

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**VAN'DA DOĞAL OLARAK YETİŞEN SALEP ORKİDELERİNİN
SİMBİYOTİK VE ASİMBİYOTİK OLARAK IN VITRO VE IN VIVO
ORTAMLARDA ÇOĞALTILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Arzu ÇİĞ
DANIŞMAN: Prof. Dr. Hüdai YILMAZ

VAN-2012

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**VAN'DA DOĞAL OLARAK YETİŞEN SALEP ORKİDELERİNİN
SİMBİYOTİK VE ASİMBİYOTİK OLARAK IN VITRO VE IN VIVO
ORTAMLARDA ÇOĞALTILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Arzu ÇİĞ

Bu tez Y.Y.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2009-FBE-D036
no'lu proje olarak desteklenmiştir

VAN-2012

KABUL VE ONAY SAYFASI

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Hüdai YILMAZ danışmanlığında, Arzu ÇIĞ tarafından sunulan “**Van'da Doğal Olarak Yetişen Salep Orkidelerinin Simbiyotik ve Asimbiyotik olarak In Vitro ve In Vivo Ortamlarda Çoğaltılması**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 25/12/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

Prof. Dr. M. Ercan ÖZZAMBAK

İmza:

Üye:

Prof. Dr. Hüdai YILMAZ

İmza:

Üye:

Prof. Dr. Semra DEMİR

İmza:

Üye:

Doç. Dr. Fikret YAŞAR

İmza:

Üye:

Yrd. Doç. Dr. Sinan İŞLER

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28/12/2012 gün ve 2012/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖN SÖZ

Doğada yaşamlarını ancak uygun ekolojik koşullarda çimlenerek sağlayabilen, tüm dünyada nesli tükenmekte olan ve zarar gören bitki türleri arasında gösterilen salep orkidelerinin karşılaştığı en büyük sorun, bitkiden elde edilen drogun bilinen tıbbi önemi ile özellikle dondurma ve sıcak içecek sektöründeki ticari değerinden dolayı yapılan aşırı bitki sökümüdür. Engellenemeyen sökümün yerine alternatif üretim ve çoğaltma metodlarının geliştirilmesi amacıyla yumrularla arazide; tohumlarla laboratuvarlarda sürekli yeni teknikler geliştirilmektedir. Yapılan bu çalışma ile salep orkidelerinin in vitro ve in vivo koşullarda simbiyotik ve asimbiyotik olarak çoğaltılması ve tür devamlılığının sağlanması amaçlanmıştır.

Bu çalışmaya başlamadan önce karşılaşılabileceğim tüm zorluklara karşı beni cesaretlendiren ve her konuda yanımda olan hocam Prof. Dr. Hüdai YILMAZ'a; Bitki Koruma Bölümü Mikoloji Laboratuvarının imkânlarını ve desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Semra DEMİR'e; materyal toplamak için her dönem arazi çalışmalarına katılan ve bitki tür teşhislerinde yardımcı olan hocam Yrd. Doç. Dr. Sinan İŞLER'e teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında büyük desteklerini gördüğüm hocalarım Prof. Dr. M. Ercan ÖZZAMBAK ve Doç. Dr. Fikret YAŞAR'a, verilerin istatistik analizlerinin yapılmasında emeği geçen Doç. Dr. Sıddık KESKİN'e; her konudaki desteğinden ve yardımlarından dolayı Yeşil Alan Müdürü Yrd. Doç. Dr. Fazlı ÖZTÜRK'e; fungus izolatlarının teşhisinde yardımcı olan Dr. Emre DEMİRER DURAK'a; fotoğrafların çekilmesinde emekleri geçen Dr. Serhat KARACA ve Uzm. Gülçinay BAŞDOĞAN'a; toprak analizlerinde yardımcı olan Dr. Ferit SÖNMEZ'e, tezimin her aşamasında katkıları olan eşim Dr. Fatih ÇİĞ'a ve her konuda yardımcı olan annem Nadire KÜÇÜKYUMUK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen hocalarıma, arkadaşlarıma ve emeği geçen Zir. Yük. Müh. Özlem KARABULUT DAVRAN ve Zir. Yük. Müh. Nurşen AKGÜL'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Çalışmamıza maddi destek veren Y.Y.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Arzu ÇİĞ

ÖZET

VAN'DA DOĞAL OLARAK YETİŞEN SALEP ORKİDELERİNİN SİMBİYOTİK VE ASİMBİYOTİK OLARAK IN VITRO VE IN VIVO ORTAMLARDA ÇOĞALTILMASI

ÇİĞ, Arzu

Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hüdai YILMAZ

Aralık 2012, 141 sayfa

Bu çalışmada Doğu Anadolu Bölgesi salep orkidesi türlerinden olan *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C.M. Richard, *Dactylorhiza iberica* (Bieb. ex Willd.) Soó, *Dactylorhiza romana* (Seb.) Soó subsp. *georgica* (Klinge) Soó ex Renz & Taub., *Dactylorhiza umbrosa* (Kar. et. Kir.) Soó, *Orchis palustris* Jacquin ve *Ophrys straussii* (Fleischm & Bornm.) Nelson tohumları in vitro ve in vivo koşullarda simbiyotik (YO-yulaf ortamı, MYO-modifiye yulaf ortamı, PDA-potato dekstroze agar) ve asimbiyotik (VWD-Van Waes & Debergh, KC-Knudson-C, MS-Murashige & Skoog, ½ MS ve 1/10 MS ortamı) kültüre alınarak çimlenme, protokorm ve sürgün elde etme amaçlanmıştır. Simbiyotik kültürlerde bitkilerin kendi yumrularından izole edilen *Rhizoctonia solani* ve binükleik *Rhizoctonia* fungusları kullanılmıştır.

Çalışmanın sonucunda in vitro koşullardaki *Rhizoctonia solani* ve PDA kültürleri ile in vivo koşullardaki kültürlerin hiçbirisinden sonuç alınamamıştır. Simbiyotik kültürde sadece *D. iberica*, *D. umbrosa* ve *O. palustris* türlerinde sürgün oluşmuş, ancak yumru ve kök oluşumu sağlanamamıştır. Asimbiyotik kültürde ise oluşan sürgünlerde en yüksek köklenme oranı ½ MS'te gelişen *D. umbrosa* (% 100); en yüksek yumru oluşum oranı VWD'de gelişen *O. straussii* (% 71.03) türlerinde elde edilmiştir. Yeterli büyüklüğe ulaşan köklü ve yumrulu sürgünler viyollere aktarıldıktan bir süre sonra canlılıklarını yitirmişlerdir.

Anahtar kelimeler: Asimbiyotik, Çoğaltma, In vitro, In vivo, Salep orkidesi, Simbiyotik.

ABSTRACT

SYMBIOTIC AND ASYMBIOTIC IN VITRO AND IN VIVO REPRODUCTION OF WILD SALEP ORCHIDS GROWN IN VAN

ÇİĞ, Arzu

Ph. D., Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Hüdai YILMAZ

December 2012, 141 pages

In this study, the germination, protocorm and shoot formation in the seeds of salep orchids (*Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C.M. Richard, *Dactylorhiza iberica* (Bieb. ex Willd.) Soó, *Dactylorhiza romana* (Seb.) Soó subsp. *georgica* (Klinge) Soó ex Renz & Taub., *Dactylorhiza umbrosa* (Kar. et. Kir.) Soó, *Orchis palustris* Jacquin and *Ophrys straussii* (Fleischm & Bornm.) Nelson) grown in the Eastern Anatolia Region were aimed in symbiotic (YO-oat medium, MYO-modified oat medium, and PDA-potato dextrose agar) and asymbiotic (VWD-Van Waes & Debergh, KC Knudson-C, MS-Murashige & Skoog, ½ MS and 1/10 MS medium) in vitro and in vivo reproduction culture conditions. *Rhizoctonia solani* and binucleic *Rhizoctonia* fungi isolated from tubers of those plants were used in symbiotic cultures.

As a result of the present study, there was no successful result obtained from in vitro cultures with *Rhizoctonia solani* and PDA and all in vivo cultures. In symbiotic culture, the shoots were only obtained from *D. iberica*, *D. umbrosa* and *O. palustris* species; however, the tuber and root formations were not achieved in these species. In asymbiotic culture, while the highest rooting rate (100 %) was obtained from *D. umbrosa* species cultured in ½ MS medium, the highest rate of tuber formation (71.03 %) was obtained from *O. straussii* cultured in VWD medium. The rooted and tuberous shoots reached to sufficient size lost their vitality after a while transferring to viols.

Key words: Asymbiotic, Reproduction, In Vitro, In Vivo, Salep Orchid, Symbiotic.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	Sayfa
ABSTRACT	i
ÖN SÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	xxiii
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	1
2.1. Simbiyotik Kültür Çalışmalarında Kullanılan Orkidelere Ait Genel Bilgiler	6
2.2. Asimbiyotik Kültür Çalışmalarında Kullanılan Orkidelere Ait Genel Bilgiler	6
2.3. Orkide Tohumlarıyla İlgili Çimlendirme ve Çoğaltma Çalışmaları	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1. Materyal	27
3.1.1. Orkide türleri	27
3.1.1.1. <i>Anacamptis pyramidalis</i> (L.) L.C.M. Richard	27
3.1.1.2. <i>Dactylorhiza iberica</i> (Bieb. ex Willd.) Soó	29
3.1.1.3. <i>Dactylorhiza romana</i> (Seb.)Soósubsp. <i>georgica</i> (Klinge) Soó ex Renz&Taub	30
3.1.1.4. <i>Dactylorhiza umbrosa</i> (Kar.&Kir.)	31
3.1.1.5. <i>Orchis palustris</i> (Jacquin)	32
3.1.1.6. <i>Ophrys straussii</i> (Fleischm.&Bornm.) Nelson	33
3.1.2. Araştırma yeri hakkında genel bilgiler	34
3.1.2.1. Araştırma yerinin konumu ve iklim özellikleri	34
3.1.2.2. Araştırma yerinin toprak özellikleri	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Tohum, yumru ve rizosfer toprağının toplanarak muhafaza edilmesi	37
3.2.2. Rizosfer toprağının bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi	38
3.2.2.1. Toprak tekstürü	38

