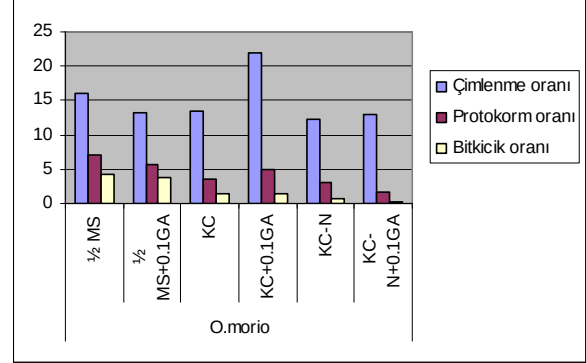
Şekil 4.79 KC ortamında gelişen *Serapias vomeracea* türüne ait bitkiler

4.2.4 *Orchis morio*

Orchis morio türünün yer aldığı ilk denemede (Deneme IV) üç adet temel besin ortamı bileşimi kullanılmış, bu ortamlara 0.1 mg/l GA₃ ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.75 ve Şekil 4.80'de bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.75 ve Şekil 4.80 *Orchis morio*'da ½ MS, KC ve KC-N ortamlarının ve 0.1 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi

Besin Ortamı	Çimlenme Oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	16.11 ab	7.10 a	4.33 a
½ MS+0.1 GA ₃	13.26 ab	5.61 a	3.78 ab
KC	13.38 ab	3.61 a	1.51 bc
KC+0.1 GA ₃	22.05 a	4.93 a	1.32 bc
KC-N	12.35 b	3.01 a	0.61 bc
KC-N+0.1 GA ₃	12.96 ab	1.66 a	0.24 c



Çimlenme oranları bakımından kullanılan altı ortam bileşimi de birbirinden çok uzak olmayan sayısal değerler vermiştir. En yüksek çimlenme oranı %22.05 ile KC+0.1 GA₃ ortamından elde edilmiş olmakla birlikte, sadece KC-N ortamı en düşük çimlenme oranını verdiği için hariç tutulduğunda diğer ortam bileşimlerindeki çimlenme oranları arasındaki farklılığın istatistiksel anlamda önemli olmadığı anlaşılmıştır.

Protokorm oluşturma oranı bakımından besin ortamı bileşimleri arasında önemli düzeyde bir farklılık bulunmamıştır. *O. morio* türü, %7.10 ila 1.66 arasında protokorm oluşturma oranına sahip olmuştur (Şekil 4.81). Bitki gelişme oranları bakımından ise ½ MS ortamının hormonsuz olarak kullanıldığı veya 0.1 mg/l GA₃ ilave edildiği durumda en yüksek rakamlar elde edilmiştir. Bu ortamlarda sırasıyla %4.33 ve 3.78 oranında bitki gelişimi sağlanabilmiştir. Diğer ortamlardaki bitki gelişme oranı çok düşük seviyelerde kalmış (%1.51- 0.24) ve bunların arasındaki farklılık önemsiz düzeyde bulunmuştur.

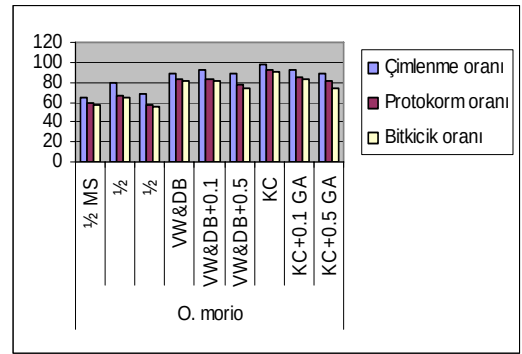


Şekil 4.81 *O. morio*'da 1/2 MS besin ortamında gelişen protokormlar

O. morio türünün yer aldığı ikinci denemede (Deneme VII) üç adet temel besin ortamı bileşimi kullanılmış, bu ortamlara 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.76 ve Şekil 4.82'te bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.76 ve Şekil 4.82 *Orchis morio*'da 1/2 MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
1/2 MS	65.43 d	58.84 c	57.94 d
1/2 MS+0.1 GA ₃	80.02 c	66.59 c	63.87 cd
1/2 MS+0.5 GA ₃	68.54 d	56.43 c	54.97 d
VW&DB	89.16 b	83.01 b	80.92 b
VW&DB+0.1 GA ₃	92.40 b	83.81 b	82.14 ab
VW&DB+0.5 GA ₃	88.57 b	77.81 b	73.27 bc
KC	98.10 a	93.07 a	89.88 a
KC+0.1 GA ₃	93.14 b	85.40 b	82.97 ab
KC+0.5 GA ₃	89.08 b	81.40 b	74.31 bc



Çimlenme oranı bakımından en yüksek rakam KC ortamından %98.10 ile elde edilmiştir. KC ortamının hormonlu kombinasyonları ile, VW&DB ortamının hormonsuz veya hormonlu kombinasyonları en yüksek çimlenme oranlarına sahip olan

ikinci grubu oluşturmuştur (%93.14-88.57). ½ MS ortamı kombinasyonları ise bu özellik bakımından son sıralarda kalmıştır (%80.02 -65.43). Ancak bu oranlar bile, birçok ‘tür + besin ortamı’ kombinasyonuna göre çok yüksek değerleri ifade etmektedir.

Protokorm oluşturma oranı bakımından ortaya çıkan durum, çimlenme stnundaki bulguların neredeyse tamamen aynısıdır. En yüksek protokorm oluşturma oranı KC ortamından %93.07 ile elde edilmiştir. KC ortamının hormonlu kombinasyonları ile, VW&DB ortamının hormonsuz veya hormonlu kombinasyonları en yüksek protokorm oluşturma oranlarına sahip olan ikinci grubu oluşturmuştur (%85.40-77.81). ½ MS ortamı kombinasyonları ise bu özellik bakımından son sıralarda kalmıştır (%66.59-56.43).

Bitki gelişme oranı bakımından en iyi sonuçlar KC ortamının hormonsuz kombinasyonundan elde edilmiştir (%89.88) (şekil 4.83). KC+0.1 GA₃ ve VW&DB+0.1 GA₃ ortamında da yüksek bitki gelişme değerleri hesaplanmıştır (%82.97 ve 82.14). KC ortamının hormonlu kombinasyonları ile, VW&DB ortamının hormonsuz (şekil 4.84) veya hormonlu kombinasyonları genel olarak bitki elde etmek için *O.morio* türünde kullanılabilir bulunmuştur.



şekil 4.83 KC ortamında gelişen *O.morio* bitkicikleri



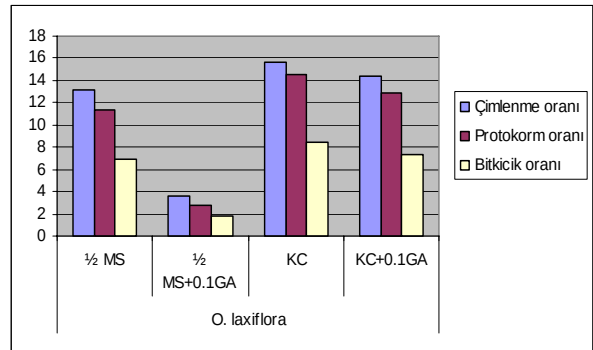
Şekil 4.84 VW&DB ortamında gelişen *O.morio* türüne ait bir bitki

4.2.5 *Orchis laxiflora*

O.laxiflora türünün yer aldığı ilk denemede (Deneme II) $\frac{1}{2}$ MS ve KC temel besin ortamı bileşimleri kullanılmış, bu ortamlara 0.1 mg/l GA_3 ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.77’de ve Şekil 4.85’de bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.77 ve Şekil 4.85 *Orchis laxiflora*’da $\frac{1}{2}$ MS ve KC ortamlarının ve 0.1 mg/l GA_3 katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Besin Ortamı	Çimlenme Oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
$\frac{1}{2}$ MS	13.09 a	11.34 a	6.91 cd
$\frac{1}{2}$ MS+0.1 GA_3	3.55 b	2.79 b	1.84 d
KC	15.60 a	14.57 a	8.39 cd
KC+0.1 GA_3	14.44 a	12.87 a	7.31 cd



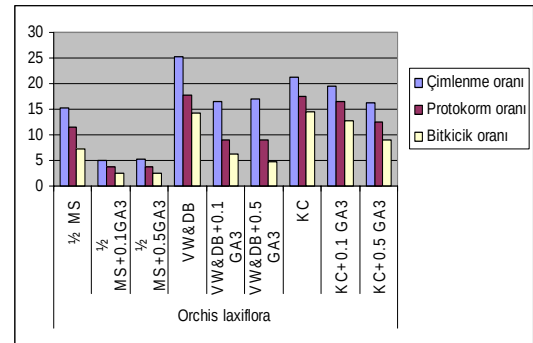
O.laxiflora türünde denenen dört ortam bileşiminden sadece bir tanesi ($\frac{1}{2}$ MS+0.1 GA_3) diğerlerine göre düşük oran vermiştir (%3.55). Denemede yer alan diğer bileşimler

%15.60 (KC), %14.44 (KC+0.1 GA₃) ve %13.09 (½ MS) çimlenme oranlarına sahip olmuştur. Bu üç ortamın arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Protokorm oluşturma oranları için aynı durum söz konusu olmuştur. Bu özellik bakımından sıralama değişmemiş ve %14.57-11.34 arasında protokorm oluşturma oranı elde edilebilmiştir. Bu açıdan en düşük performans yine ½ MS+0.1GA₃ ortamından alınmıştır (%2.79). Bitki gelişme oranı bakımından alınan sonuçlar; çimlenme ve protokorm oluşturma oranlarından elde edilen sonuçlara benzerlik göstermiştir. En yüksek bitki gelişim oranları KC (%8.39), KC+0.1 GA₃ (%7.31) ve ½ MS (%6.91) ortamından elde edilmiş ve istatistiki olarak aynı grupta yer almıştır. Bitki gelişme oranı bakımından en düşük performans yine ½ MS+0.1GA₃ ortamından elde edilmiştir.

O.laxiflora türünün yer aldığı ikinci denemede (Deneme VII) üç adet temel besin ortamı bileşimi kullanılmış, bu ortamlara 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ ilavesinin çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çizelge 4.8’de ve Şekil 4.86’da bu denemeden elde edilen sonuçlar gösterilmektedir.

Çizelge 4.78 ve Şekil 4.86 *Orchis laxiflora*’da ½ MS, VW&DB ve KC ve ortamlarının ve 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ katkısının çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerine etkisi (%)

Besin ortamı	Çimlenme oranı (%)	Protokorm oluşturma oranı (%)	Bitki gelişme oranı (%)
½ MS	15.33 b	11.40 a	7.16 b-d
½ MS+0.1 GA ₃	4.93 c	3.64 c	2.48 d
½ MS+0.5 GA ₃	5.13 c	3.77 bc	2.38 d
VW&DB	25.29 a	17.72 a	14.18 a
VW&DB+0.1GA ₃	16.41 ab	9.12 ab	6.14 b-d
VW&DB+0.5GA ₃	17.04 ab	8.89 ab	4.71 cd
KC	21.24 ab	17.41 a	14.41 a
KC+0.1 GA ₃	19.40 ab	16.39 a	12.65 ab
KC+0.5 GA ₃	16.27 ab	12.42 a	9.10 a-c



Çimlenme oranı bakımından en yüksek değerler VW&DB ortamının hormonsuz veya hormonlu kombinasyonları ile KC ortamının hormonsuz veya hormonlu kombinasyonlarından elde edilmiştir. Bu ortamlardaki çimlenme oranları %25.29 ila

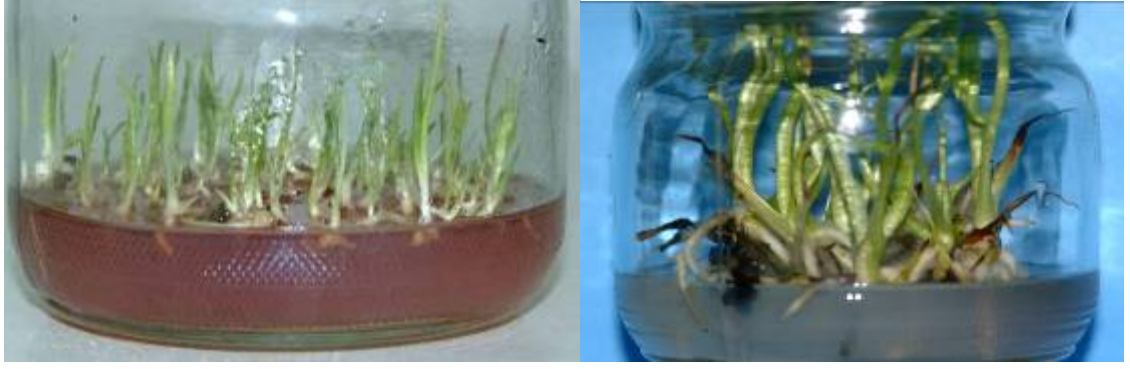
16.27 arasında değerler vermiştir. $\frac{1}{2}$ MS ortamının GA₃ ile yapılan kombinasyonları ise bu özellik bakımından son sıralarda kalmıştır (%5.13-4.93).