3.2.2.2. Toprak reaksiyonu (pH)	38
3.2.2.3. Kireç (%)	38
3.2.2.4. Tuz içeriği (dS/cm)	38
3.2.2.5. Organik madde (%)	39
3.2.2.6. Toplam azot (%)	39
3.2.2.7. Yarıyıllı fosfor (ppm)	39
3.2.2.8. Değişebilir potasyum, kalsiyum ve magnezyum (ppm)	39
3.2.2.9. Toprakta ekstrakte edilebilir mikro elementler (Fe, Mn, Zn ve Cu)	39
3.2.3. Orkide tohumlarının in vitro koşullarda çimlendirilmesi	39
3.2.3.1. Orkide tohumlarının simbiyotik kültür ortamlarında çimlendirilmesi	40
3.2.3.1.1. Fungus izolasyon ortamlarının hazırlanması	40
3.2.3.1.2. Simbiyotik kültür ortamlarının hazırlanması	40
3.2.3.1.2.1. Yulafortamı (YO)	40
3.2.3.1.2.2. Modifiye yulafortamı (MYO)	41
3.2.3.1.2.3. Potato dextrose agar ortamı (PDA)	41
3.2.3.1.3. Fungus izolasyonu için kullanılan yöntemler	42
3.2.3.1.3.1. Şekerpancarı ile tuzaklama yöntemi	42
3.2.3.1.3.2. Toprak kalıntı yöntemi	43
3.2.3.1.3.3. Dökme plaka yöntemi	44
3.2.3.1.3.4. Yumrulardan fungus izolasyonu	45
3.2.3.1.4. Genel sterilizasyon işlemleri	46
3.2.3.1.5. Tohumların yüzey sterilizasyonunun yapılması	46
3.2.3.1.6. Tohumların simbiyotik kültür ortamında ekilmesi	48
3.2.3.2. Orkide tohumlarının asimbiyotik kültür ortamlarında çimlendirilmesi	48
3.2.3.2.1. Asimbiyotik kültür ortamlarının hazırlanması	48
3.2.3.2.2. Genel sterilizasyon işlemleri	49
3.2.3.2.3. Tohumların yüzeysel sterilizasyonunun yapılması	49
3.2.3.2.4. Tohumların asimbiyotik kültür ortamında ekilmesi	50
3.2.3.2.5. Gelişen bitkiciklerin toprağa aktarılması	50
3.2.4. Orkide tohumlarının in vivo koşullarda çimlendirilmesi	51

3.2.4.1. Simbiyotik kültür ortamlarının hazırlanması	51
3.2.4.1.1. <i>Rhizoctonia</i> sp. funguslarının kültür işlemleri	51
3.2.4.1.2. Saksı harcının hazırlanması	51
3.2.4.1.3. Genel sterilizasyon işlemleri	52
3.2.4.1.4. Tohumların yüzey sterilizasyonunun yapılması	52
3.2.4.1.5. Tohumların simbiyotik kültür ortamında ekimi	52
3.2.4.2. Orkide tohumlarının asimbiyotik kültür ortamlarında çimlendirilmesi	53
3.2.4.2.1. Saksı harcının hazırlanması	53
3.2.4.2.2. Genel sterilizasyon işlemleri	53
3.2.4.2.3. Tohumların yüzey sterilizasyonunun yapılması	53
3.2.4.2.4. Tohumların asimbiyotik kültür ortamında ekimi	53
3.2.5. Verilerin değerlendirilmesi	53
3.2.5.1. Sağlam protokorm oranı (%)	55
3.2.5.2. Kararmış protokorm oranı (%)	55
3.2.5.3. Toplam protokorm oranı (%)	55
3.2.5.4. Sağlıklı protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)	55
3.2.5.5. Tüm protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)	55
3.2.5.6. Tohumdan sürgün oluşma oranı (%)	55
3.2.5.7. Sağlıklı protokormdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)	56
3.2.5.8. Tüm protokormdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)	56
3.2.5.9. Tohumdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)	56
3.2.5.10. Tüm protokormdan oluşan köklü sürgün oranı (%)	56
3.2.5.11. Sürgünlerde kök oluşum oranı (%)	56
3.2.5.12. Tüm protokormdan oluşan yumrulu sürgün oranı (%)	56
3.2.5.13. Sürgünlerde oluşan yumru oranı (%)	57
3.2.5.14. Kallus benzeri oluşumların oranı (%)	57
3.2.5.15. Kararmış kallus benzeri oluşumların oranı (%)	57
3.2.5.16. Çimlenme süresi (gün)	57
3.2.5.17. Protokorm oluşum süresi (gün)	57
3.2.5.18. Sürgün oluşum süresi (gün)	57
3.2.5.19. İstatistiki değerlendirmeler	58

4. BULGULAR	59
4.1. Orkide Tohumlarının In Vitro Koşullarda Çimlendirilmesi	59
4.1.1. Simbiyotik çimlenme	59
4.1.1.1. Fungus izolasyonu	59
4.1.1.2. Simbiyotik kültür	61
4.1.1.3. Kararmış protokorm oranı (%)	62
4.1.1.4. Toplam protokorm oranı (%)	64
4.1.1.5. Sağlıklı protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)	67
4.1.1.6. Tüm protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)	69
4.1.1.7. Tohumdan sürgün oluşma oranı (%)	71
4.1.1.8. Protokorm oluşum süresi (gün)	73
4.1.1.9. Sürgün oluşum süresi (gün)	74
4.1.2. Asimbiyotik çimlenme	74
4.1.2.1. Kararmış protokorm oranı (%)	75
4.1.2.2. Toplam protokorm oranı (%)	76
4.1.2.3. Sağlıklı protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)	78
4.1.2.4. Tüm protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)	80
4.1.2.5. Tohumdan sürgün oluşma oranı (%)	83
4.1.2.6. Sağlıklı protokormdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)	84
4.1.2.7. Tüm protokormdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)	85
4.1.2.8. Tohumdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)	86
4.1.2.9. Tüm protokormdan oluşan köklü sürgün oranı (%)	88
4.1.2.10. Sürgünlerde kök oluşum oranı (%)	89
4.1.2.11. Tüm protokormdan oluşan yumrulu sürgün oranı (%)	91
4.1.2.12. Sürgünlerde oluşan yumru oranı (%)	92
4.1.2.13. Kallus benzeri oluşumların oranı (%)	93
4.1.2.14. Kararmış kallus benzeri oluşumların oranı (%)	95
4.1.2.15. Çimlenme süresi (gün)	97
4.1.2.16. Protokorm oluşum süresi (gün)	98
4.1.2.17. Sürgün oluşum süresi (gün)	100
4.1.3. Gelişen bitkiciklerin toprağa aktarılması	101
4.2. Orkide Tohumlarının In Vivo Koşullarda Çimlendirilmesi	103

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	104
5.1. Simbiyotik Kültür Çalışmaları	104
5.2. Asimbiyotik Kültür Çalışmaları	113
5.3. Sonuç	128
KAYNAKLAR	131
ÖZ GEÇMİŞ	141

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. <i>A. pyramidalis</i> bitkisinin genel görünümü.	28
Şekil 3.2. <i>A. pyramidalis</i> bitkisinin çiçeği.	28
Şekil 3.3. <i>D. iberica</i> bitkisinin genel görünümü.	29
Şekil 3.4. <i>D. iberica</i> bitkisinin çiçeği.	29
Şekil 3.5. <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> bitkisinin genel görünümü.	30
Şekil 3.6. <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> bitkisinin çiçeği.	30
Şekil 3.7. <i>D. umbrosa</i> bitkisinin genel görünümü.	31
Şekil 3.8. <i>D. umbrosa</i> bitkisinin çiçeği.	31
Şekil 3.9. <i>O. palustris</i> bitkisinin genel görünümü.	32
Şekil 3.10. <i>O. palustris</i> bitkisinin çiçeği.	32
Şekil 3.11. <i>O. straussii</i> bitkisinin genel görünümü.	33
Şekil 3.12. <i>O. straussii</i> bitkisinin çiçeği.	33
Şekil 3.13. Tohum, yumru ve rizosfer toprağı toplanan orkidelerin lokasyonları.	35
Şekil 3.14. Dağlık alanlarda belirlenen orkidelerin lokasyonları.	35
Şekil 3.15. Çayrılık alandan materyal toplanması.	37
Şekil 3.16. Dağlık alandan materyal toplanması.	37
Şekil 3.17. Yumru örneğinin alınışı.	42
Şekil 3.18. Rizosfer toprak örneğinin alınışı.	42
Şekil 3.19. Şekerpancarı tohumlarının su agar petrilere ekimi.	43
Şekil 3.20. Şekerpancarı tohumları etrafındaki fungal gelişim.	43
Şekil 3.21. Organik artıkların besi ortamlarına karıştırılması.	44
Şekil 3.22. Organik artıklar üzerindeki fungal gelişim.	44
Şekil 3.23. 10^1 'lik dilusyonda oluşan fungal gelişim.	45
Şekil 3.24. 10^4 'lük dilusyonda oluşan fungal gelişim.	45
Şekil 3.25. Yumru eksplantlarının sterilizasyonu.	45
Şekil 3.26. Yumru eksplantlarının besi yerlerine dikimi.	45
Şekil 3.27. Tohumların paketlenmesi.	47
Şekil 3.28. Tohumların sterilizasyonu.	47
Şekil 3.29. Tohumların ekilmesi.	47
Şekil 3.30. Kavanozdan çıkarılan bitki.	51

Şekil 3.31. Köklerin sterilizasyonu.	51
Şekil 3.32. Bitkiciğin dikim harcına dikilmesi.	51
Şekil 3.33. Steromikroskop altında tohum (10X).	54
Şekil 3.34. Steromikroskop altında çimlenme (10X).	54
Şekil 3.35. Steromikroskop altında protokorm (4X).	54
Şekil 3.36. Besi ortamında protokorm gelişimi.	54
Şekil 3.37. Sürgün gelişimi.	54
Şekil 3.38. Köklü ve yumrulu sürgün gelişimi.	54
Şekil 4.1. <i>Rhizoctonia solani</i> ve elde edildiği <i>Dactylorhiza umbrosa</i> türüne ait yumru.	60
Şekil 4.2. Binükleuslu <i>Rhizoctonia</i> ve elde edildiği <i>Orchis palustris</i> türüne ait yumru.	60
Şekil 4.3. R+MYO kültür ortamındaki <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> tohumları.	61
Şekil 4.4. R+MYO kültür ortamındaki <i>A. pyramidalis</i> tohumları.	61
Şekil 4.5. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> protokormlarının kararması üzerine etkisi (%).	62
Şekil 4.6. 2R+YO kültür ortamındaki <i>O. palustris</i> türüne ait kararmış protokormlar.	63
Şekil 4.7. 2R+MYO kültür ortamındaki <i>D. umbrosa</i> türüne ait kararmış protokormlar.	63
Şekil 4.8. Tohum ekilen R+PDA kültür ortamı.	64
Şekil 4.9. Tohum ekilen 2R+PDA kültür ortamı.	64
Şekil 4.10. Tohum ekilen R+YO kültür ortamı.	65
Şekil 4.11. Tohum ekilen R+MYO kültür ortamı.	65
Şekil 4.12. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin toplam protokorm oluşumu üzerine etkisi (%).	66
Şekil 4.13. 2R+MYO kültür ortamındaki <i>D. umbrosa</i> protokormları.	66
Şekil 4.14. 2R+MYO kültür ortamındaki <i>O. palustris</i> protokormları.	66
Şekil 4.15. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin sağlıklı protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%).	68
Şekil 4.16. 2R+YO kültür ortamındaki <i>O. palustris</i> türüne ait sürgünler.	68
Şekil 4.17. 2R+MYO kültür ortamındaki <i>O. palustris</i> türüne ait sürgünler.	68
Şekil 4.18. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin tüm protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%).	69
Şekil 4.19. 2R+MYO kültür ortamındaki <i>D. umbrosa</i> türüne ait sürgünler.	70
Şekil 4.20. 2R+YO kültür ortamındaki <i>D. iberica</i> türüne ait sürgünler.	70

Şekil 4.21. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin tohumdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%).	72
Şekil 4.22. 2R+YO kültür ortamındaki <i>D. umbrosa</i> türüne ait sürgünler.	72
Şekil 4.23. 2R+YO kültür ortamındaki <i>O. palustris</i> türüne ait sürgünler.	72
Şekil 4.24. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin protokorm oluşum süresine etkisi (gün).	73
Şekil 4.25. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin sürgün oluşum süresine etkisi (gün).	74
Şekil 4.26. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin protokorm kararmasına etkisi (%).	75
Şekil 4.27. ½ MS içindeki <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> türüne ait kararmış protokormlar.	76
Şekil 4.28. VWD içindeki <i>D. umbrosa</i> türüne ait kararmış protokormlar.	76
Şekil 4.29. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin toplam protokorm oranına etkisi (%).	78
Şekil 4.30. VWD içindeki <i>D. iberica</i> türüne ait protokormlar.	78
Şekil 4.31. ½ MS içindeki <i>D. umbrosa</i> türüne ait protokormlar.	78
Şekil 4.32. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin sağlıklı protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%).	79
Şekil 4.33. 1/10 MS içindeki <i>O. palustris</i> türüne ait sağlıklı protokormlardan oluşan sürgünler.	80
Şekil 4.34. VWD içindeki <i>D. iberica</i> türüne ait sağlıklı protokormlardan oluşan sürgünler.	80
Şekil 4.35. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tüm protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%).	82
Şekil 4.36. 1/10 MS içindeki <i>O. straussii</i> protokormlarına ait sürgünler.	82
Şekil 4.37. KC içindeki <i>D. iberica</i> protokormlarına ait sürgünler.	82

Şekil 4.38. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tohumdan sürgün oluşum oranına etkisi (%).	83
Şekil 4.39. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin sağlıklı protokormdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%).	85
Şekil 4.40. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tüm protokormdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%).	86
Şekil 4.41. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tohumdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%).	87
Şekil 4.42. KC içindeki <i>D. iberica</i> tohumuna ait kararmış sürgünler.	87
Şekil 4.43. VWD içindeki <i>O. straussii</i> tohumuna ait kararmış sürgünler.	87
Şekil 4.44. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tüm protokormdan oluşan sürgün oranına etkisi (%).	88
Şekil 4.45. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin sürgünlerinden kök oluşum oranına etkisi (%).	90
Şekil 4.46. VWD içindeki <i>D. umbrosa</i> türüne ait köklü sürgünler.	90
Şekil 4.47. VWD içindeki <i>O. straussii</i> türüne ait köklü sürgünler.	90
Şekil 4.48. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tüm protokormdan yumrulu sürgün oluşturma oranına etkisi (%).	91
Şekil 4.49. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin sürgünlerinden yumru oluşturma oranına etkisi (%).	92
Şekil 4.50. VWD içindeki <i>D. umbrosa</i> türüne ait yumrulu sürgünler.	93
Şekil 4.51. VWD içindeki <i>O. straussii</i> türüne ait yumrulu sürgünler.	93

Şekil 4.52. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin kallus benzeri oluşumlar üzerine etkisi (%).	94
Şekil 4.53. MS içindeki <i>D. umbrosa</i> türüne ait kallus benzeri oluşum.	95
Şekil 4.54. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin kararan kallus benzeri oluşumların oranı üzerine etkisi (%).	96
Şekil 4.55. 1/10 MS içindeki <i>A. pyramidalis</i> türüne ait kararmış kallus benzeri yapılar.	96
Şekil 4.56. 1/2 MS içindeki <i>D. umbrosa</i> türüne ait kararmış kallus benzeri yapılar.	97
Şekil 4.57. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> tohumlarının çimlenme süresi üzerine etkisi (gün).	98
Şekil 4.58. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> tohumlarının protomkorm oluşturma süreleri üzerine etkisi (gün).	99
Şekil 4.59. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> tohumlarının sürgün oluşturma süreleri üzerine etkisi (gün).	101
Şekil 4.60. <i>O. straussii</i> türüne ait bitkicikler.	101
Şekil 4.61. <i>D. umbrosa</i> türüne ait bitkicikler.	102
Şekil 4.62. Bitkiciğin dikim öncesi sterilizasyonu.	102
Şekil 4.63. Bitkiciğin viyole dikilmesi.	102
Şekil 4.64. Bitkiciklerin viyolde isimlendirilmesi.	102
Şekil 4.65. Bitkiciklerin genel görünümü.	102
Şekil 4.66. In vivoda simbiyotik kültürler.	103
Şekil 4.67. In vivoda asimbiyotik kültürler.	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Araştırma materyalinin toplandığı bölgelerin koordinatları	34
Çizelge 3.2. Van ilinde uzun yıllar ortalaması, 2008-2009 ve 2009-2010 yılı vejetasyon dönemine ait bazı iklim verileri	36
Çizelge 3.3. Orkidelerin rizosfer topraklarına ait bazı fiziksel özellikler	36
Çizelge 3.4. Orkidelerin rizosfer topraklarına ait bazı kimyasal özellikler	36
Çizelge 3.5. Fungus izolasyonu için kullanılan besi ortamları	40
Çizelge 3.6. Yulaf ortamı (YO) içinde yer alan maddeler ve miktarları	41
Çizelge 3.7. Modifiye yulaf ortamı (MYO) içinde yer alan maddeler ve miktarları	41
Çizelge 3.8. Asimbiyotik kültür ortamlarında (VWD, KC, MS) yer alan maddeler ve miktarları	49
Çizelge 4.1. Yumru ve rizosfer toprağında farklı yöntemlerle elde edilen funguslar	59
Çizelge 4.2. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> protokormlarının kararması üzerine etkisi (%)	62
Çizelge 4.3. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin toplam protokorm oluşumu üzerine etkisi (%)	65
Çizelge 4.4. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin sağlıklı protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%)	67
Çizelge 4.5. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin tüm protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%)	69
Çizelge 4.6. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin tohumdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%)	71
Çizelge 4.7. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin protokorm oluşum süresine etkisi (gün)	73
Çizelge 4.8. Besi ortamlarının <i>D. iberica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> türlerinin sürgün oluşum süresine etkisi (gün)	74
Çizelge 4.9. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin protokorm kararmasına etkisi (%)	75

Çizelge 4.10. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin toplam protokorm oranına etkisi (%)	77
Çizelge 4.11. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin sağlıklı protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%)	79
Çizelge 4.12. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tüm protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%)	81
Çizelge 4.13. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tohumdan sürgün oluşum oranına etkisi (%)	83
Çizelge 4.14. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin sağlıklı protokormdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%)	84
Çizelge 4.15. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tüm protokormdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%)	86
Çizelge 4.16. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tohumdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%)	87
Çizelge 4.17. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tüm protokormdan oluşan sürgün oranına etkisi (%)	88
Çizelge 4.18. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin sürgünlerinden kök oluşum oranına etkisi (%)	89
Çizelge 4.19. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin tüm protokormdan yumrulu sürgün oluşturma oranına etkisi (%)	91

Çizelge 4.20. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin sürgünlerinden yumru oluşturma oranına etkisi (%)	92
Çizelge 4.21. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin kallus benzeri oluşumlar üzerine etkisi (%)	94
Çizelge 4.22. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> türlerinin kararan kallus benzeri oluşumların oranı üzerine etkisi (%)	96
Çizelge 4.23. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> tohumlarının çimlenme süresi üzerine etkisi (gün)	98
Çizelge 4.24. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> tohumlarının protomkorm oluşturma süreleri üzerine etkisi (gün)	99
Çizelge 4.25. Besi ortamının <i>A. pyramidalis</i> , <i>D. iberica</i> , <i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. straussii</i> tohumlarının sürgün oluşturma süreleri üzerine etkisi (gün)	100

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
⁰ C	Santigrad derece
Ca	Kalsiyum
CaO(Cl) ₂	Kalsiyum hipoklorit
cm	Santimetre
Cu	Bakır
K	Potasyum
Fe	Demir
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
kg	Kilogram
lt	Litre
m	Metre
M	Molar
mg	Miligram
Mg	Magnezyum
ml	Mililitre
mm	Milimetre
Mn	Mangan
Na	Sodyum
N	Azot
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NaOH	Sodyum hidroksit
NH ₄	Amonyum
NH ₄ NO ₃	Amonyum nitrat
NO ₃	Nitrat
P	Fosfor