Protokorm oluşturma oranı bakımından ortaya çıkan durum, çimlenme bulgularına çok benzemektedir. En yüksek protokorm oluşturma oranı VW&DB ortamının hormonsuz (şekil 4.87) veya hormonlu kombinasyonları ile KC ortamının hormonsuz veya hormonlu kombinasyonlarından elde edilmiştir. Bu ortamlardaki protokorm oluşturma oranları %17.72 ila 8.89 arasında değerler vermiştir. $\frac{1}{2}$ MS ortamı da aynı grup içine katılmış ve %11.40'lık bir rakam vermiştir. Diğer iki $\frac{1}{2}$ MS ortamı kombinasyonu ise bu özellik bakımından son sıralarda kalmıştır (%3.77-3.64).



şekil 4.87 *Orchis laxiflora*'da VW&DB ortamında oluşan prokormlar

Bitki gelişme oranı bakımından en iyi sonuçlar KC ortamının hormonsuz kombinasyonundan (%14.41) ve VW&DB ortamından elde edilmiştir (%14.18). KC+0.1 GA₃ ve KC+0.5 GA₃ ortamları da aynı istatistiksel grup içerisinde yer almış ve %12.65 ve 9.10'luk oranlar vermiştir. şekil 4.88'de KC+0.1 GA₃ ortamında gelişen *O.laxiflora* bitkicikleri görülmektedir. Diğer ortam bileşimleri düşük düzeylerde bitki gelişme oranlarına sahip olmuşlardır (%7.16-2.38).



Şekil 4.88 KC+0.1 GA₃ ortamında kültüre alınan *O.laxiflora* türünde gelişen bitkilerin farklı gelişme aşamaları



Şekil 4.89 Dış koşullara aktarma aşamasına gelmiş *O.laxiflora* türüne ait bir bitki

4.3 *In vitro* Bitkilerin Dış Koşullara Alıştırılması (aklimatizasyon)

In vitro koşullarda elde edilen bitkilerin dış koşullara alıştırılması amacıyla, bitki gelişimi sağlanan türlerde (*Dactylorhiza nieschalkiorum*, *Orchis coriophora*, *Orchis laxiflora*, *Orchis morio* ve *Serapias vomeracea*) farklı zamanlarda birbirinden bağımsız dört deneme kurulmuştur.

Araştırma süreci içerisinde elde edilen ilk bitkiler, seradaki sisleme ünitesinde dış koşullara alıştırılmaya çalışılmıştır. *D. nieschalkiorum*, *S. vomeracea* ve *O. coriophora* türlerinden elde edilmiş olan köklü ve en az 25 mm uzunluğa sahip olan bitkicikler ile yumru oluşturmuş durumdaki *O. coriophora* bitkileri (Şekil 4.90), sisleme ünitesi altındaki perlit+pomza karışımına dikilmişlerdir. Her bitki türünden 50'şer adet (*O. coriophora*'da 50 adet yumrusuz + 50 adet yumrulu) bitkicik dış koşullara aktarılmıştır. Alıştırmaya alınan bitkilerde birinci haftanın sonundan itibaren tür farkı olmaksızın fizyolojik solgunluk görülmeye başlanmıştır. Bitkiciklerin ikinci haftanın sonunda büyük ölçüde canlılıklarını yitirdiği gözlenmiştir. Dış koşullara aktarma esnasında kuvvetli gelişmeye sahip olan bitkiler ile bir adet yumruya sahip (*O. coriophora*) bitkiler ise canlılıklarını üçüncü haftanın sonuna kadar sürdürebilmiştir. Dördüncü haftanın sonunda tüm bitkilerin solarak öldükleri tespit edilmiştir. Bu süre zarfında deneme dışı artan bitkiciklerin dikimi ile oluşturulan bölümden, bitkicikler zaman zaman köklendirme ortamından çıkartılıp kök bölgelerinde bir değişiklik veya yeni kök oluşumu olup olmadığına bakılmıştır. Bitkiciklerin kök bölgelerinde gelişme yönünde hiçbir farklılaşma olmamış ve hatta kurumalar meydana gelmiş, yeni yaprak gelişimi oluşmamış, birkaç hafta içerisinde solarak ölmüşlerdir.



Şekil 4.90 Dış koşullara aktarma amacıyla hazırlanmış bir *O. coriophora* bitkiciği

Araştırmanın ilerleyen aşamalarında elde edilen yeni orkide bitkileriyle yeniden dış koşullara aktarma denemesi kurulmuştur. *D. nieschalkiorum* ve *O. morio* türlerine ait bitkilerin yarısı fide tutumunu artırmak için kullanılan Crop-Set ile muamele edildikten sonra viyoller içerisine doldurulmuş perlit, Bolu torfu veya vermikulit ortamlarına aktarılmıştır. Tüm uygulamalar, %80 nisbi neme sahip, fakat sisleme düzeneği bulunmayan bir sera bölümünde tezgahlar üzerine dizilmiştir. Bu çalışmada da tür ve yetiştirme ortamı farkı olmaksızın birinci aktarma çalışmasına benzer sonuçlar elde edilmiş, yalnızca aktarma aşamasında kuvvetli gelişme gösteren bitkiler canlılıklarını üç hafta kadar sürdürebilmiş, dördüncü haftanın sonunda tüm bitkiler solarak canlılıklarını tümüyle yitirmişlerdir. Şekil 4.91’de üçüncü haftanın sonunda perlit, vermikulit ve torf ortamındaki bitkilerin durumu gösterilmektedir.



Şekil 4.91 Perlit, vermikulit ve torf ortamındaki *D. nieschalkiorum* bitkilerinin, dış ortama aktarımdan 3 hafta sonraki durumu

Yapılan üçüncü dış koşullara alıştırma çalışmasında ise yeterli büyüklüğe ulaşmış *Orchis laxiflora* (Şekil 4.92) ve *Orchis morio* türlerinden *in vitro*'da elde edilen bitkilere iki aşamalı bir alıştırma programı uygulanmıştır. Bu amaçla birinci aşamada bitkiler vermikulit doldurulmuş kapaklı PET kutulara dikilerek (Şekil 4.93) üç hafta süreyle iklim odasında gelişmeye bırakılmıştır. Alıştırma işleminin ikinci aşamasında ise üçüncü haftanın sonunda bitkiler vermikulit ortamından alınarak Bolu Torfu doldurulmuş saksılara aktarılmıştır. Bitkilerin aktarıldığı saksılar ise seraya alınmış ve gelişmeleri izlenmiştir. Denemenin kontrolleri yapılarak kültürel istekleri karşılanmaya çalışılmış ve haftalık canlı bitki kayıtları not edilmiştir. Buna göre aktarma işleminin ilk aşamasında, her iki türde de kültüre alınan bitkilerin yaklaşık %30'u kaybedilmiştir. İkinci aşamasında ise bitkilerin ölüm süreci daha hızlı ilerlemiş ve 4. hafta sonunda

bitkilerin yaklaşık %95'i canlılığının yitirmiştir. Şekil 4.94'te dördüncü hafta sonunda canlılığını koruyan *Orchis morio* bitkileri görülmektedir.



Şekil 4.92 Dış koşullara alıştırma amacıyla yapılan üçüncü çalışmada kullanılan bir *Orchis laxiflora* bitkisi



Şekil 4.93 Üçüncü dış koşullara alıştırma çalışmasının birinci aşamasında kapaklı PET kutular içerisindeki vermikulit ortamında gelişmeye bırakılan *Orchis laxiflora* bitkileri



Şekil 4.94 Üçüncü dış koşullara alıştırma çalışmasının ikinci aşamasında toprağa aktarılan ve dördüncü hafta sonunda yaşamını sürdüren *O.morio* bitkileri

Dış koşullara alıştırma aşamasında başarı elde edilememesi, yeni alternatifler aramaya yöneltmiştir. Dördüncü kez yapılan akklimatizasyon denemesinde salep elde edilmesinde kullanılan orkide türlerinin doğal koşullarda simbiyotik bir yaşam döngüsüne sahip olduğu göz önünde bulundurularak iki mikoriza türü (*Glomus etunicatum* ve *Glomus mossea*) ile bir alg türü (*Spirulina platensis*) uygulaması yapılmıştır. *O. coriophora* (2 farklı gelişme dönemi), *O. morio* ve *S. vomeracea* türlerinde elde edilen yeni orkide bitkicikleri dış koşullara alıştırma çalışmaları için Adana'daki serada denemelere tabi tutulmuştur. Viyoller içerisine dikimi yapılan bitkiciklerde dikimden itibaren sekiz hafta süresince haftalık gözlemler yapılmış ve her uygulamadaki canlı bitkiler kaydedilerek toplam bitkicik sayısına oranlanmıştır. Sekizinci haftanın sonundaki canlılık oranları bakımından yapılan istatistiki analiz sonuçları, türler arasındaki ve uygulamalar arasındaki farklılıklar ile 'Tür + Uygulama' interaksyonunun $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu göstermiştir.

Yapılan bu üçüncü çalışmada *in vitro* koşullarda elde edilen bitkilerin dış koşullara alıştırılmasında ümitvar sonuçlar elde edilmiştir. Türler arasındaki farklılığı ortaya koyabilmek amacıyla, tüm uygulamaların birlikte değerlendirildiği Çizelge 4.79 incelendiğinde, dış koşullara aktarıldıktan sekiz haftanın sonunda en yüksek canlı bitki

oranının % 50.00 ile *S.vomeracea* türüne ait olduğu görülmektedir. *O.coriophora* türüne ait küçük ve büyük gelişme dönemindeki bitkicikler %31.25 ve 29.58 oranlarıyla ikinci sırada yer almışlar, *O.morio* türü ise dış koşullara adaptasyon ve canlı bitki oranı bakımından en düşük değere sahip olmuştur (%9.17).

Çizelge 4.79 Farklı türlerin sekizinci hafta sonunda canlı bitki oranı üzerine etkisi (%)

Tür	8. hafta canlı bitki oranı (%)
<i>O.coriophora 1</i>	31.25 b
<i>O.coriophora 2</i>	29.58 b
<i>O.morio</i>	9.17 c
<i>S.vomeracea</i>	50.00 a

Denemeye alınan türlere ait tüm bitkiler birlikte değerlendirildiğinde ve tür farklılığı göz ardı edildiğinde, uygulamalar arasındaki farklılık önemli görünmektedir. Kontrol, iki mikorhiza ve bir alg türü ile yapılan uygulamaların dış koşullara aktarılan orkidelerde, sekizinci hafta sonundaki canlı bitki oranına etkisi Çizelge 4.80’de verilmiştir. En yüksek canlı bitki oranı %41.46 ile alg uygulamasından elde edilmiştir. Bunu %32.71 ve %28.75 canlı bitki oranı ile Kontrol grubu ile Mikoriza 1 uygulaması izlemiş ve bu iki uygulama arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmamıştır. Mikoriza 2, tüm türler ortalaması olarak sadece %17.08 canlı bitki oranı ile en başarısız uygulama olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.80 Farklı uygulamaların sekizinci hafta sonunda canlı bitki oranı üzerine etkisi (%)

Uygulama	8. hafta canlı bitki oranı (%)
Kontrol	32.71 b
Mikoriza 1	28.75 b
Mikoriza 2	17.08 c
Alg	41.46 a

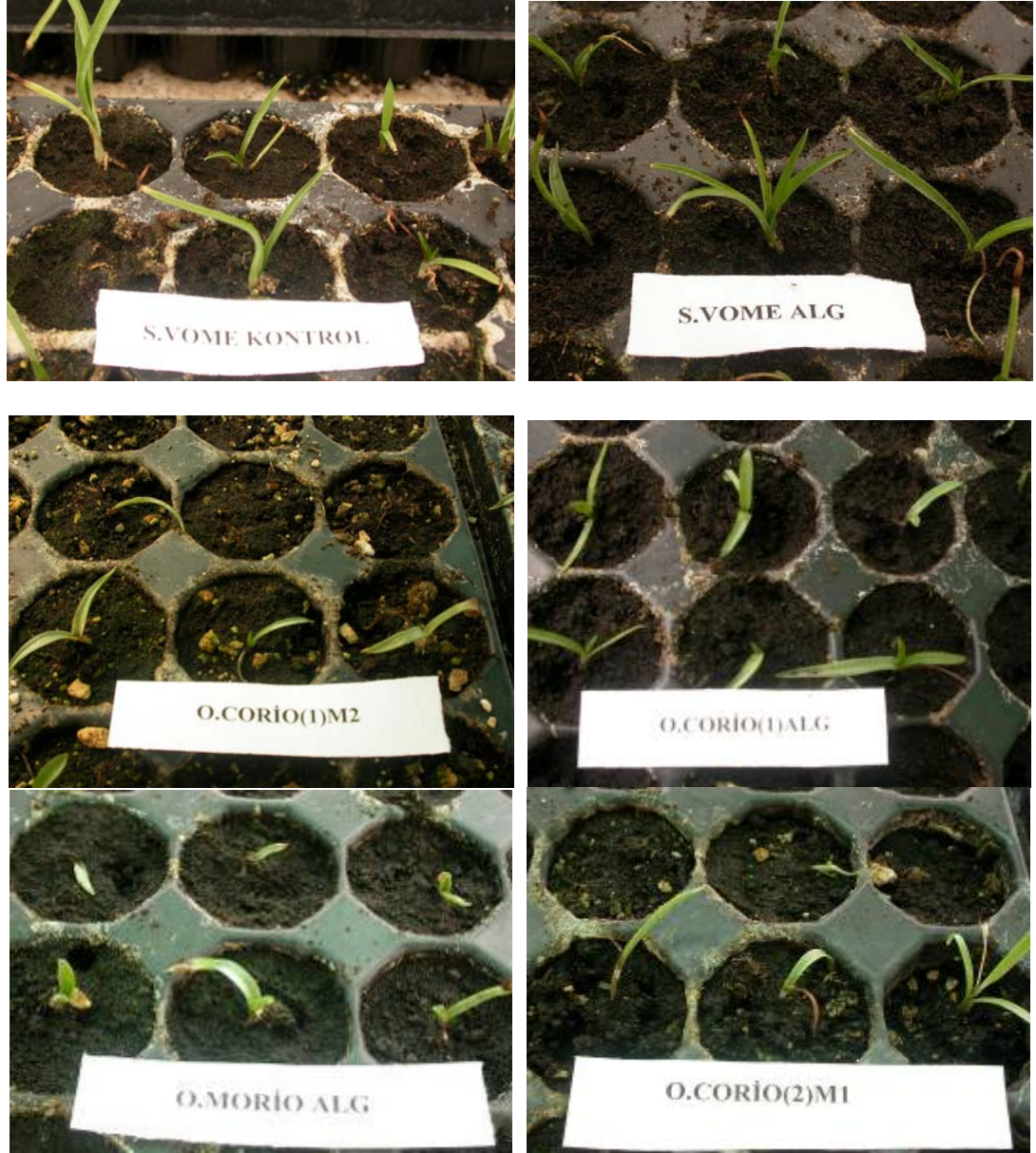
Bundan önceki dış koşullara alıştırma aşamasına ait çalışmalarda, bitkiciklerin tamamı dört hafta içerisinde canlılığını yitirdikleri halde, alg ve mikorhizaların denendiği bu

uygulamalarda sekizinci haftanın sonunda *S. vomeracea* türünde %71.67 oranında canlı bitki elde edilebilmiştir. ‘Tür + Uygulama’ interaksyonu istatistiksel olarak önemli bulunduğundan yukarıdaki genel değerlendirmelerin dışında esas olarak interaksyon gösteren kombinasyonlar öne çıkmaktadır. Bütün kombinasyonlardaki sekizinci hafta sonundaki canlı bitki oranları ile ondan önceki ilk yedi hafta belirlenen canlı bitki oranlarını gösteren Çizelge 4. 81 aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.81 Farklı ‘Tür + Uygulama’ interaksyonlarının dış koşullara aktarılan bitkiciklerin haftalara göre canlılık oranı üzerine etkisi (%)

TÜR	UYGULAMA	1. hafta canlı bitki oranı	2. hafta canlı bitki oranı	3. hafta canlı bitki oranı	4. hafta canlı bitki oranı	5. hafta canlı bitki oranı	6. hafta canlı bitki oranı	7. hafta canlı bitki oranı	8. hafta canlı bitki oranı
<i>O.coriophora 1</i>	Kontrol	99,17 ab	93,33 b-d	80,00 c-e	76,67 c-e	55,00 cd	44,17 d-f	32,50 e-g	16,67 eg
	Mikoriza 1	85,00 de	74,17 f	50,83 gh	40,00 g	34,17 e	32,50 fg	30,83 f-h	30,00 de
	Mikoriza 2	99,17 ab	95,00 a-c	86,67 b-d	77,50 c-e	60,83 c	53,33 c-e	42,50 d-g	38,33 cd
	Alg	99,17 ab	98,33 ab	95,00 ab	91,67 ab	87,50 a	82,50 a	70,83 ab	40,00 cd
<i>O.coriophora 2</i>	Kontrol	100,00 a	100,00 a	98,33 a	96,67 a	84,17 ab	74,17 ab	55,83 b-d	40,83 cd
	Mikoriza 1	100,00 a	99,17 a	92,50 a-c	82,50 cd	69,17 bc	61,67 b-d	50,83 c-e	35,00 cd
	Mikoriza 2	95,00 a-d	90,00 c-e	83,33 c-e	61,67 ef	38,33 de	35,83 ef	26,67 g-i	15,00 e-g
	Alg	92,50 b-e	90,00 c-e	89,17 bc	82,50 cd	65,00 c	60,83 b-d	49,17 c-f	27,50 d-f
<i>O.morio</i>	Kontrol	61,67 f	53,33 g	41,67 h	38,33 g	30,00 e	18,33 g	18,33 hi	10,00 g
	Mikoriza 1	52,50 f	44,17 g	16,67 i	15,00 h	9,17 f	4,17 h	4,17 j	0,00 h
	Mikoriza 2	50,83 f	26,67 h	5,00 j	3,33 i	0,00 g	0,00 h	0,00 j	0,00 h
	Alg	85,00 e	80,83 ef	74,17 d-f	72,50 de	57,50 c	52,50 c-e	45,00 d-g	26,67 d-f
<i>S.vomeracea</i>	Kontrol	98,33 ab	98,33 ab	85,00 b-d	76,67 c-e	66,67 c	66,67 bc	66,67 bc	63,33 ab
	Mikoriza 1	95,00 a-c	85,00 c-e	68,33 e-g	61,67 ef	55,00 cd	53,33 c-e	51,67 c-e	50,00 bc
	Mikoriza 2	91,67 c-e	81,67 d-f	58,33 f-h	46,67 fg	31,67 e	26,67 fg	15,00 i	15,00 fg
	Alg	98,33 ab	95,00 a-c	88,33 b-d	88,33 bc	85,00 a	83,33 a	82,50 a	71,67 a

Dış koşullara aktarma işleminin sekizinci haftasının sonunda 2. gelişme dönemindeki *O.coriophora* bitkileri dışındaki tüm türler için alg uygulaması en başarılı uygulama olarak tespit edilmiştir. 2. gelişme dönemindeki *O. coriophora* bitkilerinde ise bu başarı Kontrol grubu uygulamalarında gözlenmiştir. Çizelgedeki sonuçlar gözden geçirildiğinde sekizinci hafta sonunda en yüksek canlı bitki oranının (%71.67) '*S.vomeracea* + alg' uygulamasından elde edildiği; bunu %63.33 ile yine aynı türe ait kontrol grubunun izlediği görülmektedir. '*O. coriophora*2 + Kontrol; *O. Coriophora*1+ Alg, *O. coriophora*2 + Mikorhiza 1 (*G.etunicatum*)' uygulamaları %40.83 , %40 ve %35.00 canlı bitki oranlarıyla başarı sıralamasındaki yerlerini almışlar ve ikinci grubun başını çekmişlerdir. *O. coriophora*'nın küçük ve büyük bitkileri önemsiz farklılıklarla genelde aynı istatistiksel grup içerisinde yer alabilmişlerdir. Yani genel olarak dış koşullara aktarma aşamasında *S.vomeraceae*'nin alg ve kontrol uygulamalarının ardından en yüksek başarıyı *O.coriophora* uygulamalarının verdiği sonucuna ulaşmak mümkün görünmektedir. Denemede en düşük canlılık oranlarını veren ve dış koşullara aktarmada diğer iki türe göre geride kalan *O. morio*; %26.67 ile alg uygulamasında en yüksek değere ulaşmıştır. Mikorhiza uygulamaları ise bu türde beklenen başarıyı sağlayamamıştır (Çizelge 4.81). Şekil 4.95'de sekizinci hafta sonunda denemeden alınan bazı görüntüler sunulmuştur. Şekil 4.95'den de görüleceği gibi üç türde de bitkilerin genel gelişme durumları alg uygulamaları yapılan örneklerde diğer uygulamalara göre daha iyi olmuştur. Şekil 4.96'da birinci gelişme dönemindeki *O.coriophora* bitkilerine yapılan alg uygulamalarının bitki büyüme ve gelişmesine olan etkisi açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.95 Orkide bitkilerinin dış koşullara alıştırılmasında alg ve mikorhiza uygulamalarından sonraki sekizinci haftada bitkilerin gelişme durumları



Şekil 4.96 Birinci gelişme dönemindeki *O.coriophora* türüne ait örneklerle yapılan alg uygulamalarının bitki gelişimine etkisi

4.4 *In situ* Koşullarda Bitki Elde Etmek için Yapılan Çalışmalar

Salep elde edilen bazı orkide türlerinin *in vitro* koşullarda tohum ile çoğaltma çalışmalarının yanında vejetatif olarak çoğaltma çalışmaları da yapılmıştır. Bu amaçla bazı orkide türlerinin yeni yumruları ile yeni yumrusu alınmış çiçekli bitkileri kullanılmıştır. Orkidelerin yeni yumruları ile kurulan denemelerde bazı türlere ait yumrular bölünerek kontrollü ve doğal koşullarda çoğaltılmaya çalışılmıştır. Bölme işleminde iki farklı yöntem uygulanmıştır. Birinci yöntemde yumrular dikey olarak dört kısma bölünerek her yumru parçası bir miktar büyüme konisi içerecek şekilde parçalara ayrılmış, ikinci yöntemde ise yumru + şeklinde dikey ve yatay olarak yine dört parçaya ayrılmıştır. Kontrollü koşullarda yetiştirme ortamı olarak Bolu torfu, vermikulit ve perlit kullanılmıştır. Doğal koşullarda *Anacamptis pyramidalis*, *Orchis coriophora*, ve *Serapias vomeracea*, türleri ile çalışılmış, kontrollü koşullarda ise bu türlere ilave olarak *Dactylorhiza romana*, *Orchis pinetorum* ve *Orchis purpurea* türleri kullanılmıştır. Serada yapılan denemede günlük, arazide (orman alanı) kurulan denemede ise haftalık kontrol ve gözlemler yapılmıştır. Denemelerde yumru kısımlarından yetiştirme ortamı yüzeyinde sürme belirtileri gözlemlenmeye çalışılmış ve yıl boyu gözlemler sürdürülmüştür. Ancak dikilen yumru parçalarından herhangi bir gelişme meydana gelmemiştir.

Yeni yumrusu alındıktan sonra doğal ortamına geri dikilen *Anacamptis pyramidalis*, *Serapias vomeracea* ve *Orchis coriophora* türlerine ait çiçekli bitkilerde ise yeni yumru oluşturma yeteneği araştırılmıştır. Denemede yıl boyu kontrol ve gözlemler yapılmış, ancak toprak yüzeyinde hiç bir gelişme kaydedilememiştir.