Kısaltmalar

2R	Binükleik <i>Rhizoctonia</i>
DBE	Doğal bitki ekstraktı
GA ₃	Giberellic asit
GPS	Global Positioning System
IAA	Indol asetik asit
IBA	Indol butirik asit
KC	Knudson-C ortamı
MS	Murashige & Skoog ortamı
NAA	Naftelin asetik asit
OM	Organik madde
ppm	Milyonda bir parça (parts per million)
R	<i>Rhizoctonia solani</i>
SE	Salep ekstraktı
DE	Domates ekstraktı
AK	Aktif kömür
AC	Aktif karbon
PE	Patetes ekstraktı
UTM	Universal transverse mercator
UYO	Uzun yıllar ortalaması
VWD	Van Waes-Debergh ortamı
YO	Yulaf ortamı
MYO	Modifiye yulaf ortamı
PDA	Potato dextrose agar

1. GİRİŞ

Tür sayısı bakımından çiçekli bitkilerin en geniş familyalarından biri olan *Orchidaceae* familyasının dünya üzerinde yaklaşık 600-800 cins ve 30-35.000 kadar türü varken (Özkoç, 1991; Aytaş, 1994), son yapılan araştırmalara göre familyaya 9 cinse ait 46 türün daha katıldığı bildirilmiştir (Kreutz, 2000). Yurdumuzda ise % 13'ü endemik olmak üzere, toplam 150 adet orkide türü belirlenirken (Erdem, 2004); bu miktarın içinde kalan ve salep elde edilen 117 adet orkide türünün bulunduğu (Sezik, 2002); Van ve çevresinde 36 adet orkide türünün doğal olarak yetiştiği bildirilmektedir (İşler, 2005). Orkide türleri arasında epifit olanlar şişkinleşmiş kökleri ile tropik ormanlarda ağaçlar üzerinde yaşamaktadır. Ilıman kuşak veya karasal orkideler olarak bilinen türlerin ise toprak altı organları yumru (tuber), kök ve rizom olarak farklılık göstermektedir. Yumrulu bitkilerin genellikle birbirine yapışık ve iki adet olarak bulunduğu, bitki geliştikçe yeni yumrunun da geliştiği ve yeni bitkinin çiçekli haldeyken kazılıp toplanarak salep elde edildiği belirtilmektedir (Sezik, 1984). Orkide türlerinde çimlenmeden sonra yaprak ve yumru oluşumunun uzun yıllar aldığı ve en kısa ortalamanın 2-4 yıl olduğu bildirilmiş olup; ilk yaprak oluşumunun *Orchis*, *Ophrys*, *Dactylorhiza* ve *Listera* türlerinde ortalama 4 yıl; *Epipactis* ve *Cephalanthera* türlerinde 2-3 yıl, ilk yumrunun *Spiranthes aestivalis* türünde 9 yıl, ilk çiçeğin *Neottia* türlerinde 9-12 yılda meydana geldiği ortaya koyulmuştur (Sezik, 1984).

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

Salebin etkili maddesi olan glikomannan süt ya da su ile şişerek akıcı bir çözelti meydana getirir. Bu sayede salep soğuk kış günlerinin vazgeçilmez içeceği olmuştur. Bunun yanında salep, meşhur Maraş dondurmasının içine katılarak geç erime ve sertlik özelliklerini kazandırmaktadır. Salebin bu türlü kullanımlarının yanında tıbbi önemi de vardır. İbn-i Sina'nın salebin balgam sökücü ve iştah açıcı, felç giderici ve afrodizyak olarak kullanılmasını tavsiye ettiği bildirilmektedir (Sezik, 1984). Ancak, günümüzde esas olarak bu amaçlarla kullanılmayan salep, içecek olarak tüketilmekte ve dondurmanın yapısına girerek ekonomik değer kazanmaktadır. Bu kadar faydalı ve ticari önemi olan salebi elde etmek için önüne geçilemeyen müthiş bir söküm vardır. Salep yumrulu orkidelerden, daha çok *Anacamptis*, *Orchis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Himantoglossum*, *Barlia* gibi ovoit yumrulu olanlarla *Dactylorhiza* gibi parçalı yumruların bazı türlerinden elde edilmektedir. Toplanan her yumru ile bir sonraki yıl meydana gelecek bitki ve bu bitkinin üreteceği çok sayıdaki tohumun meydana gelmesi engellenmiş olmaktadır. Sezik'e (1984) göre yumrular taze iken 2-7 gram ağırlığındadır. Ortalama 4 gram olarak düşünülürse 1 kg taze yumru için 250 kadar orkidenin sökülmesi gerekmektedir. Bir salep toplayıcısı normalde günde 1 kg kadar taze yumru toplayabilmektedir. 1 kg salep üretmek için yaklaşık 1000-4000 yumruya gerek vardır.

İşler (2005), sökümü Van'da yapılan kurutulmuş dağ salebinin kilosunun 100 ₺, çayır salebinin ise 25 ₺'den satıldığını; bu sökümün çayır salebi elde edilen orkide türlerine nazaran özellikle dağlık bölgelerde toplanan yumrulu orkideleri tehlikeye soktuğunu bildirmektedir. Bu acımasız kazancın durdurulmasıyla ilgili ülkemizde yasalar olmasına rağmen uygulanmamaktadır. Tekinşen'e (2006) göre Türkiye'de üretilen 35-65 ton miktarındaki salebin 15-20 ton kadarı çoğunlukla toz şeklinde yurtdışına çıkarılmakta, yaklaşık 50 ton kadar salep tane ya da toz halinde yurtdışından Türkiye'ye getirilmektedir. 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 (The Convention on International Trade In Endangered Species of Wild Fauna and Flora- CITES) hükümlerine uyarlanmış olup, yine Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın, Doğal Çiçek Soğanlarının 2006 yılı İhracat Listesi Hakkındaki 2005/44 No'lu tebliğinde numaraları belirtilen *Orchidaceae* (salep) türlerinin yumru ve droglarında (toz, tablet) ve her türlü formdaki ihracatının

yasak olduğunu belirten hükmü bulunmaktadır (Anonim, 2007a). Buna rağmen salep elde etmek amacıyla her yıl milyonlarca orkide tahrip edilmektedir.

Türkiye'deki bu nadir bitkiler büyük tehlike altında, hatta soyu tükenme tehlikesi ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu tehlikenin nedenlerinden biri hızlı büyüyen yapılaşma ve doğal alanların tahribidir. Düzensiz şehirleşme, tarla alanlarını kazanmak için ormanlık ve sulak alanların bozulması ve aşırı otlatma orkidelerin varlığını tehdit etmektedir. Bütün dünyada orkideler tehlike altında olan ve korunması gereken bitkiler olarak kabul edilmektedir. Salep elde edilen orkidelerin ise durumları daha vahimdir. Yumruları sürekli sökülen orkideler bir türlü tohum oluşturmamaktadır. Oluşan tohumların ise çimlenebilmeleri ise oldukça zordur. Sezik'e (1984) göre yüksek rakıma sahip bölgelerde yetişen orkideler bazen düşük ısıdan dolayı gelişmesini tamamlayıp tohum bağlayamamaktadır. Ya da sık orman altındaki orkidelerde ışık eksikliğinden dolayı hayat olayları çok yavaş ilerlemekte ve bitkiler istenen gelişmişlik düzeyine ulaşamamaktadır. Orkide tohumlarının en önemli özellikleri oldukça küçük olmaları, tohumda endospermin bulunmayışı ve embriyonun gelişmemiş durumda olmasıdır. Bu tohumlar 0.25-1.2 mm uzunluğunda ve 0.09-0.27 mm genişliğinde olup; 0.3-1.4 mg ağırlığındadır (Arditti, 1967). Mitchell'e (1989) göre orkideler tüm çiçekli bitkiler içinde tohumları en küçük olan türlerdir. Smreciu ve Currah (1989) ise küçük olan bu tohumların testalarının ince olduğunu; gevşek ve şeffaf bir hücre tabakasından oluştuğunu ve çok küçük embriyolara sahip olduğunu bildirmiştir. Son derece küçük olan ve endosperm taşımayan orkide tohumlarının çimlenebilmesi için düştüğü yerin mikro iklimasının uygun ısı, ışık, oksijen, nem ve toprak şartlarına sahip olması gerekmektedir. Çoğalma kapasiteleri son derece sınırlı olan ve endosperm taşımayan salep orkide tohumlarının çimlenebilmesi için uygun sıcaklık, ışık, nem ve oksijenin yanı sıra, ortamda uygun bir mikorizal fungus ile mikorizal bir ilişki oluşturabilme gereği bulunmaktadır (Sezik, 1984). Çünkü orkide tohumlarının besin rezervleri içermemelerinden dolayı, glikoz gibi dışarıdan bir karbonhidrat kaynağı sağlanmadıkça başarılı bir çimlenme gerçekleşmediği belirtilmektedir (Ingold ve Hudson, 1993). Andersen ve Rasmussen (1996), tüm orkidelerin zorunlu mikorizal bitki olduğunu ve birlikteliklerinin çoğunlukla *Rhizoctonia* sp. ile gerçekleştiğini ve bu birlikteliğin türe has olmadığını, değişik orkide türleri ile aynı *Rhizoctonia* türünün enfekte olabildiğini bildirmişlerdir. Yeşil yapraklı orkidelerde bu bağımlılık fide dönemi ve çimlenmeyle