5. TARTIŞMA

Tohumlarında endosperm bulunmadığından orkideler çimlenme konusunda desteğe ihtiyaç duymaktadırlar. Bu desteği, toprakta yaşayan mikorizal funguslardan almaktadırlar. *Rhizoctonia* ve *Fusarium* gibi geniş yayılım alanı olan funguslar başta olmak üzere çeşitli fungal etmenlerle enfekte olan orkide tohumları bu sayede beslenme olanağına kavuşmaktadır. Kompleks yapıdaki karbonhidratları basit şekerlere parçalayan funguslar embriyonun çimlenme için gereksinim duyduğu enerjiyi sağlamakta, fungus da gelişmek ve çoğalmak için bir ortam bulmaktadır. Bu simbiyotik yaşam, çimlenmeden sonra orkide hücreleri tarafından baskı ve kontrol altına alınmakta, ototrofik beslenme yeteneği kazandıktan sonra da fungusa ihtiyacı kalmamaktadır (Ingold and Hudson 1993). Doğal ortamda, orkide tohumlarının sadece %5'ten azı çimlenebilmektedir. Çimlendikten sonra da ergin bir bitki meydana gelebilmesi için 2-16 yıl gibi uzun bir süre beklemek gerekmektedir. Çalışmamızın sonucunda denemelerde kullanılan 16 orkide türünün içerisinde beş tanesinde 12 ay içerisinde dış koşullara aktarılabilecek aşamada (5-10 cm boyunda) orkide bitkileri elde edilebileceği ortaya konmuştur. Doğal yetiştirme alanının tahrip edilmesine izin vermeyecek üretim tekniğinin uygulanmasına oldukça yaklaşılan bulgular elde edildiği düşünülmektedir.

Orkide türlerinin *in vitro* çoğaltılması konusunda dünyada başarılı sonuçlar rapor edilmiş olmakla birlikte, ülkemizde yapılmış çalışmalar sınırlı sayıda olup elde edilen sonuçlar pratikte kullanılabilecek bir yeterliliğe sahip görünmemektedir (Gönülşen vd. 1996). Bunun nedenleri kanımızca şunlardır: a)Konuyu çalışan kişi ve kurumlarda sürekliliğin olmaması, her yeni başlayan araştırmacının bilinen aşamaları yeniden keşfetmek zorunda kalması, b) Bilgi aktarım ve paylaşımında yetersizlikler, kurumlar arası iletişimsizlik, c) Çok sayıdaki farklı türlerde birbirinden kopuk araştırmaların, yine yine birbirinden habersiz yürütülmesi, d) Türlerin *in vitro* koşullardaki istek ve yanıtlarının çok farklı olması, e) Aynı tür içerisinde bile genotipler bazında *in vitro* çimlenmeye verilen cevap bakımından farklılıkların bulunması, f) Araştırma bulgularının özel sektör tarafından uygulanabilmesi için gerekli bağlantılardaki eksiklik ve yetersizlikler

Çalışmamızda Batı Karadeniz Bölgesi'nde salep elde edilmesinde kullanılan orkideler yer almıştır. Kaynaklarda belirtilen orkideleri arazi çalışmalarıyla tespiti ve tohumlarının alınması aşamasında dikkat çeken husus, bir önceki yıl herhangi bir bölgede bulunan bir orkide türünün ertesi yıl ve hatta daha sonraki yıllarda aynı yerde bulunmaması olmuştur. Özellikle *O. purpurea* ve *O. pallens* türlerinin mevcudiyetinde ciddi sıkıntılar olduğu düşünülmektedir. Bu gözlemler doğadaki tahribatın ne kadar önemli düzeyde olduğunu kanıtlamaktadır. Nesilleri tehlike altında olan bu bitki türlerinin üretimi ile ilgili pratik ve kolay yöntemler geliştirilmesi bu nedenle çok önem taşımaktadır. Çalışmamızda elde edilen bulgular, bu amaç için değerlendirilebilir niteliktedir.

Orkide tohumları, istinasız bütün türlerde kültür ortamına alındıktan sonra tepki vermiş ve en azından şişerek embriyonun belirgin ve ilk ekim yapıldığı andan daha iri bir yapıya ulaştığı görülmüştür. Ancak bu türlerden bazıları gelişmelerini sürdürememiş ve daha sonraki denemelerde tek başlarına ele alınmak üzere çalışmanın dışında bırakılmışlardır. Bu türler *Orchis purpurea*, *Orchis pallens*, *Orchis tridentata* ve *Ophrys apifera*'dır. Diğer tüm bitki türlerinde olduğu gibi, orkidelerin doku kültüründe de genotipler bazında elde edilen başarı farklı olmuştur. Bu, beklenen bir durum olup, önceki çalışmaların çoğunda da ortaya çıkmıştır. Önal (1999), 21 orkide türünün 3 tanesinde olumlu sonuç aldığını; Çağlayan vd.(1998) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetişen salep orkidelerini denemelere almışlar, en iyi sonuçların sadece *Orchis coriophora* ve *O. anatolica*'dan elde edildiğini belirlemişlerdir. Bizim çalışmalarımızda da *Orchis coriophora*, çok başarılı bir tür olarak belirlenmiştir. Önal (1999) çalışmalarında öne çıkan tür olan *Orchis laxiflora* da bizim yaptığımız deneylerde başarılı türler arasında yer almış ve çoğaltımı ilk beş tür arasına girmiştir. Türler arasında ortaya çıkan bu farklılığın, aynı türe ait populasyon içerisindeki farklı bitkiler arasında da bulunduğu, gelişme ve bitki oluşturma oranlarının, hatta dış koşullara aktarma aşamasındaki potansiyellerinin farklı olduğu *Dactylorhiza maculata* orkide türünde ortaya konmuştur (Andronova and Ivasenko 2007). Bizim çalışmamızda Deneme IV ve Deneme VII'de *O.morio* türünden elde edilen sonuçlar arasında büyük bir farklılık olduğu görülmektedir. İlk denemede en yüksek çimlenme oranı %22.05 ve bitki gelişme oranı %4.33 iken, *O.morio*'nun yer aldığı ikinci denemede bu değerler

%98.10 ve %89.88 olmuştur. Üstelik bu iki denemede aynı besin ortamı bileşimleri de bulunmaktadır. Bu iki deneme arasındaki en önemli farklılık; materyal olarak kullanılan *O.morio* tohumlarının, aynı türe ait olmakla birlikte farklı lokasyonlardan temin edilen bitkilerden alınmış olmasıdır. İlk denemede kullanılan *O.morio*'lar Bolu ili Mengen-Devrek arası 740-760m rakımdaki çayırılık alanlardan temin edilmiş, diğer *O.morio*'lar ise Bartın-Amasra'dan 60m rakıma sahip çayırılıklardan toplanmıştır. Tür tamamen aynı olmakla birlikte bu bitkilerin gerek sahip oldukları genetik varyasyon gerekse yetiştirme koşullarının etkisi, *in vitro* bitki oluşum kapasitesi üzerine çok büyük bir etkide bulunmuştur. Doku kültüründe elde edilen başarı üzerindeki en önemli ve ilk sırada gelen iki etkenin “genotip ve donör bitkinin yetiştirme koşulları” olduğunu bildiren Ellialtıoğlu vd. (2000)'nın genel değerlendirmeleri, bu çalışmada da ortaya çıkan durumu çağrıştırmaktadır.

Araştırmamızda toplam onaltı orkide türüne ait tohum kullanılmıştır. Bunların arasından *Dactylorhiza nischalkiorum*, *Orchis coriophora*, *Serapias vomeracea*, *Orchis morio* ve *Orchis laxiflora*'da tatmin edici veya diğer bir deyişle ticari olarak üretim faaliyetlerine alınma potansiyeli sunan türler olarak öne çıkmıştır. *Orchis simia*, *Platanthera chloranta* ve *Ophrys ferrum-equinum* türlerinde de çok yavaş gelişen ve “binde” oranıyla ifade edilebilecek kadar düşük miktarda bitki oluşumu sağlanabilmiştir. *Orchis purpurea*, *Orchis pinetorum*, *Orchis pallens*, *Orchis tridentata*, *Ophrys apifera*, *Dactylorhiza incarnata*, *Dactylorhiza romana*, *Anacamptis pyramidalis* türlerinde çimlenme ve protokorm oluşumu elde edilmiş olmakla birlikte, bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır.

Çalışmamızda kullanılan türlerin tamamında önceki yıllarda farklı araştırmacılar tarafından yapılmış araştırmalar bulunmaktadır. Bunu yanı sıra ülkemizde bulunmasa da dünyanın değişik ülkelerinde yetişen çok çeşitli karasal orkide türlerinde de doku kültüründe çimlendirme ve bitki elde etme çalışmaları yapılmıştır. Denemelerimiz sırasında bitki elde edilemeyen bazı türlerde, başka araştırmacıların olumlu sonuçlarına rastlanmaktadır. Örneğin Van Waes (1987) *Anacamptis pyramidalis* türünde, Kitsaki *et al* (2004) çok sayıdaki *Ophrys* türünde olduğu gibi *Ophrys apifera*'da (bitki oluşumu sayısal olarak verilmemekle birlikte protokormdan sonra bitkiye dönüşüm olduğu

anlaşıyor); Van Waes and Debergh (1986) *Orchis maculata*'da bitki elde edilebildiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte *Liparis loeselii* orkide türünde *in vitro* koşullarda çimlenme elde edilemediğini bildiren Vejsadova and Mala (1996)'ya karşın, devam eden çalışmaları sonucunda 2001 yılında başarılı sonuçlar elde edebilmiştir (Vejsadova 2001). Aynı araştırmacı *D. incarnata* ssp. *serotina* türünde de *in vitro* bitki elde edebilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda *D. incarnata* olduğu teşhis edildiği halde bunun alt türü hakkında bir bilgi bulunamamıştır. Çalışmalarımızda olumlu sonuç elde edilmesi güç görünen türler, daha sonra tek başlarına araştırmalara konu edilmek üzere ayrılmış, çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki rejenerasyonu sağlandığı görülen türlerde çalışmalarımız yoğunlaştırılmıştır. Böylece bir veya birkaç orkide türünde ticari üretim aşamasına geçebilecek durumdaki ortam ve inkübasyon koşulları oluşturulması amaçlanmıştır. Nitekim beş türde (*Dactylorhiza nieschalkiorum*, *Orchis coriophora*, *Serapias vomeracea*, *Orchis morio* ve *Orchis laxiflora*) amacımıza ulaşmak mümkün olabilmektedir.

Orkide tohumlarının *in vitro* koşullarda asimbiyotik olarak çimlendirilmesi, literatürde çok sayıdaki bilgi ile desteklenmektedir ve bunların arasında en fazla atıf alanlar belki de Van Waes and Debergh (1986) ve Knudson (1929)'dur. Arditti and Ernst (1993)'de orkidelerin mikro çoğaltımını konu alan eserinde önemli bilgiler vermektedir. Besin ortamının bileşimi, tüm doku kültürü çalışmalarında olduğu gibi orkide tohumlarının çimlendirilmesinde de önem taşımaktadır. Araştırmamızda, literatür incelemesinin ardından esas olarak üç ana besin ortamı kullanılmıştır. Bunlar Murashige and Skoog (1962) ortamı, Knudson C (1946) ortamı ve Van Waes and Debergh (1986) ortamıdır. Ayrıca, mineral içeriği bakımından çok zengin ortamlardan ziyade daha basit bileşimdeki ortamların verdikleri olumlu sonuçlar (Stewart and Kane 2006) göz önünde bulundurularak ½ MS ortamı da deneylere dahil edilmiştir.

Çalışmanın tümünde, “Tür + Besin ortamı” interaksyonları önemli çıkmış olmasına rağmen, yani her türün besin ortamı tercihi değişiklik göstermesine karşın, her deneme bazında türler ortalaması üzerinden yapılan değerlendirmeler sonucunda, MS ortamının hem çimlenme, hem protokorm oluşturma ve hem de bitki gelişimi aşamalarında en az tercih edilen ortam olduğu görülmüştür. MS ortamı, kuvvetli bir ortamdır ve sadece

çimlenmek için bir miktar enerji desteği ve yeterli neme ihtiyaç duyan embriyolar için olumlu etki yapmamaktadır. KC ve VW&DB ortamları tüm gelişme aşamalarında en iyi oranları vermiştir, ve ½ MS ortamı da bu iki ortamdan geride kalmamıştır (Deneme I). Nitekim Önal (1999) KC ortamını; Çağlayan vd. (1998) VW&DB ortamını öne çıkartmışlardır. Stewart and Kane (2006)'de "Değiştirilmiş Lucke, MS, Lindemann, Vacin&Went, değiştirilmiş Malmgren, KC" ortamlarını kullanarak Florida için endemik *Habernaria macroceratitis* orkidesinde *in vitro* çimlendirme ve bitki elde etme üzerine çalışmışlardır. Ekimden sekiz hafta sonra Lindemann (%89.1) ve KC (%89.2) ortamlarında en yüksek çimlenme elde edilmiştir. Protokorm oluşumu için bu sıralama değişmiş en uygun ortam olarak MM (Değiştirilmiş Malmgren) bulunmuştur.

Pedroza-Manrique and Mican-Gutierrez (2006), Kolombiya için endemik orkide türü olan *Odontoglossum loriosum*'da *in vitro* asimbiyotik çimlenme için KC, MS ve Hydro-Colyap mineral bileşimlerini kullanmış, MS'in en düşük başarıyı gösterdiğini, KC'nin uygun olabileceğini, ancak Hydro-Colyap markalı ticari bileşimin en yüksek çimlenme oranı sağladığını bildirmişlerdir. Valetta *et al.* (2008), Orchimax (Duchefa) ticari ortamında bazı modifikasyonlar yapmışlar, bunların arasından BA ilave edilen ve aktif kömür bulunduran bileşimde % 5.12 çimlenme elde edilebildiğini kaydetmişlerdir. Konu ile ilgili araştırmaların büyük bir çoğunluğu bu aşamada veya en fazla protokorm aşamasında bitmektedir. Oysa, bizim deneylerimizde görülmüştür ki; her çimlenen ve hatta protokorm oluşturan tür mutlaka bitki oluşturmamaktadır. Yine de çimlenme aşamasında olsa da ortam bileşimleriyle ilgili çok sayıda denenen parametre ve çeşitlemelere rastlamak mümkündür. Bunlardan önemli bir bölümü bitki büyüme düzenleyicileri ile ilgilidir.

Karasal orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine en olumlu etkiye sahip hormonların sitokininler olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen, bitki hormonlarının çimlenme üzerindeki etkilerinin oldukça farklı olabileceği belirlenmiş, aynı bitki hormonunun bir orkide türünde olumlu etki yaparken, diğerlerinde olumsuz etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Arditti ve Harrison 1977)

Stewart and Kane (2006), BA, Zeatin, Kinetin ve 2 İP sitokininlerinin değişik dozlarda çimlendirme ortamına ilave edilmesinin etkilerini incelemişlerdir. Her ne kadar kullanılan hormonlar çimlenme oranı üzerinde (özellikle BA) olumlu etkiler yapmışsa da hormonsuz KC ortamı tercih edilebilir olmuştur. Büyümeyi düzenleyicilerin etkisini, *Dactylorhiza purpurella* (sonradan *Orchis purpurella*) türü tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi amacıyla inceleyen Hadley and Harvais (1968); IAA, GA₃ ve kinetinin etkilerini araştırmıştır. Kinetinin tek başına veya IAA ile birlikte kullanılmasıyla ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Yine sadece çimlenme aşaması sonuçları bulunan araştırmada IAA'in çimlenme oranını azalttığı fakat protokormların uzamasını sağladığı, giberellik asitin protokorm ömrünü uzattığı fakat sayısını etkilemediği kaydedilmiştir. Pedroza-Manrique and Mican-Gutierrez (2006), 2.68µM NAA ilavesinin çimlenmeyi olumlu etkilediğini bildirirken, Vejsadova (2001) BA ve NAA'in çimlenme üzerindeki olumlu etkilerinden bahsetmiştir.

Çalışmamızda, çok yoğun olmayan besin ortamı bileşimlerine yönelim bulunmaktadır. Niekim Harvais (1973) ve Arditti (1979)'de epifitik orkidelerin (başka bitkiler üzerine sarılıp havai olarak yetişen orkideler) yoğun besin ortamlarına ihtiyaç duydukları halde, karasal orkidelerin seyreltik ortamlarda daha iyi çimlendiğini rapor etmektedirler. Besin ortamlarına bu görüş çerçevesinde büyüme düzenleyici uygulamaları yapılmamıştır. Sadece denemelerimizin bazılarında giberellik asit kullanılmıştır. Bu hormonun seçilmesinin en önemli nedeni, tohum çimlenmesindeki olası dormansi etkisini kırmak ve çimlenmeyi uyarmaktır. Ancak GA₃ ilavesi bazı tür ve dozlarda olumlu kombinasyonlar oluşturduğu halde, genel olarak çimlenme üzerinde çok önemli bir artırıcı etki yapmamıştır. Örneğin DenemeII'de türler ortalaması üzerinden bakıldığında (Çizelge 4.13) 0.1mg/l GA₃ ilavesi, ½ MS ve KC ortamlarında %11.73 ve %11.51 çimlenme oranına sahip olmuş, ancak hormonsuz KC ortamından (%19.20) geride kalmış; bununla birlikte hormonsuz ½ MS'ten (%9.17) daha iyi durumda olmuştur. *D. nieschalkiorum*'da KC ortamına 0.1 veya 0.5 mg/l GA₃ ilave edilmesi; çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişme oranları üzerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde bir etki yapmamış; fakat ½ MS ortamına 0.5mg/l GA₃ ilavesi her üç aşamadaki oranları da artırıcı etki yapmıştır (Çizelge 4.89). KC ortamına GA₃ ilave edilmesi, *Orchis coriophora*'daki oranlar üzerinde de etkili bir değişime neden olmamıştır (Çizelge

4.92). *Serapias vomeracea* türünde ise KC ortamına GA₃ ilave edilmesi, tüm gelişme aşamasındaki oranlarda azalmaya neden olmuştur. *Serapias vomeracea*'de hormonsuz KC ortamında çimlenme, protokorm oluşumu, bitki gelişme oranları %83.44, 75.75 ve 57.65 iken ortama 0.1mg/l GA₃ ilave edildiğinde %46.16, 26.22 ve 21.71; 0.5mg/l GA₃ ilave edildiğinde ise %41.56, 24.35 ve 19.52 olmuştur (Çizelge 4.95). Engelleyici etki çok belirgin ortaya çıkmıştır. *O.morio* türünde de KC ortamına GA₃ ilave edilmesi, engelleyici etki yapmış olmakla birlikte bu etki çok hafif olmuş genel olarak KC ortamlarında %74.31-89.88 arasında bitki gelişmesi sağlanmıştır (Çizelge 4.97). *O.laxiflora* türünde de GA₃ ilavesi istatistiksel olarak bazen çok belirgin olmasa da yine de çimlenme, protokorm oluşturma ve bitki gelişimi üzerinde engelleyici etkisini ortaya koymuştur. Lauzer et al. (1994); *Cypripedium acaule* türünde çimlenme oranını %5'ten yukarı çekmek için GA₃ ilavesini kullanmış ancak, uygulama etkisiz olmuştur. Önal (1999), KC ortamına 0.2mg/l GA₃ ilave edildiğinde *O.laxiflora*'da hiçbir gelişme olmadığı belirtilmektedir. *O.sancta* türünde ise GA₃ ve BAP içeren ortamlarda az da olsa çimlenme kaydedilmiştir.

Miyoshi and Mii (1995), *Calanthe discolor* orkide türünde çimlenme oranını artırmak amacıyla 0, 10, 100 ve 1000 mg/l GA₃ solüsyonunda bir gün boyunca daldırma yapıp tohumları bu işlemin ardından kültüre almışlar veya besin ortamına 1 ya da 10 mg/l GA₃ ilave etmişlerdir. 10 ve 100 mg/l GA₃'te daldırma uygulaması olumlu etki yapmamış, tam tersine engelleyici etki yapmıştır. 1000 mg/l GA₃ ise çok ciddi engelleyici etki yapmıştır. Dışsal GA₃ ilavesi bizim çalışmamızda genelde çimlenme ve gelişme oranlarına engelleyici etkisi olmuş, bazı tür ve ortam kombinasyonlarında etkisiz düzeyde rol oynamıştır.

Nitekim Arditti (1979), orkide tohumlarının çimlenmesi üzerinde hormon uygulamalarının çok ciddi etkilerinin bulunmadığının bildirmektedir. Ayrıca Arditti and Ernst (1984)'de GA₃ uygulamalarının orkide tohumlarında çimlenmeyi engelleyici etkilerinin olabileceği yönünde bilgi vermektedir. Bu durumda orkide tohumlarının çimlenme oranlarının düşük olması halinde tohumda bir dormansi olmasından kaynaklanmayacağı yorumu yapılabilecektir. GA₃ ilave edilen ortamlarda çimlenme ardından protokormlar uzun ve hızlı gelişmekle birlikte, oranda bir artış olmamaktadır.

Arditti and Ernst (1984)'de, çimlenme sorunlarının esas olarak tohum kabuğunun (testa) skarifikasyonu yani aşındırılması ile aşılabileceğinden bahsetmektedirler.

Rasmussen (1992), *Epipactis palustris* orkide türünde $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ (kalsiyum hipoklorit) çözeltisinde yüzeysel dezenfeksiyon ile tohum kabuğunun aşındırılması, tohum ekimini takiben ilk dört hafta 20°C 'de inkübasyon; tohumların 8-12 hafta süreyle $4-8^\circ\text{C}$ 'de soğukta katlanması uygulamalarıyla “dormansi mi- tohum kabuğu geçirimsizliği mi” sorusuna cevap aramışlardır. İlk dört hafta 20°C 'de inkübasyon uygulaması, bunların arasında en iyi sonucu vermiş, ancak her iki faktörün de çimlenmede etkili olabileceği yönünde bir görüş oluşmuştur. Çimlenme için mikoriza zorunlu bulunmuştur. Miyoshi and Mii (1995), ortama GA_3 ilavesi veya tohumların GA_3 'lü solüsyonda bir gün süreyle bekletilmesini etkisiz bulmuşlar; ancak tohum kabuğunun su geçirirliğinin çok önemli olduğunu, sonikasyon (ultrasound ses titreşimi) uygulamalarıyla tohum kabuğunu zedelemenin olumlu etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Lauzer *et al.* (1994), çimlenme oranını artırmak için soğuk uygulamaları, su ile yıkama ve GA_3 ilavesinden olumlu sonuç alamamışlar; TTC ile boyamada embriyo canlılığı çok yüksek çıkmasına rağmen çimlenmedeki sorunun ne olduğunu anlamaya çalışmışlardır. Tohumların sodyum hipoklorit ile uzun süre dezenfeksiyonu ve ultrason uygulamaları, çimlenme oranını %5'ten %10.4 ve %29.2'ye kadar çıkarabilmiştir. Vejsadova and Mala (1996)'da kalsiyum ve sodyum hipoklorit çözeltilerinin farklı konsantrasyonlarını ve değişik sürelerini denemişlerdir. *D.maculata*, *D. incarnata*, *D.bohemica*, *D.longebracteata* ve *O.morio* türlerinde; tohum kabuklarının rengi tamamen beyazlaşınca kadar %7.2'lik kalsiyum hipokloritte veya %10'luk sodyum hipokloritte tutarak yüzeysel sterilizasyon yapılmasının çimlenme oranını çok olumlu yönde etkilediğini bildirmektedirler. Van Waes and Debergh (1986)'da 23 adet doğu Avrupa orkidesinde yapmış oldukları araştırmalarında, en önemli konunun kalsiyum hipoklorit + Tween-80'de tutma süresi olduğundan bahsetmişler, tohum kabuğunun çatlamaması halinde canlı da olsa embriyonun gelişemediğinden söz etmişlerdir. Vurgulanan önemli husus, bu özelliğin de türlere bağlı olarak değiştiğidir. Genotipin önemi, büyüme düzenleyicilere karşı gösterilen tepki ve tohum kabuğunun engelleyici etkisi bakımından da kendisini göstermektedir. Valetta *et al.* (2008)'ın yaptıkları yeni bir çalışmada, İtalya'da yetişen *Orchis mascula* tohumları %2'lik H_2SO_4 çözeltisinde 2, 5,

10 dakika süreyle tutulmuş ve bunun ardından %1'lik NaClO + Tween 20 (1damla/100ml) çözeltisinde 10, 20 veya 30 dakika sterilize edilmiştir. Tohum kabuğunun kimyasal olarak aşındırılması çimlenmeyi olumlu etkilemiş, en iyi sonuçlar 5 dakika H₂SO₄'te tutulan ve 20 dakika süreyle sodyum hipokloritte bekletilen tohumlardan elde edilmiştir.