sınırlandırılabilirken, klorofile ihtiyaç duyan orkidelerde (*Corallorhiza* sp. ve *Neottia* sp.) bu bağımlılık orkidenin tüm yaşamı boyunca devam etmektedir. Bu tip orkidelerin bağımlı olduğu funguslar *Rhizoctonia*, *Epulorrhiza* ya da *Ceratorhiza* cinslerine ait olabilir. Bu ortaklıktaki ilgili fungus, genellikle *Sterile mycelia*'nın bir cinsi olan *Rhizoctonia* cinsinin değişik türleridir. *Rhizoctonia* cinsine dâhil türlerin çoğu toprakta serbest yaşayan, rekabetçi saprofitler olarak bilinmektedir. Ayrıca bu türlerin birçoğunun diğer konukçularda (saldırgan) nekrotrofik parazitler olduğu gösterilmiştir (Ingold ve Hudson, 1993). Sezik (1984), fungusun önce orkide tohumuna parazit yaşamak üzere enfekte olduğunu, kısa bir süre sonra fungusun tohum hücreleri tarafından durdurulduğunu, asimile edildiğini ve bir denge kurulduğunu bildirmiştir. Bu simbiyotik yaşamda, bahar ve yaz mevsiminde orkide tohumuna ait hücreler; sonbahar ve kış aylarında ise fungus hücreleri baskındır. Orkide türleri ve mikorizal funguslar arasında kendilerine has çok özel bir ilişki bulunup bulunmadığı konusunda alınan sonuçlar, bu özel ilişkinin tür-tür seviyesinde çok sıkı olmadığı gibi, orkide-fungus ilişkilerinin tamamen rastgele olmadığını da göstermekte, bununla birlikte simbiyotik kültürlerde kullanılan fungal izolatların etkisiz durumdan en etkili oldukları duruma kadar oldukça fazla değişiklik gösterebildiğini işaret etmektedir. Doğada var olan bu beraberlik laboratuvar koşullarına taşınmak istendiğinde; fungal izolatlar orkidenin yumru, kök ve kök bölgesi toprağından (rizosfer) elde edilerek çalışılmaktadır. Bir fungal izolatın simbiyotik kapasitesi öncelikle izolatın niteliğine, sonra da onun ortaklaşa yaşadığı orkideye bağlıdır (Tsutsui ve Tomita, 1988). Uygun bir habitatta bulunan orkide tohumları arasında yalnızca bir kısmının uygun *Rhizoctonia* türü ile karşılaşırsa çimlenmenin olabileceği; fungusun inokulum potansiyelinin yüksek olması halinde fidenin parazitlenerek ölebileceği, diğer şekillerde ise fidenin savunma reaksiyonunun çok güçlü olmasından dolayı infeksiyon girişiminin bitki tarafından reddedilebileceği bildirilmiştir (Garrett, 1981; Hudson, 1986).

Ülkemizde yok olma tehlikesi ile karşı karşıya bulunan orkideler üzerinde, laboratuvar koşullarında in vitroda, simbiyotik (mikorizal fungus ile) ve asimbiyotik (mikorizal fungus olmaksızın) kültür ortamlarında çimlenme ve fide durumuna getirerek araziye aktarma konusunda yapılan çalışmalar halen sürdürülmektedir. Chang ve ark. (2005), genel olarak, laboratuvar koşullarında ve uygun besli ortamlarında epifit orkide

tohumlarının kısmen kolay, ılıman bölgeleden elde edilen karasal orkide tohumlarının ise oldukça güç çimlendiğine dikkat çekmiştir.

Bu çalışmada, kontrolsüz söküm nedeniyle kaybolma tehdidi altında bulunan Van salebi orkidelerinin çimlendirilerek çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu amaçla nesilleri her geçen gün daha da çok tehlike altına giren Van salebi orkideleri kontrollü koşullarda in vitro ortamlarda simbiyotik ve asimbiyotik olarak çimlendirilmiş olup; köklü ve yumrulu bitkicik haline gelmiştir.

Çalışılan bitki türleri *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C.M. Richard, *Dactylorhiza iberica* (Bieb. ex Willd.) Soó, *Dactylorhiza romana* (Seb.) Soó subsp. *georgica* (Klinge) Soó ex Renz & Taub., *Dactylorhiza umbrosa* (Kar. et Kir.) Soó, *Orchis palustris* (Jacquin), *Ophrys straussii* (Fleischm. & Bornm.) Nelson olarak belirlenmiştir. Koyuncu ve ark. (1999), Van ve civarındaki orkideleri tehlike sınıflarında belirlerken çalışmamıza konu olan *D. umbrosa* ve *O. palustris* bitkilerini tehlikede olmayan bitkiler grubuna dâhil etmiştir. İşler (2005) ise Van civarı orkidelerini tayin eden çalışmasında bitkilere tehlike kategorilerinde yer verirken; *A. pyramidalis* türünü tehlike sınıfında; *D. iberica* türünü tehdit altına girebilir sınıfında; *D. romana* subsp. *georgica* ve *O. straussii* türlerini çok tehlike sınıfında; *D. umbrosa* türünü en az endişe verici sınıfında; *O. palustris* türünü ise zarar görebilir sınıfında göstererek bu orkidelerin salep elde edilmesi amacı ile ne kadar risk altında olduklarına dikkat çekmiştir. Araştırmacı Van'da çayır salebi elde edilişinde *O. palustris*, *D. umbrosa* ve *D. iberica*; dağ salebi elde edilişinde ise *A. pyramidalis*, *O. straussii* ve *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* orkidelerinin kullanıldığını bildirmektedir. Türleri ait tohumların simbiyotik olarak çimlendirilmesinde bitkilerin yumruları ve rizosfer topraklarından elde edilen *Rhizoctonia* sp. izolatları kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda asimbiyotik ve simbiyotik olarak çimlendirilen orkide türlerinin farklı besi ortamlarındaki gelişimleri belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

2.1. Simbiyotik Kùltür Çalışmalarında Kullanılan Orkidelere Ait Genel Bilgiler

Bernard (1909), orkide ve fungus arasındaki simbiyotik ilişkinin tùrlere göre özel olduğunu belirtirken, diğer araştırıcılar mikorizal bir fungus ve bir orkide tùrù arasında böyle bir özel konumun bulunmadığını bildirmişlerdir (Burgeff, 1936; Curtis, 1939).

Curtis'e (1939) göre Bernard 1899 yılında, *Neottia nidus-avis* (L.) L.C. Richard fidelelerinin kùklerinde mikrofungusları tespit etmiş ve orkide tohumları bu fungusların yardımıyla çimlenmiştir. Araştırıcı tarafından orkide habitatları ile fungus tùrleri arasında ekolojik özgülüğün olabileceği bildirilmiştir.

Knudson (1929), orkide tohumlarının çimlenmesini, fungusların azot, nişasta ve peritosan maddelerini parçalamasına ve büyümeyi teşvik eden maddeleri üretmesine bağlamıştır.

Arditti (1967), orkide tohumlarına ait embriyoların farklılaşmamış 80-100 hücreden meydana geldiğini ve endosperm içermediğini bildirmiştir. Orkide kùklerinden izole edilen fungusların *Rhizoctonia*, *Corticum*, *Armillaria*, *Fomes*, *Hymenochaeta* olduğu tespit edilmiş; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phytophthora* ve *Trichoderma* cinslerinin çimlenmeyi başlatıcı ve teşvik edici oldukları bildirilmiştir. Orkide mikorizalarını oluşturan funguslar *Basidiomycota* şubesine dahildirler. Bu funguslar *Ceratobasidium* (*Rhizoctonia*), *Sebacina*, *Tulasnella* ve *Russula* tùrlerini içeren takım içinde yer almaktadırlar. Bazı orkideler saprofit ya da patojenik funguslarla ilişkiliyken, bazıları ise ektomikorizal fungus tùrleri ile ilgilidirler (Anonim, 2007b).

Harvais ve Hadley (1967a), *Orchis purpurella* ve İngiltere'ye ait diğer orkidelerin kùk endofitlerinden izolasyon yapmış olup, *Rhizoctonia* fungusunun çeşitli ırkları ve başka fungusları tespit etmişlerdir. Yaygın olarak bir orkide endofiti olan *R. repens* habitatlarda ve çeşitli konukçu tùrlerde ortaya çıkarken; *R. solani* yaygın olarak görülmeyip sadece *O. purpurella* ve bazı durumlarda *Coeloglossum viride*'den elde edilmiştir. Yapılan simbiyotik testlerde kùklerden elde edilen izolasyonların genellikle protokormlara bulaştığı, fakat bitkinin yetiştiği orijin alanlarda tùrlerin büyümesini her

zaman teşvik etmediği ortaya çıkmıştır. *O. purpurella* bitkisine ait protokormlar için uyarıcı olarak topraktan *R. solani*'ye ait dört ırk elde edilmiştir. Mikroskopik incelemeler orkidelerin genelinde olduğu gibi yeni *O. purpurella* bitkisinde de, oluşma anında kökler henüz bulaşmamışken yumru ve saplarının da bulaşmadığını ortaya çıkarmıştır. Bulaşma; yumru kökleri 3 cm, gövde kökleri 1-2 cm uzunluğa ulaşınca meydana gelmiştir. Köklerin izolasyonu sonucu 420 adet izolat elde edilmiş olup bunların büyük çoğunluğunu *R. repens* oluşturmuşken, *R. solani* beklenenin aksine nadir olarak çok az bitkide bulunmuştur. Bu çalışmada izolasyon tekniğinin önemi vurgulanmıştır. Chesters (1949), dilüsyon plate yönteminin *Rhizoctonia*'nın topraktan izolasyonu için uygun olmadığına dikkat çekmiştir. Önemli olan bir başka nokta *R. solani*'nin geniş sıcaklık ve nem aralığına toleranslı olmasıdır.

Hadley (1970), 10 *Rhizoctonia* türü ile 10 ılıman ve tropikal orkide türünü kullanarak bir orkide türüne ait tohumların birden fazla fungus ile çimlendiğini ve bir fungusun birden çok orkide türünde simbiyotik çimlenmeyi başlattığını bulmuş olup iki simbiyot arasındaki ilişkinin özel olmadığına karar vermiştir.

Karaca'ya (1974) göre *Fusarium*'un patojenitesi hakkında verilen bilgiler arasında orkidenin fide döneminde *Fusarium* ile birlikte *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* ve *Phyhtium* da bulunabilmekte, bunların arasında en süratli ve kolay gelişen *Fusarium*, diğer türlerin varlık ya da yokluğu hakkında bizleri yanıltabilmektedir.