Besin ortamındaki azot kaynağı ya da azotun bulunup bulunmaması da türlere bağlı olarak orkide tohumlarının çimlenmesi üzerinde etkili olabilmektedir (Van Waes and Debergh 1986). Özkoç ve Dalcı (1993), *Serapias vomeracea* türünde MS, KC ve VW&DB ortamlarındaki inorganik azotun tamamen çıkartılmasının çimlenme oranını artırdığını ifade etmektedir. Özellikle MS ortamındaki azotun çıkartılmasıyla çimlenme oranının %58 ile en yüksek seviyeye ulaştığı ifade edilmektedir. *Orchis laxiflora* türünde aynı araştırmacıların yaptığı bir başka çalışmada KC-N ortamından en yüksek çimlenme oranı (%25.1) elde edilmiştir (Özkoç ve Dalcı 1993). Bizim çalışmamızda MS-N kombinasyonu kullanılmamış, ancak KC-N ortamları yer almıştır. Besin ortamından azotun çıkartılması, bazı türlerde ve bazı ortam bileşimlerinde olumlu sonuçlar vermiştir. Örneğin *D.nieschalkiorum*'da KC-N+0.1 GA₃ ortamında %31.25 çimlenme elde edildiği halde, KC ortamında bu oran %18.83 olmuştur (Deneme III). *Serapias vomeracea* ve *O.coriophora* türlerinde de KC ve KC-N ortamları olumlu bulunmuş, interaksiyon anlamında etkiler her deneme aşamasında az veya çok ortaya çıkmıştır. Ancak genel olarak besin ortamından azotun uzaklaştırılmasının dikkat çekici bir olumlu etkisinden bahsetmek olası görünmemektedir.

Harvais (1982), aminoasitlerin kültür ortamına azot kaynağı olarak ilave edilmesinin farklı orkide türlerinde değişik etkiler ortaya çıkarabildiğini rapor etmektedir. Hatta Vejsadova (2001) *O.morio*'da (NH₄)₂SO₄ dozunun 0.132 g/l'den 0.264 g/l'ye artırılmasının sürgün uzaması, kök uzunluğunun ve yaprak sayısının artmasına neden olduğu da bulgular arasındadır. Kültür ortamına ilave edilen bazı aminoasitlerin, embriyonun büyümesi için gerekli olan azotu sağladığı ve bunların (NH₄)₂SO₄'ın yerini alabileceği ifade edilmektedir. Araştırmacılar L-Glutamin yerine kasein hidrolizat kullanılabileceğini bildirmektedirler (Waes van and Debergh 1986).

Kültüre alınan tohumların ilk 4 hafta sonunda veya 3 ay sonra fotoperiyodik koşullara aktarılması, gelişme üzerinde etkili olmuştur. Protokormlar ışık aldıklarında yeşermişlerdir. Aynı durum Arditti (1967), Harley (1969) ve Pierik et al. (1982,1983) tarafından da rapor edilmektedir. Deneme III'te yer alan üç orkide türünün ortalaması üzerinden hesaplandığında aydınlıktaki çimlenme oranı %13.77 ile karanlıktan (%10.42) daha yüksek olmuştur. Ancak protokorm oluşturma bakımından durum değişmiş, karanlık koşullarda %11.92 oran elde edilirken, aydınlıktaki tohumlardan %3.92'si protokorm oluşturmuştur. Protokorm elde edilen her iki türde de (*D.nieschalkiorum*, *O.pinetorum*) bu durum belirgin olarak ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.32). Bitki gelişmesi bu deneme aşamasında sadece *D.nieschalkiorum* türünden elde edilmiş, 3 ay boyunca karanlıkta inkübe edildikten sonra 8/16 fotoperiyodik koşullara aktarılanlarda %7.87; ilk 4 haftanın sonunda ışıklı koşullara alınanlarda %1.88 oranında bitkiye dönüşüm ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.36). Bu sonuçlar, orkide tohumlarının çimlendirme ve protokorm oluşumu için sürekli karanlık ve 23°C'nin en iyi olduğunu bildirmektedir. Beyrle and Smith (1993) protokormların gün ışığına aktarılmasıyla hemen klorofil oluştuğu ve yeşillenme meydana geldiğini anlatmıştır. Stewart and Kane (2006)'de sürekli karanlık uygulamasının, 16/8, 8/16, 24/0 aydınlık/karanlık rejimlerine göre daha yüksek oranda protokorm oluşumuna neden olduğunu ifade etmektedir. Protokormdan bitkiye dönüşüm aşamasında da 8/16 saat aydınlık/karanlık uygulamasının etkisinin olumlu olduğu, bitki başına yumru oluşumu (1.06), yumru ağırlığı (42.7µg) ve bitki kütlesinin (69.5 µg) en fazla bu uygulamadan elde edildiği kaydedilmiştir. Stewart and Kane (2006)'nın bulguları, bizim sonuçlarımızı tamamen destekler özelliktedir.

Bitkinin dış koşullara aktarılması aşamasında sorunlarla karşılaşmıştır. Perlit+pomza karışımına dikilen ve serada sisleme ünitesine alınan bitkicikler tamamen kısa sürede canlılıklarını yitirmişlerdir. Organik madde bakımından yetersiz olan perlit+pomza karışımının aktarma ortamı olarak uygun olmayacağı anlaşılmıştır.

Bongers (1993), asimbiyotik *in vitro* çimlendirme aşamasından geçilerek elde edilmiş karasal orkide türlerinin, dış koşullara aktarılması sırasında meydana gelen kayıpların fazla olduğunu anlatmaktadır. Simbiyotik olarak yaşadıkları mantarların bulunmadığı,

fakat aynı zamanda steril de olmayan yeni bir gelişme ortamına aktarılan *in vitro* kökenli orkide bitkiciklerinin yaşama tutunmalarındaki başarıyı sağlama konusunda, kullanılan teknik ve yetiştirme ortamı (substrat) önerileri sunan araştırmacı, bu ortamın iyi havalanabilen, ama su tutma kapasitesi yüksek bir karışım olması gerektiğini vurgulamaktadır. İri taneli kum: perlit: torf (Bims veya Lava): vermikulit (1: 1: 1: ½) karışımını önerirken, aynı zamanda kavanozlardan çıkartılan orkide bitkiciklerinin 15-20 dakika %1.5'luk Previcur çözeltisinde bekletilerek, olası fungal bulaşmaların önüne geçilebileceğinden bahsetmektedir.

Yeniden elde edilen bitkilerin dış koşullara aktarılmasında bu sefer perlit, Bolu torfu ve vermikulit kullanılmıştır. Ancak bu defa da ortam bakımından yapılan iyileştirme ile olumlu adım atılmışken, sisleme ünitesinin bulunmadığı dış koşullara doğrudan aktarma nedeniyle olduğuna kanaat getirdiğimiz ölümler ortaya çıkmıştır. Üçüncü kez dış koşullara aktarma çalışması bu defa iklim odasında vermikulit doldurulmuş küçük plastik kutulara aktarma şeklinde gerçekleştirilmiştir. Kapakları ilk önceleri kapalı tutulan ve arada açılıp el pulverizatörüyle su püskürtülen bitkilerde yaşama oranı, bu aşamaya kadar yapılan uygulamalar içinde en iyisini oluşturmuştur. Bitkiler toprağa aktarıldıktan sonra da gelişmelerine devam etmiş, ancak bir ay kadar yaşadıktan sonra elden çıkmışlardır.

Dördüncü aktarma aşamasında, mikoriza ve alg uygulamaları denenmiştir. Alg uygulaması, diğer koşullara göre en yüksek canlı bitki oranını aktarmadan 8 hafta sonra sağlayabilmiştir (%41-46). Ancak denemeye bu aşamadan sonra son verilmek zorunda kalınmıştır. Çünkü Adana koşullarında sera içindeki sıcaklık bu dönem içinde 40°C'lere kadar çıkmıştır. Esasen tüm çalışmadaki dış koşullara aktarma işlemleri, orkidelerin doğal yetiştirme koşullarına uymayan sıcaklık derecelerine sahip zaman ve mekanlarda yapılmıştır. Kontrollü seraların bulunmayışı, orkide bitkilerinin dikim aşamasına genellikle bahar veya yaz aylarında ulaşmaları, onların aşırı sıcak koşullarda dış ortama alışmaları için zorlanmalarına neden olmuştur. Ancak çalışmamızdaki düşük adaptasyon başarısı tesadüf değildir. Çağlayan vd. (1998)'de *O.anatolica* ve *O.coriophora* bitkiciklerini torf ortamına dikmişler ve özenle dış koşullara alıştırmaya çalışmışlardır. Bitkilerden bir bölümü yaşamalarına devam etmiş ve 10 hafta sonra yaşama oranı %20

olarak belirlenmiştir. Bu oran da oldukça düşüktür. Bitkinin *ex vitro* koşullara uyumda sorunu olduğu ortadadır.

Yumruların parçalanması ve doğal koşullarda dikimlerinin yapılması ile başarı elde edilememiştir. Bu konuda bilimsel bir kaynak veya kanıtlanmış bir başarı da zaten bulunamamıştır. Sadece halk arasında sökülen saleplerin ana yumrusu alınıp küçük yumrusunun olduğu yere dikiminin yararlı olduğu bilgisi dolaşmaktadır. Ancak bununla ilgili de bilimsel bir belgeye rastlanmamıştır. Dolayısıyla geleneksel ve bilinen vejetatif çoğaltım yöntemleri, karasal orkideler için bir çıkış yolu olmaktan uzaktır.

Araştırmamızın eksik kalan kısmı, “*in vitro* şartlarda elde edilen bitkiciklerin dış koşullara aktararak başarıyla gelişmelerini sürdürmelerini sağlama” bölümüdür. Bu konuda ümitvar sonuçlar alınmıştır ve sonraki çalışmalarda bu konunun da tamamlanmasıyla, salep orkidelerinin *in vitro* koşullarda çimlendirilerek bitki elde edilmesi için önemli bir aşamaya gelinebilecektir. Böylece bir kısmı endemik türler olan salep orkidelerinin çoğaltılarak nesillerinin güvence altına alınması konusunda gelişme sağlanabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Denemelerde yer alan onaltı orkide türünden beş tanesinde başarılı bir biçimde çimlenme, protokorm oluşumu elde edilmiş ve bitkiye dönüşüm sağlanabilmiştir. Üç türde de düşük oranda olmakla birlikte ümitvar gelişme ve bitki oluşumu meydana gelmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar deneme bazında veya her bir tür için ayrı ayrı verilebilecek durumda olmakla birlikte, bu şekilde yapılacak bir değerlendirmenin genel bir yorum ve öneri yapmaya elverişli olmadığı düşünülmüştür. Bu nedenle sonuçlar genel ve global bir bakış açısıyla yorumlanmıştır. Buna göre sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir:

1. Batı Karadeniz Bölgesi'nde, doğal alanlarda yetişen ve salep elde edilmesinde kullanılan orkidelerden onaltı türe ait bitki örneği toplamak mümkün olmuştur. Bu türler *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich; *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soo; *Dactylorhiza neschalkiorum* Bauman et Künkele.; *Dactylorhiza romana* (seb.) Soo; *Ophrys apifera* Hudson; *Ophrys ferrum-equinum* Desf.; *Orchis coriophora* L.; *Orchis laxiflora* Lam.; *Orchis mascula* (L.) L. ssp. *pinetorum* (Boiss et Kotschy) Camus; *Orchis morio* L.; *Orchis pallens* L.; *Orchis purpurea* Hudson; *Orchis simia* Lam.; *Orchis tridentata* Scop.; *Platanthera chlorantha* (Custer) Reichb.; *Serapias vomeracea* (Burm.fil.) Briq. ssp. *orientalis* Greuter.'tir.
2. Denemeye alınan bütün türlerde *in vitro* koşullarda tohum kabuğunun çatlamasıyla oluşan çimlenme ve bu dokunun gelişerek protokorma dönüşme aşamaları elde edilebilmiştir. Ancak bunun oranı türlere ve besin ortamı bileşimlerine bağlı olarak farklılıklar göstermiştir.
3. *Dactylorhiza neschalkiorum* Bauman et Künkele, *Orchis coriophora* L.; *Orchis laxiflora* Lam., *Orchis morio* L. ve *Serapias vomeracea* (Burm.fil.) Briq. ssp. *orientalis* Greuter. türlerinde protokormlardan bitkiye dönüşüm meydana gelmiş ve bu türler ticari olarak üretim için optimizasyon çalışmalarına devam edilerek her bir tür için en uygun besin ortamının geliştirilmesi aşamasına ulaşmışlardır. *Ophrys ferrum-equinum* Desf., *Orchis simia* Lam. ve *Platanthera chlorantha* (Custer) Reichb. türlerinde ise bitki oluşumu meydana gelmiş olmakla birlikte

bunun oranı çok düşük kalmıştır. Yine de bu türlerin kapasitesi artırılabilir izlenimi oluşmuştur.

4. Türlerin *in vitro* çimlenme ve bitkiye dönüşüm yetenekleri ve kapasiteleri farklı olmakla birlikte aynı türe ait, farklı lokasyonlarda yetişen bitkiler arasından da değişik yanıtlar alınabilmektedir (*O.morio*'da daha önce açıklandığı gibi).
5. Orkide tohumlarının çimlenme oranı üzerine besin ortamının etkisi vardır ve önemlidir. Ayrıca “Tür+Besin ortamı” interaksyonu önem taşımaktadır. Besin ortamı olarak seyreltik bileşimler tercih edilebilir. Knudson C (1946), ortamı ve Van Waes&Debergh (1986) ortamları, genel olarak *in vitro* orkide tohumu çimlendirmek amacıyla ilk başvurulacak ortamlar olmalıdır.
6. Besin ortamına ilave edilen büyüme düzenleyici maddeler, az veya çok oranda çimlenme ve bitkiye dönüşüm üzerinde etkili olabilmektedir. Ancak denememizde kullanılan GA₃ dahil olmak üzere, literatürdeki diğer bulgular da birlikte değerlendirildiğinde besin ortamına bitki büyüme düzenleyici madde ilave edilmesinin ticari anlamda büyük katkısının olmayacağı yönünde bir görüş oluşmuştur. Özellikle GA₃ ilavesinin çimlenme oranı üzerinde azaltıcı veya en iyi koşullarda etkisiz olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Her ne kadar bazı kombinasyonlar, interaksiyon anlamında olumlu görünmüş olmakla birlikte, GA₃'ün protokorm uzaması haricinde belirgin ve olumlu bir etkisinin olmadığı ve besin ortamına katılması gerekmediği kanaatine varılmıştır.
7. Besin ortamındaki inorganik azot kaynağının uzaklaştırılması da bazı kombinasyonlarda olumlu sonuçlara sahip olsa da, üzerinde durmaya daha fazla çalışma yapılmasına, ya da önemle vurgulanmaya ihtiyaç duyulmayan bir durumdadır. Nitekim Özkoç ve Dalcı (1993)'ün çalışmasında da özellikle bu etki kuvvetli bir ortam olan MS'ten azotun çıkartılmasıyla dikkat çekici olmuş ve bir miktar da KC-N etkisi olumlu anlamda öne çıkmıştır. Ancak bizim çalışmamızda %21.24'lük çimlenme oranı ile KC ortamı ve %25.29'lük çimlenme oranı ile VW&DB ortamı; araştırmacıların “en iyi” olarak nitelendirdikleri %25.1'lik orandan (KC-N ortamından) daha iyi ya da aynı sonuçları vermiştir. Dolayısıyla ortamın azotu ile ilgili özel uygulamalara gerek görülmemiştir.

8. Tohum ekimini takiben kültürlerin 3-4 ay boyunca sürekli karanlıkta tutulması olumlu bulunmuştur. Kültürlerin 4 hafta karanlıkta tutulduktan sonra 8/16 aydınlık/karanlık fotoperiyodisitesine alınması, çimlenme oranını artırmış, protokormlar oluştukları andan itibaren yeşermiştir. Ancak bu koşullarda protokorm oluşumu ve bitki gelişimi önemli düzeyde engellenmiştir.
9. Dış koşullara aktarma aşamasında substratın yapısı önem taşımakta, ancak bundan daha da ön plana aktarma mevsiminin ve sıcaklığın etkisi çıkmaktadır.
10. Alg uygulaması, dış koşullara aktarma aşamasında kontrol ve mikoriza uygulamalarına göre daha yüksek yaşama oranı vermiştir. Bitkinin doğal eğilimleri, simbiyotik yaşama uygunluğunun göz önünde bulundurulması gerektiği kanaatine varılmıştır.
11. Yumruların parçalanması veya bölünmesi ile vejetatif olarak çoğaltma çalışmaları başarısız olmuştur.

Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında daha sonra yapılması gereken araştırmalar ve gidilmesi gereken yollar şunlar olabilir:

1. Bitki elde edilen türlerde daha ucuz ve basit ortamlarda başarı durumunun incelenerek artırılması, böylece ticari olarak uygulanabilme potansiyelinin yükseltilmesi,
2. Çimlenme oranı düşük olan ve bitki oluşumu sağlanamayan türlerde, tohumlara soğuk uygulaması ile olası dormansinin kırılması konusunda ve tohum kabuğunun aşındırılarak su geçirgenliğinin artırılması konusunda deneyler yapmak,
3. Besin ortamına organik substratların ilave edilmesi yoluna gitmek.[Önal (1999), Çağlayan vd. (1998) domates ve Hindistan cevizi sütü ilavesi yapmıştır. Arditti and Harrison (1997) ve Van Waes and Debergh (1986) muz, patates ekstraktı, Hindistan cevizi sütü, pepton gibi maddelerin ilave edildiği ortamları önermektedir. Kitsaki *et al.* (2004) Hindistan cevizi sütü ve ananas suyunun besin ortamlarına ilavesini tavsiye etmektedir],
4. Özellikle polifenol salgısının yoğun olduğu *Anacamptis pyramidalis* gibi türlerde aktif karbon (%0.02-0.3) ilave edilen besin ortamlarında kararma

sorununun olmadığını bildiren Van Waes (1987)'in de önerileri doğrultusunda, denemedeki bir çok türde pembe-kahverengine dönüşen besin ortamları da dikkate alındığında aktif karbon ilavesi yapmak,

5. Dış koşullara aktarma aşamasında substratın içerisine, doğadan yetiştiği ortamlardan izole edilen fungusların ilave edilmesi, alg uygulamasının tekrarı ve 16-20°C gibi doğada gelişmeye başladıkları dönemlerdeki sıcaklıklarda aktarma yapılması; bakım koşullarının kesintisiz ve özenle sürdürülmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Andersen, F.T., Rasmussen, H.N., 1996. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*, *Rhizoctonia* species, Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Patology, and Disease Control, (B.Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate&G. Dijst). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 379-390.
- Andronova, E.V. 2003. In situ seed germination of *Dactylorhiza maculata* s. 1. (Orchidaceae). *Botanicheskii Zhurnal*. V: 88 (5), p: 63-71.
- Andronova, E.V and Ivasenko, Zh. V. 2007. Viability of different plant offsprings of *Dactylorhiza maculata* s.l.(Orchidaceae) after transfer from in vitro culture to nature. *Botanicheskii Zhurnal*, 92(10): 1544-1554.
- Anonim 2000. Orkidelerin korunmasıyla ilgili toplantı Muğla'da yapıldı. *Devrim Gazetesi*, Sayı:12726, Muğla.
- Anonim 2009 a. Beyşehir'de salep orkideleri geçim kaynağı oldu. *Karaman'ın Sesi Gazetesi*, Sayı, 11425. (Yenidoğan Belediye Başkanı Mehmet SAĞ). www.byegm.gov.tr/yayinlarimiz/ANADOLUNUN_SESI/226/AND_38.htm, 18.07.2009.
- Anonim 2009 b. Yozgat'ta Mantar ve Salep geçim kaynağı. <http://arsiv.ntvmsnbc.com/news/15512.asp>. Akdağmadeni Kaymakamı (Bülent KILINÇ), 18.07.2009.
- Anonim 2009 c. Yozgat, Akdağmadeni Davulbaz Köyü. www.davulbazkoyu.com/gecim-kaynaklari.html, 18.07.2009.
- Anonim 2009 d. Salep Gümüşhane ve Yöresinde geçim kaynağı oldu. *Orman İşletme Müdürü*.(Veysel KODALAK). *Karadeniz Gazetesi*(Trabzon), Sayı, 6566. www.byegm.gov.tr/yayinlarimiz/.../155/AND25.htm, 18.07.2009.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33, 1-97.
- Arditti and Harrison 1977. In *Arditti*. 157-175.
- Arditti, J. 1979. Aspects of the physiology of orchids. I: H.W. Woolhouse (Editor), *Advances in Botanical Research*, 7. Academic Pres, New York, 422-697.
- Arditti, J. 1982. *Orchis Biology. Review and perspectives*. I. Cornell Univ. Pres. Ithaca:1-390.
- Arditti, J. and Ernst, R.1982. In: *Stewart and Merwe, Van der*, 263-277.
- Arditti, J. and Ernst, R.1984. *Pyhisiology of germinating orchid seeds*, *Bot.Rev.*,33:1-197.
- Arditti, J. and Ernst, R. 1993. *Micropropagation of orchids*, New York, John Wiley and Sons, Inc.
- Arditti, J, Ghani A.K. 2000. Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biyological implications. *New Phytol.* 145, 367-421
- Aytaş, T., 1994. Bazı *Ophrys* L. (Orchidaceae) Türlerinden Simbiyotik Fungusların İzolasyonu ve *Ophrys apifera* Hudson Tohumlarının Asimbiyotik ve Simbiyotik Ortamlarda Çimlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma (yüksek lisans tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Barroso, J., Feveireiro, P., Olveira, M.M. and Pais, M.S.S. 1990. *In vitro* seed germination, differentiation, and production of minitubers from *Ophrys lutea* Cav., *Ophrys fusca* Link. and *Ophrys speculum* Link. *Sci. Hort.* 42 (4): 329-337.

- Beyrle, H., Penningsfeld, F., and Hock, B. 1985. Orchid mycorrhiza: symbiotic propagation of some Dactylorhiza species. Zeitschrift für Mykologie. V: 51 (2), p: 185-198.
- Beyrle, H.F., and Smith, S.E. 1993. Excessive carbon prevents greening of leaves in mycorrhizal seedlings of the terrestrial orchid *Orchis morio*. Lindleyana. V: 8 (2), p: 97-99.
- Beyrle, HF; Smith, SE; Peterson, R.L and Franco, CMM. 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); pp. 1128–1140.
- Bhaskar, J. and Rajeevan, P.K. 1996. Embryo culture of Vanda 'John. Club'. South Indian Horticulture, 44: 1-2, 36-38; 3 ref.
- Bongers, W.1993. Überführung asymbiotisch vermehrter terrestrischer Orchideen in "natürliche" Kultursubstrate. erschienen in Die Orchidee, 44(6), 1993; 302-304.
- Çağlayan, K., Özavcı, A. ve Eskalen, A. 1998. Doğu Akdeniz Bölgesinde Yaygın olarak yetişen bazı salep orkidelerinin embryo kültürü kullanılarak in vitro koşullarda çoğaltılmaları. T.Jour. of Agriculture and Forestry 22(2):187-191.
- Das, A. and Ghoshall, K.K 1989. In vitro germination behaviour of some orchids seeds developed in plains of West Bengal. Indian Agriculturist, 33:2, 103-109; 8ref.
- Davis, P.H. 1984. Flora of Turkey and East Aegan Islands. Vol.8. Edinburgh at the University Pres.
- Devi, J.; Nath, M; Devi, M. and 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.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., Abak, K. 2000. Haploid Bitki Üretimi. (Bitki Biyoteknolojisi Cilt:I, Ed: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.) s: 138-189., Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Erdem, H.E., 2004. Biyolojik Çeşitliliğinin Ekonomik Değerinin Belirlenmesi: Yabani Orkide Örneğ. (yüksek lisans tezi). E.Ü., Fen Bilimleri Ens., İzmir.
- Fast 1980. Orchideen Kultur. Verlag E. Ulmer, Stuttgart: 1-460.
- Gezgin, Y., 2004. Çeşitli Salep (Orkide) Türlerinde Mikoriza Oluşturan Fungusların İzolasyonu ve Tanımlanması ile İnokulant Olarak Kullanım Olanaklarının İncelenmesi (yüksek lisans tezi). E.Ü., Fen Bilimleri Ens., İzmir.
- Gönülşen, N., Önal, K., Ercan, N., Yıldızgördü, K., Şekeroğlu, E., Biçici, M. ve Eskalen, A. 1996. Ege ve Doğu Akdeniz Bölgelerinde Doğal Yayılış Gösteren Orchidaceae Familyasına Ait Bazı Türlerin *İn vitro* ve *İn vivo* Koşullarda Üretimleri Üzerinde Araştırmalar. TÜBİTAK Proje No: TBGAG-52.
- Hadley, G. And Harvais, G., 1968. The effects of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. New Phytol., 67:441-445.
- Harley 1969. The biology of mycorrhiza. L. Hill, London, second edition: 1-334.
- Harvais, G., 1973. Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture. Can. J. Bot., 51:327-332.
- Harvais, G. 1982. An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. Can. J. Bot., 60:2547-2555.