Papavizas ve ark. (1975), iki yıldan fazla bir süre içinde *Rhizoctonia solani*'nin ekolojisini çalışmışlar ve en yüksek bulaşma yoğunluğunun şekerpancarı tohumlarının ekildiği alanda, toprağın 10 cm'lik yüzeyinde ve ağustos-eylül ayları; en düşük bulaşmanın ise fasulye yetiştirilen alanda ve şubat-haziran ayları arasında olduğunu bulmuşlardır. Denemelerdeki *Rhizoctonia* kolonizasyonunun total inorganik N ve $\text{NH}_4\text{-N}$ ile ilişkili olduğu bulunurken, $\text{NO}_3\text{-N}$ ile bağının olmadığı tespit edilmiştir. Çıkan bir başka sonuç ise saprofitik aktivitenin yıldan yıla değiştiği, kolonizasyonun bir yılda % 45 kadar iken iki yıl sonra % 20'lere düşebildiğidir. Ayrıca farklı sıcaklıkların da *Rhizoctonia solani*'nin yaşamı üzerine etkisi araştırılmış olup, fungusun 5°C (hatta -5°C) gibi düşük sıcaklıklarda ve 25-30°C gibi yüksek sıcaklıklarda yaşayabileceği ortaya koyulmuştur.

Clements ve Ellyard (1979), orkide tohumlarının in vitroda çimlendirilmesinde besin ortamı içeriğinin simbiyotik kültür denemelerindeki etkisinin önemli olduğunu bildirmiş olup, öncelikle en etkili *Rhizoctonia* izolatının elde edilmesi ve izolat için en uygun ortamın hazırlanmasını önermiştir. Buna dayanarak bazı fungusların yüksek besin ortamında orkide tohumlarını ya hiç geliştirmedeği ya da çok az etkilediği söylenmiş olup; parazitik durumun kontrolü için en uygun ortamın katkı maddeli yulaf ortamı olduğu belirtilmiştir (Hadley, 1983; Tsutsui ve Tomita, 1986).

Sezik'e (1984) göre orkide tohumlarının hem çok küçük oluşu hem de endosperm içermeyişi nedeni ile tohumların çimlenebilmesi için düştükleri yerin çok uygun koşullarda olması gerekmektedir. Ancak endosperme sahip olmayan orkide tohumlarının dışarıdan bir karbonhidrat kaynağı olmadan çimlenme kapasitesinde olmadığı, bu nedenle çimlenmenin olabilmesi için uygun çevre şartlarının yanı sıra ortamda uygun bir fungusun tohuma bulaştırılması gerektiği bildirilmiştir. Orkide tohumlarının çimlenmesinde mikorizal fungusların etkisinin 1899 yılına kadar anlaşılamadığı ancak bu tarihte Noel Bernard'ın orkide tohumlarını in vitro şartlarda simbiyotik olarak çimlendirmeyi başardığı bildirilmektedir.

Clements ve ark. (1986), Avrupa'daki ılıman kuşak orkidelerinin simbiyotik olarak çimlenmesi ile ilgili yaptıkları çalışmada *Dactylorhiza* cinsine ait türlere *Ceratobasidium* benzeri fungusların, *Orchis*, *Ophrys* ve *Serapias* orkide cinsi bitkilere ise *Tulasnella* benzeri fungusların etkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılara göre in vitro çalışmalarda orkide tohumunun *Rhizoctonia* fungusu ile birlikteliğinde kullanılan simbiyotik kültür ortamına eklenen öğütülmüş yulaf miktarı, orkide tohumu çimlenmesi üzerinde uyarıcı etkide bulunsa da, belirli bir konsantrasyon üzerindeki miktarlar uyarıcılık derecesinin azalmasına neden olmaktadır.

Masuhara ve ark. (1988), yaptıkları çalışmada, *Bletilla striata* bitkisinin köklerini toplamış ve aktif mikorizal fungusların mevsimsel değişimlerini incelemişlerdir. Köklerden çoğunlukla *Rhizoctonia repens* fungusunun elde edildiği, kök hücrelerindeki fungal yapıların ilkbahar ve sonbaharda artış gösterdiği ve bu tip fungal yapıların kış ve yaz ayları boyunca da mevcut oldukları tespit edilmiştir.

Tomita ve Tsutsui (1988), yaptıkları bir çalışmada orkide türleri ve fungal izolatlar arasındaki ilişkinin simbiyozmden parazitizme kadar değişebileceğini, kültür ortamındaki besin maddelerinin tükenmesiyle fungusun parazitik özelliğinin artarak

orkide ile fungus arasındaki dengeyi bozduğunu belirtmiştir. Ayrıca bir fungusun yüksek besin içeriği olan simbiyotik ortamlarda parazitik bir etki yapabileceği bildirilmiştir. Araştırmacılar, mikorizal fungus ve orkide türleri arasındaki simbiyotik ilişkide tür-tür bazında çok kesin bir özel ilişkinin olmadığını belirten sonuçlar almış; bunun yanında bu ilişkinin tamamen rastgele olmadığını; fungal izolatın etkisiz durumdan en etkili duruma kadar oldukça fazla değişkenlik gösterebildiğini ve buna bağlı olarak fungal izolatın simbiyotik kapasitesinin öncelikle izolatın niteliğine, sonra da simbiyotik olduğu orkideye bağlı olduğunu ifade etmiştir.

Smreciu ve Currah (1989), bir orkide türünden elde edilen fungal izolatların başka bir orkide cinsinin tohumlarını çimlendirmede simbiyotik olduğunu hatta orkide bitkisinin farklı gelişim safhalarında yer alabileceklerini ortaya koymuştur.

Wilkinson ve ark. (1989), bakterilerin belirlendiği bir araştırmada, Avustralya karasal orkidelerinin fungus infekteli mikorizal dokularından izolasyon çalışmaları yapmışlardır. Çalışmada 9 orkide türünde yaygın olarak *Pseudomonas fluorescens-putida*'ya ait bakteri suşları tespit edilmiştir. İzole edilen bu bakterilerin funguslarla bulaşmış bitkilerin belirli bir bölümüne veya orkide türüne özgü olabilecekleri sonucuna ulaşılmıştır.

Masuhara ve Katsuya (1994), daha önceki çalışmalarda orkide bitkileri ve funguslar arasındaki özel ilişkinin meydana geldiği yeri araştırmak için iki metod kullanıldığını bildirmektedir. İlk metotta orkidelerin doğal habitatında orkide köklerinden mikorizal fungus elde edilmiştir. Bu metod yetişkin bitki ile fungus arasındaki ilişkiyi göstermektedir. İkinci metod ise tohum ve protokorm ile fungus arasındaki ilişkiyi gösteren in vitro çalışmasıdır. Araştırmacılara göre bu yaklaşımlar açıkça ayırt edilememekte ve doğal koşullar ile in vitro şartlar arasındaki farklılıklar tamamen anlaşılamamaktadır.

Zettler (1997), orkidelerdeki simbiyotik çimlenme yönteminin, asimbiyotik çimlenmenin bilinmesine kadar, 1922 yılına dek kullanılan ve kolay olmayan bir yöntem olduğunu bildirmekte; bu yöntemin her zaman etkili olmadığından ve çalışılan tüm orkide türlerinde başarılı olunmadığından bahsetmektedir.

Shimura ve Koda (2005), 20°C sıcaklıkta 16 haftadan daha uzun süren ve mantar içeren kültür çalışmalarında kademeli bir kahverengileşmenin ve protokorm çürümesinin olabileceğine değinmiştir.

2.2. Asimbiyotik Kültür alışmalarında Kullanılan Orkidelere Ait Genel Bilgiler

Arditti (1967), orkide köklerinde bazı fungusları tespit etse de, orkide tohumlarının simbiyotik olarak imlendirilmesinin yanısıra, *Cattleya*, *Epidendrum* ve *Laelia* cinsleri içinde yer alan türlerin tohumlarının çimlenebilmeleri için herhangi bir fungusa gerek duymadığını; şeker ve mineral madde içeren agar ortamının da yeterli olabileceğini ve böylece asimbiyotik kültür yöntemlerini geliştirildiğini bildirmiştir. Orkidelerle simbiyotik ilişki kuran mikorizal fungusların diğerk bitkilerde nektrotrofik parazit olarak yaşadıkları görülmüştür. Araştırıcı, tohumların çimlenmesi için belirli ışık şiddeti ve fotoperiyoda ihtiyaç duyan orkide türlerinin yanı sıra bazı orkide türlerinin karanlıkta daha iyi çimlendiğini, bazı türlerin hem ışıkta hem de karanlıkta çimlendiğini bildirirken; orkide tohumlarının çimlenme ve gelişmesinde en uygun pH'ın orkide türlere göre farklılık gösterdiğini görmüş ve değışik türlerdeki en uygun pH değıerinin 3.6-7.6 arasında değıştiğini belirtmiştir. Asimbiyotik kültür ortamları hazırlanırken bitki hormonlarının farklı karasal orkide tohumlarının çimlenmesi üzerinde farklı etkiler yapabileceğı, en olumlu etkiyi ise sitokinin grubu hormonların sağıladığını bildirilmiştir.

Hadley ve Harvais'e (1968) göre kullanılan büyüme düzenleyicilerin karışımı, simbiyotik fungus ya da patates ekstraktı ve hindistan cevizi sütü gibi maddelerin varlığı söz konusuysa yararlı bir etki sağılamaktadır. Araştırıcıların *Orchis purplella*'nın asimbiyotik kültür ortamında imlendirilmesini amaçlayan çalışmasında, ortama katılan hormonların etkileri araştırılmış; giberellic asitin protokorm ömrünü arttırdığını fakat sayısını ve büyüklüğünü etkilemediğini; IAA'nın çimlenmeyi engellediğini ve protokormları uzattığını; kinetinin hem yalnız hem de IAA ile birlikte kullanıldığında büyüme ve gelişme üzerinde kesin bir etki yaptığını; adeninin çok az bir etkiye sahip olduğı bildirilmiştir

Harvais'e (1973) göre asimbiyotik kültür ortamı olarak kullanılan ortam, doğıada epifit orkideleri (başka bir bitki üzerine sarılmış olarak havai yetişen) besleyen ağıların gövde szntlerinin bileşiminden çok daha yoğıun olmakta ve genel olarak epifit orkideler konsantre; karasal orkideler ise seyreltik ortamlarda daha iyi imlenmektedir. Ancak asimbiyotik ortamda çimlenmenin gerçekleşebilmesi için ortama bazı organik maddelerin eklenmesi gerektiğini ve bazı orkide türlerinin tohumlarının çimlenmesi için ise sukroz, glukoz ve başka şekerlerin de çok yararlı olabileceğini bildirilmektedir.