- Ingold, C.T., Hudson, H.J., 1993. The biology, Sixth Edition (Chapman Hall). London, 224 .
- İşler, S. 2005. Van Salebinin Menşei ve Van Civarının Orkideleri (doktora tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Ens., Van.
- Jong, S. and Sin, S. 1985. Effect of NAA and BA on Dark Culture of *Cymbidium Virens* Rhizom. In vitro, 11.
- Jorgensen, B.T. 1995. Hardy orchids: symbiotic in vitro propagation and cultivation. Acta Horticulturae. 393, p: 165-172.
- Kısakürek, Ş., Arpacı, B.B., Özdemir, A., Dalfesoğlu, K., Ergun, N., Kaya, Y. 2009. Kahramanmaraş Doğal Florasında Yetişen ve Salep Üretiminde Kullanılan Bitkilerin Kültüre Alınabilme Olanakları.
- Kitsaki, C.K., Zygouraki, S., Ziobora, M., and Kintzios, S. 2004. In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several Ophrys species (Orchidaceae). Plant Cell Reports. V: 23 (5), p: 284-290.
- Knudson 1922. Bot.Gaz., 73;1-25.
- 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, C.A.J., 2000. *Flora of Turkey and East Aegan Islands*. Vol:11, University Press, Edinburgh, 656.
- Kulikov, P.V., and Filippov, E.G. 2001. Specific features of mycorrhizal symbiosis formation in the ontogeny of orchids of the temperate zone. Russian Journal of Ecology. V:32 (6), p: 408-412.
- Lauzer, D., St-Arnaud, M., and Barabe, D. 1994. Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). Lindleyana. V: 9(3), p: 197-204.
- Malemnganba, H., Bhattacharya, S., and Deka, P.C. 1994. A new cost effective ambryo culture medium for orchids. Journal of the Orchid Society of India. V: 8 (1/2), p: 67-71.
- Mead, J. and W., Bulard, C. 1975. Effects Of Vitamins And Nitrogen Sources On Asymbiotic Germination And Development Of *Orchis Laxiflora* And *Ophrys Sphegodes* . New Phytol., 74, 33-40.
- Miyoshi, K. and Mii, M.1995. Phytohormone pre-treatment fort he enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. Scientia Hort., 63:263-267.
- Miyoshi, K. and Mii, M.1997. Stimulatory effects of sodium and calciumhypochlorite, prechilling and cytokinins on the germination of *Cypripediummacranthos* seed in vitro.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant 15:473-497.
- Olivia, A.P. and 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 Bölgesinde Doğal Yayılış Gösteren Orchidaceae familyasına ait bazı türlerin in vitro koşullarda üretimleri üzerinde araştırmalar. Turkish J. of Agriculture and Forestry. 23(5):1057-1064.

- Özavcı, A., 1995. Kahramanmaraş Bölgesinde Doğal Yayılış Gösteren Bazı Salep Orkidelerinin İn Vitro'da Yumru Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi
- 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 Gelişimi Üzerinde Araştırılması (doktora tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Özkoç, I. ve Dalcı, M. 1993. *Orchis laxiflora* tohumlarının iki farklı ortamda çimlenmesi ve gelişmesi üzerine bazı fungusların etkisi. DOĞA Türk Biyoloji Dergisi 17(1):23-28.
- Özkoç, I. and Dalcı, M. 1994. Germination of the Seeds of *Orchis laxiflora* Lam.(Orchidaceae) Through Asymbiotic Culture Techniques. Turkish Journal of Botany, 18: 461-464.
- Özdener, Y., 1994. *Dactylorhiza urvilleana* (Steudel) Bauman ve Künkele ve *D. iberica* (Bieb. Ex Willd) Soo (Orchidaceae) Türlerinin Köklerinden Fungusların İzole Edilmesi, Bu Türlerle Ait Tohumların Simbiyotik ve Asimbiyotik Kültür Ortamlarında Çimlenme ve Gelişimi Üzerinde Bir Araştırma (Doktora Tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Pedroso, M.C. and Pais, M.S. 1992. Minituber production from immature seed suspension culture of *Orchis papilionacea*. In vitro Cellular Developmental Biology. 28P: 183-186, October 1992.
- Pedroza-Manrique, J. and Mican-Gutierrez, 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 et al. 1982. Neth. J. Agric.Sci. 30:341-346.
- Pierik et al. 1983. Protoplasma 115: 208-216.
- Pierik, R.L.M. 1987. In vitro Culture of Higher Plants, 149-158.
- Pindel, A., and Pindel, Z. 2004. Initiation of *in vitro* cultures of chosen endangered European species of orchids. Folia Horticulturae. V: 16 (2), p: 111-117.
- Quay, L., McComb, J.A., and Dixon, K.W. 1995. Methods for *ex vitro* germination of Australian terrestrial orchids. HortScience. V: 30 (7), p: 1445-1446.
- Rasmussen, H.N. 1992. Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): requirements for germination and establishment of mycorrhiza. Phytologia Plantarum, 86(1): 161-167.
- Rasmussen, H., Anderson, T.F., and Johansen, B. 1990. Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. V: 13 (2), p: 171-177.
- Rasmussen, H.N., Johansen, B., and Andersen, T.F. 1991. Symbiotic *in vitro* culture of immature embryos and seeds from *Listera ovata*. Lindleyana 6(3):134-139.
- Rasmussen, H., and Rasmussen, F.N. 1992. Climatic and seasonal regulation of seed plant establishment in *Dactylorhiza majalis* inferred from symbiotic experiments *in vitro*. Lindleyana. V: 6 (4), p: 221-227.
- Sazak A., 2004. Bazı Orkide Türlerine Ait Tohumların Asimbiyotik Ve Simbiyotik Olarak Çimlendirilmesi ve Fide Gelişimi. On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi

- Sezik, E. 1967. Türkiye'nin Salepgilleri, Ticari Salep Çeşitleri ve Özellikle Muğla Salebi Üzerinde Araştırmalar Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi.
- Sezik, E. ve Özer, Y.B. 1983. Kastamonu Salebinin Menşei ve Kastamonu Civarının Orkideleri. TÜBİTAK Proje No: TBAG - 424.
- Sezik, E. 1984. Orkidelerimiz, Sandoz Kültür Yayınları. No:6, 166s.
- Sezik, E. ve Baykal, T.1988. Maraş Salebinin Menşei ve Maraş Civarının Orkideleri. TÜBİTAK Proje No: TBAG- 1988.
- Sezik, E. 2002. Acta Pharmaceutica Turcica, 44: 151-157.
- Sharma, S.K., and 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.
- Sharma, J., Zettler, L.W., Sambeek, J.W. van., Ellersieck, M.R., and Starbuck C.J. 2003. Symbiotic seed germination and mycorrhizae of federally threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). American Midland Naturalist. V: 149 (1), p: 104-120.
- Smreciu, E.A. and Currah, R.S. 1989. Symbiotic germination of eeds of terrestrial orchids of North America and Europe. Lindleyana, 1(1):6-15.
- Stewart, L.S. and Kane, M.E. 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrstrial orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86(2):147-158.
- Singh, F., and Prakash, F. 1985. Suspension Culture Technique fort he Culture of Orchid Embryos, Gartenbauwissnschaft, 50 (5): 236-238.
- Sushmita-Bhattacharjee., Khan, H.A., Reddy, P.V., and Bhattacharjee, S. 1999. In vitro germination of *Phalaenopsis* hybrid seed. Seed Research, 27(1); 11-15, 25 ref.
- Szendrak, E., and Read, P.E. 2000. In vitro propagation and anatomical studies of temperate orchid species (Orchidaceae). Acta Horticulturae, p: 75-81.
- Tay, Lj; Takeno, K., and 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. 1988, 57:2, 243-249, 10 ref.
- Tekinşen, K.K., 2006. Salep. *Bilim ve Teknik*, (453):76-77.
- 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., and Pasqua, G. 2008. In vitro asymbiotic germination of *Orchis mascula* L. Plant Biosystems- An International Journal Dealing with allAspects of Plant Biology, 142(3):653-655.
- Van Waes,. J. 1987. Effect of activated charcoal on in vitro propagation of Western European orchids. Acta Hort.212(1):131-138.
- Van Waes,, J.M., and Debergh, P.C. 1986. In vitro germination of some western European Orchids. Physiologia Plantarum, 67(2):253-261.
- Vejsadova, H., and Mala, M. 1996. Seed germination of some endangered terrestrial orchids under aseptic conditions. Acta Pruhoniana. 63, p: 77-84.
- Vejsadova, H. 2001. Endangered Orchid onservation using *In vitro* Method. Planta Europa Conference III.

- 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.
- Waes, J. van. 1987. Effect Of Activated Charcoal On In Vitro Propagation Of Western European Orchids. *ISHS Acta Horticulturae* 212: Symposium on In Vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants.
- Watkinson, Jonathan I. 2002. Characterization of two genes, trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase and nucleotide binding protein, shown to be differentially regulated in roots of *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* grown with a mycorrhizal fungus *Thanatephorus pennatus*. Chapter 1, Introduction: Biology of orchids and of orchid mycorrhizal interactions Dissertation Ph.D.
- Whitner 1974. *The Orchids*. J.Wiley, New York:1-604.
- Wotavova-Novotna, K., Vejsadova, H., and Kindlmann, P. 2007. Effects of sugars and growth regulators on in vitro growth of *Dactylorhiza* species. *Biologia Plantarum*, 51(1): 198-200.
- Yararbaş, R.T., 2008. Bazı Orkide Türlerinin In Vitro Koşullarda Çoğaltılması, Çiçeklenmesi (doktora tezi). E.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir.
- Zettler, L.W., and McInnis T.M. Jr. 1992. Propagation of *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer, an endangered terrestrial orchid, through symbiotic seed germination. *Lindleyana*. V: 7 (3), p: 154-161.
- Zettler, L.W., and McInnis, T.M. Jr. 1993. Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoidea). *Lindleyana*, 8:155-162.
- Zettler, L.W. 1994. Symbiotic seed germination of *Platanthera integrilabia* (Correll) Luer, an Endangered Terrestrial Orchid. Ph. D. Dissertation, Clemson University, Clemson, SC.
- Zettler, L.W., and McInnis, T.M. Jr. 1994. Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera integrilabia*). *Plant Science (Limerick)*. V: 102 (2), p: 133-138.
- Zettler, L.W., and Hofer, C.J. 1998. Propagation of the little clup-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environmental and Experimental Botany*. V: 39 (3), p: 189-195.
- Zettler, L.W., Sunley, J.A., and Delaney, T.W. 2000. Symbiotic seed germination of an orchid in decline (*Platanthera integra*) from the Green Swamp, North Carolina. *Castanea*. V: 65 (3), p: 207-212.
- Zettler, L.W., Stewart, S.L., Bowles, M.L., and Jacobs, K.A. 2001. Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the Federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. *American Midland Naturalist*. V: 145 (1), p: 168-175.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Cevdet GÜMÜŞ
Doğum Yeri : Karaman/Başköy
Doğum Tarihi : 25.09.1973
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Konya Gazi Lisesi (1990)
Lisans : Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü (1995)
Yüksek Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı (1998)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Bartın Orman Fakültesi	1997-1998
Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Bartın Meslek Yüksekokulu	1998-2008
Bartın Üniversitesi Bartın Meslek Yüksekokulu	2008-

Yayınları

Soylu, A., Akbudak, B., Gümüş, C., Mert, C. 1999. Değişik Uygulamaların “Ichinosa” Dut Çeliklerinin Köklenmesi Üzerine Etkileri.I. Köklendiricilerin Etkileri. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 13, ISSN 1301-3165.

Karakurt, R., Gümüş, C. 1998. Batı Karadeniz Bölgesi Ekolojik Koşullarının Süs Bitkileri Yetiştiriciliği Açısından Değerlendirilmesi. I. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 6-9 Ekim 2002, Yalova.

Gümüş, C., Mengüç, A. 2002. *Alstroemeria* cv. “Vanitiüs”ün Saksı Bitkisi Olarak Yetiştiriciliğinde Bazı Büyüme-yi Düzenleyici Maddelerin Etkisi. II. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 22-24 Ekim 2002, Antalya.

Gümüş, C., Sezik, E., Ellialtıoğlu, ř. 2006. Batı Karadeniz Bölgesinde Yetişen Ve Salep Elde Edilen Bazı Orkide (*Orchidaceae* Sp.) Türlerinin Doku Kültürü İle Çoğaltılması Üzerinde Bir Araştırma. III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 8-10 Kasım 2006, İzmir.

Gümüş, C., Sezik, E., Ellialtıoğlu, ř. 2006. Batı Karadeniz Bölgesinde Yetişen Ve Salep Elde Edilen Orkidelerin (*Orchidaceae* Sp.) Taranarak Tesbiti ve Koleksiyon Parseli Oluşturulması. III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 8-10 Kasım 2006, İzmir.

Gümüş, C., Ellialtıoğlu, ř. 2006. Kum Zambağı (*Pancratium maritimum*)’nın Doku Kültürü İle Çoğaltılma Olanadı Üzerinde Bir Çalışma. III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi, 8-10 Kasım 2006, İzmir.