Araştırmacı aynı zamanda in vitro çimlendirme çalışmalarında, çoğu araştırmacı tarafından farklı orkide tohumları için karbon kaynağı olarak kabul edilen dekstro z ve sakkarozun kullanıldığını bildirmiştir. Yetiştirme ortamına eklenen şekerin belirli oranlarda artırılmasıyla büyümenin de arttığı, artan şeker konsantrasyonu ile ise çimlenme ve büyümenin engellendiği belirtilmiştir.

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

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

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

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

Oliva ve Arditti (1984), Kuzey ılıman kuşakta bulunan karasal orkidelerin çimlendirilmesinde özel olarak hazırlanmış bazı ortamların kullanılmasının gerektiği; ve bu ortamlarda yapılan çimlenme çalışmalarından değişik sonuçlar alındığı; özellikle

Cypripedium ve *Spiranthes* gibi bazı orkide türlerine ait tohumların asimbiyotik ortamda daha iyi çimlenebildiği düşüncesini savunmaktadır.

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

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

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

Araştırmacılar in vitro koşullarda çimlenme denemelerinin yapıldığı 23 adet Batı Avrupa orkidesinde sterilizasyonun öneminden bahsetmiş ve sert kabuklu türlerin tohum kabuğunun aşındırılıp çimlenmenin sağlanmasında sterilizasyon çözeltisinin doz ve uygulanma süresinin etkili olduğunu söylemişlerdir. Tohum ekiminde kullanılacak sterilizasyon yöntemleri arasında, bazı Avrupa orkide türlerinin asimbiyotik çimlenmesinde değişik sürelerde % 5'lik kalsiyum hipoklorit solüsyonunun yeterli geleceğini ifade etmişlerdir. Sıcaklık faktörü ile ilgili olarak ise; orkide tohumlarının çimlenmesi için gerekli en uygun sıcaklığın 20-25°C olduğu, bununla birlikte 6°C ve 40°C'de bile çimlenen bazı orkide türlerinin bulunduğu bildirilmekte ve araştırmalarda çimlenme için kullanılacak sıcaklığın 23°C olarak kabul edildiği belirtilmektedir. Araştırmacılara göre en iyi çimlenme ve gelişme 4.8-5.2 pH aralığında meydana gelmektedir. Asimbiyotik çimlenmede kullanılan kimyasal maddelerden olumlu sonuç alınamadığı fakat gıda ortamlarına hindistan cevizi sütü, pepton, muz, patates ekstraktı ve kazeinhidrolizat gibi bazı doğal bileşiklerin eklenmesi, orkide tohumlarının

imlenmesi üzerinde olumlu etki yaptığı tespit edilmiştir. Çimlenme esnasında bazı şekerlerin yüksek konsantrasyonunun çimlenmeyi engellediği belirlenmiş, sakkarozun diğer şekerlere oranla çimlenme ve gelişme için daha etkili olduğu, fakat galaktoz ve mannitoln çimlenmeyi olumsuz şekilde etkiledikleri bildirilmiştir. Orkide tohumlarının asimbiyotik olarak çimlenebilmesi için hazırlanan ortamlar arasında en uygun olanının Van Waes-Debergh kültür ortamının olduğu bildirilmiştir. Çimlenme ve gelişme için kullanılan şekerler arasında en etkili olan şekerin sakkaroz olduğu, galaktoz ve mannitoln ise olumsuz etkide bulunduğu; ayrıca bazı yüksek konsantrasyonlu şekerlerin ise çimlenmeyi engelleyici olarak görüldüğü belirtilmektedir.

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

Mitchell'e (1989) göre *Dactylorhiza* cinsine ait türler, gelişmesi zor olan orkideler grubunda yer almaktadır.

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

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

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

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

2.3. Orkide Tohumlarıyla İlgili Çimlendirme ve Çoğaltma Çalışmaları

Harvais ve Hadley (1967b), *Orchis purpurella* bitkisine ait tohumların asimbiyotik ve inokule kültürlerdeki gelişimini incelerken, asimbiyotik koşullarda, ortam olarak deiyonize su, agar, tanımlı ve tanımsız ortamlar kullanmıştır. Çimlenme, sterilizasyon süresinin uzatılması ve yüksek sıcaklık uygulaması ile artarken; ışık ile engellenmiştir. Simbiyotik koşullarda ise birkaç *Rhizoctonia* ırkının düşük sıcaklıkta çimlenmeyi arttırdığı belirtilmiştir. Çalışmanın sonuçları içinde, besin dengesinin konukçu bitki ile endofit arasındaki durağan ilişkinin korunmasında önemli olduğu düşüncesine yer verilirken, bu durumun doğa koşullarındaki önemi üzerinde durulmuştur.

Warcup (1971), *Caladenia* bitkisi ile *Tulasnella calospora* (*Rhizoctonia repens*) ve *Sebacina vermifera* fungusları arasındaki yakın ilişkiyi belirlemiş olup *T. calospora* misellerinin canlı ya da dormant halde bulunan *Diuris* bitkisinin yumrularında bulunduğunu belirtmiştir. Çalışmada besi ortamı olarak Czapek-Dox mineralleri+% 0.05 yeast extract ile birlikte karbon kaynağı olarak sukroz yerine % 2 toz selüloz eklenmiş agar kullanılmıştır. Orkide tohumlarının yüzey sterilizasyonu % 20'lik Milton çözeltisinde 15-20 dakika yapılmıştır. *Dactylorhiza maculata* tohumları ile yapılan denemede fungus olmayan tüplerdeki tohumların, tohum kabuğunu kırmak üzere şiştiği görülmüştür. *T. calospora* bulaştırılmış tohumların ölçülmesi güç büyüklükte protokorm ve kısa yeşil sürgün oluşturduğu gözlenirken, *T. asymmetrica* ile bulaştırılmış tohumlarda hafif şişme belirlenmiştir. Buna karşılık *S. vermifera* ve *Tulasnella*'nın

başka türleri ile bulaştırılmış tohumlar kontrol tüplerindeki tohumlardan daha fazla gelişme göstermemiştir.

Mead ve Bulard (1975), *Orchis laxiflora* ve *Ophrys sphegodes* bitkilerinin asimbiyotik olarak çimlenmeleri üzerine yaptıkları çalışmada vitamin ve azot kaynaklarının etkilerini incelemiştir. İki tür arasında küçük farklılıklar meydana gelmiş olmasına rağmen, amonyum nitrat içeren temel bir mineral ortama sakkaroz, organik azot ve vitaminlerin eklenmesiyle her iki türde de iyi gelişimler tespit edilmiştir. Çalışmalarında yüksek oranda çimlenme ve bitkicik gelişimi elde etmiş olmalarının yanında bitkide kararma ve ölümlere de rastlamışlardır. Her iki türün de en iyi gelişimleri karanlıkta gerçekleşmiş ve tohum ekiminden sekiz ay kadar sonra bazı beyaz protokormlar kararıp bitki ölümü ile sonlanmıştır. *O. sphegodes* tohumlarında oluşan bir protokorm hem yeni bir protokorm hem de bir bitkiciğin oluşumuna neden olmuş bazen de kallus benzeri oluşumları geliştirmiştir. Bu türde pek çok kök ve % 50 oranında 1 cm civarında yumru oluşurken, *O. laxiflora* türünde köklü ve güçlü bitkiler elde edilmiştir. Test edilen vitaminler arasında thiamine'in *O. laxiflora* türü için gerekli olduğu ispatlanmıştır.

Beyrle ve ark., (1985), orkide köklerinden izole edilen *Rhizoctonia stahlii*'nin *Dactylorhiza maculata* tohumlarının çimlenmesine yardımcı olduğunu, iki haftada protokorm oluştuğunu ve 12 hafta süren soğuk uygulamasının bu gelişmeyi daha da hızlandırdığını bildirmiştir.

Tsutsui ve Tomita (1988), çalıştıkları 10 orkide bitkisinin 4 tanesinden *Rhizoctonia* izole ettiklerini ve bunların yulaf ortamı üzerinde *Spiranthes sinensis* ile simbiyotik ilişkisini deneyerek, bu orkideler arasında *Gymnodenia conchaticata* türünden elde edilen Rh AG-C izolatının bu orkide türüne en yakın simbiyont olduğunu belirtmiştir.

Das ve Ghoshall'a (1989) göre farklı tropikal orkide türlerine ait tohumların, in vitroda modifiye edilmiş Knudson C ve Burgeff Eg-1 ortamlarına ekilmesiyle çimlenmeler gözlenmiş ve en iyi çimlenme Burgeff Eg-1 ortamında elde edilmiş olup; besin ortamlarına eklenen 1 ppm NAA hormonu köklenmeyi olumlu yönde etkilemiştir.

Smreciu ve Currah (1989), yaptıkları çalışmada 20 orkide türünü; yine orkide türlerinden izole ettikleri 6 *Rhizoctonia* izolatı ile aşılıyarak, karasal orkidelerin simbiyotik ve asimbiyotik çimlenmelerini karşılaştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada

20 orkide türünün 17'sinde tohum şişkinleşmesinden sürgün gelişimine kadar değişik gelişme aşamaları gözlenirken, 3 orkide türünde sözkonusu aşamalar gözlenmemiştir. *Ceratobasidium cereale*'nin 11 orkide türü tohumunun çimlenmesini teşvik ettiği, patojen olma eğiliminin söz konusu olabileceği saptanmıştır. Çoğu orkide türünde *C. cereale* ve *Thanetophorus pennatus* protokorm gelişimine herhangi bir etkiye bulunmazken, *Rhizoctonia anaticula*'nın bazı orkide türlerinin çimlenmesini teşvik ettiği bildirilmiştir.

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

Dijk (1990), in vitroda 4 mikorizal fungusun bulaştırılmasıyla çimlendirilen *Orchis morio* ve *Dactylorhiza majalis* türlerinde, düşük azot düzeylerinde konukçu/fungus ilişkisinin büyümeyi daha çok hızlandığını; daha yüksek azot düzeyinde *Ceratobasidium* fungusunun *D. majalis*'te büyümeye baskılayıcı olduğunu bildirmiştir.

Rasmussen ve ark. (1990), sıcaklığın asimbiyotik ve simbiyotik şartlarda *Dactylorhiza majalis* tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkilerini araştırmış ve çalışma sonunda simbiyotik çimlenme oranının asimbiyotik ortamdaki çimlenmeye göre daha fazla olduğunu, simbiyotik şartlarda elde edilen fidelerin daha büyük olduğunu; ayrıca optimum 23-25°C sıcaklığın üzerinde simbiyotik şartlarda önemli derecede düşüş kaydederken asimbiyotik şartlarda 23°C'de çimlenme oranının maksimum % 21 olarak gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Özkoç (1991), *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* ve *Orchis laxiflora* türlerine ait tohumların simbiyotik ve asimbiyotik olarak çimlenmesinin incelendiği çalışmada, bazı katkı maddeleri ilave edilmiş yulaf ortamının simbiyotik kültürlerde parazitik durumun kontrolünde en uygun ortam olduğunu belirtmiştir. *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* bitkisinin köklerinden fungus izolasyonuna gidilmiş ve izolatların çoğunun spor oluşturan funguslardan *Fusarium* cinsinin türlerinin varlığı tespit edilerek bunların kontaminant olduğuna karar verilmiştir. Aynı çalışmada *O. laxiflora* bitkisinin köklerinden çoğunlukla kontaminant olduğu anlaşılan funguslar elde edilmiş ve

denemeye alınmamıştır. Son olarak *Orchis tridentata* köklerinden de fungus izolasyonu yapılmış ve simbiyoz olarak kullanılabilecek izolat elde edilememiştir. Tüm fungus izolasyon çalışmaları neticesinde üç adet orkide türünden elde edilen dört adet fungus çimlendirme çalışmasında kullanılmıştır. Bunların dışında ayrıca yurtdışından getirtilen yedi adet orkide türünden de simbiyont fungus elde edilmiş ve denemelerde kullanılmıştır. Simbiyotik çimlendirme çalışmalarında yurtdışından getirtilen izolatların çimlenmeye katkı sağladığı, bunun yanında her üç bitkinin kendi köklerinden izole edilen fungusların ise çimlenmede başarısız oldukları belirlenmiştir. Bu olay fungusların tohuma parazitik etki yapabileceği yönünde açıklanmıştır.

Serapias vomeracea subsp. *laxiflora* tohumlarının yüzey sterilizasyonunun çimlenmeye olan etkisinin de bakıldığı çalışmada % 10, % 20, % 30'luk sodyum hipokloritin 5, 10, 15, 30, 45 ve 60 dakika uygulanması ile elde edilen sonuçlara göre en iyi çimlenmeler VWD-N ortamından; % 10+30 dakika uygulamasında % 21.7; % 20+5 dakika uygulamasında % 50.3; % 30+10 dakika uygulamasında % 25.4 olarak elde edilmiştir. Fungal izolatlarla yulaf ortamında yapılan çimlendirmede en iyi çimlenme oranı % 30.6; modifiye yulaf ortamında ise % 9.1 olarak bulunmuştur. Bunlardan başka değişik kültür ortamları da incelenmiş, seyreltik kültür ortamında oluşan protokormların epidermal tüylere sahip olmadığı ve az geliştikleri; konsantre kültür ortamında ise protokormların daha sağlıklı olduğu belirtilmektedir. Deneme sonunda en iyi çimlenme oranı MS, Knudson ve VWD ortamlarının modifikasyonları arasında inorganik azot içermeyenlerden alınmıştır. Bu ortamlarda çimlenme iyiye, protokormlarda epidermal tüy gelişmemiştir. En iyi sonuç MS-N ortamında % 53.8 çimlenme olarak tespit edilmiştir. *Orchis laxiflora* ile yapılan çalışmada ise % 30'luk sodyum hipokloritte 15 dakikalık sterilizasyon yapılmış ve VWD-N ortamında % 13.4 çimlenme elde edilmiştir. Sonuçta fungal izolatlarla yulaf ortamında yapılan çalışmada % 11.7, modifiye yulaf ortamında % 7.5, seyreltik kültür ortamında % 9.1, ve en iyi sonuç konsantre kültür ortamı olan KC-N ortamından % 25.1 çimlenme elde edilmiştir (Özkoç, 1991).

Rasmussen ve ark. (1991), *Listera ovata* türüne ait olgunlaşmamış embriyo ve tohumlarıyla yapılan asimbiyotik ve simbiyotik doku kültürü çalışmasında; simbiyotik çalışmadaki embriyolardan tüm safhalarda protokorm elde ederken, asimbiyotik kültürde sadece belirli safhalarda başarı elde etmişlerdir. Çalışmanın sonunda zor

Çimlenen orkide türlerinin üretimi ve uygun fungus tespiti için olgunlaşmamış embriyoların inokulasyonu önerilmiştir.

Pedroso ve Pais (1992), *Orchis papilionaceae* türünden yavru yumru üretmek için olgunlaşmış ve olgunlaşmamış tohumları süspansiyon kültürüne almıştır. Olgun tohumların çimlenmesi ve protokorm oluşumu katı ve likit ortamlarda düşük olurken, olgunlaşmamış tohumların çimlenme oranı süspansiyon kültüründe artış göstermiştir. Yavru yumrular sadece süspansiyon kültüründe aydınlık koşullarda elde edilmiş ve karanlık koşullara alındığında gelişme olmamıştır. Süspansiyon kültüründe çimlenme oranı % 33 olarak belirlenmiş ve protokormlardan yavru yumrular elde edilmiştir. Kalluslar ise katı ortamdan elde edilmiştir. Çalışmanın sonucunda tüm kültür koşullarında testanın çimlenmeyi değiştirdiği; testadan ayrılmış embriyoların % 100'e varan çimlenme gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada imlenmeler aynı dönemlerde gerçekleşmemiş olup, belirli bir homojenlik sağlanamamıştır.

 zko ve Dalcı (1993), farklı ülkelerden getirilmiş 11 adet fungal izolat eşliğinde yulaf ve modifiye yulaf ortamlarında ekimi yapılan *Orchis laxiflora* tohumlarında her izolatin aynı etkiyi sağlamadığını bildirmiş olup, iki Türk izolatinı çimlenmede etkisiz bulmuşlardır.

Aytaş (1994), *Ophrys apifera* ve *Ophrys sphegodes*'in köklerinden elde edilen ve ayrıca yurtdışından getirilen fungal izolatlarla yapılan çimlendirme çalışmasında, simbiyotik ortamdan başarılı sonuçlar elde edilemediğini belirtmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda değişik konsantrasyonlardaki sodyum hipokloritin farklı zaman uygulamaları sonucu 6 ay sonundaki çimlenme oranına bakılmıştır. Tohumları % 0.5'lik sodyum hipokloritte 5 dakikadan fazla tutmak mikroorganizmalardan arınmaya yeterli gelmiş, 10 dakikada % 6.48'e çıkmış, 60 dakikada maksimum % 8 çimlenme olmuştur. % 1 NaOCl'de en çok 10 dakikada % 9 çimlenme, % 1.5'ta ise 15 dakikada en çok % 10.7 çimlenme gerçekleşmiştir. VWD-N ve VWD-N+Ca ortamlarda en iyi çimlenme sırasıyla % 24.7 ve % 20.8 olup, tohumların % 1.5'luk sodyum hipokloritte 15 dakika tutulması ile elde edilmesine karşın temel VWD ortamında % 10.7 olarak bulunmuştur. Denemelerde kullanılan 3 farklı kültür ortamı arasında en iyi çimlenme inorganik azot içermeyen VWD-N kültür ortamından, en hızlı fide gelişimi ise VWD-N+Ca ortamından elde edilmiştir. Fungal izolatlarla yapılan imlendirmeden hiçbir şekilde başarı elde edilememiş, sadece tohum kabukları çatlamış ancak çimlenme olmamıştır.

Masuhara ve Katsuya (1994), *Spiranthes sinensis* ile *Rhizoctonia* sp. arasındaki özel ilişkiyi in situ ve in vitro koşullarda incelemiştir. Orkidenin doğal yetiştirme ortamı olan otlak alanlarda 210 ayrı deneme noktasına pamuk tülbentler içinde gömülen *S. sinensis* tohumlarından sekiz hafta sonra 67 noktada protokorm elde edilmiştir. Protokormlardan yapılan izolasyon sonucunda *R. repens* fungusunun çimlenmeyi başlattığı ortaya çıkarken benzer şekilde, alandaki yetişkin bitkilerin kök izolasyonları sonucunda da aynı fungusun dominant mikorizal fungus olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen funguslar arasında binükleuslu ve çok nükleuslu olmak üzere 32 *Rhizoctonia* izolatı bulunmaktadır. In vitro koşullarda simbiyotik çimlenme için bulunan *Rhizoctonia* fungusları bulaştırılmıştır. In situda çimlenmeyle ilgisi olmayan çoğu *Rhizoctonia*'nın in vitroda tohum çimlenmesini başlattığı bildirilmiştir. In vitroda izolatlarla gelişen çimlenmeler ex vitro koşullara transfer edilmiş olup 3 aylık sürede çimlenmeler devam ederken yeni yapraklar gelişmiştir.

Özdener (1994), farklı sodyum hipoklorit konsantrasyonlarının *Dactylorhiza iberica* tohumlarının çimlenmesine etkilerini araştırdığı çalışmada en yüksek çimlenmeyi (% 17.7) % 20 NaOCl'in 20 dakika süre ile uygulanmasıyla elde etmiştir. *Dactylorhiza urvilliana* tohumlarında ise en yüksek çimlenme (% 70.4) yine % 20'lik sodyum hipoklorit konsantrasyonunun 10 dakika uygulanmasıyla elde edilmiştir. Çimlenmede kullanılan asimbiyotik kültür ortamı olarak VWD temel kültürü ortamı ve bu ortama makro element, mikro element, aminoasit, vitamin, şeker, kompleks katkı maddesi (patates ekstraktı) ve inorganik azotun eklenmesi ya da çıkarılmasıyla oluşturulan değiştirilmiş VWD kültür ortamları kullanılmıştır. Protokormlar oluştuktan sonra gelişmelerin daha iyi gözlemlendiği diğer ortamlara transfer yapılmıştır. İki orkide türüne ait köklerden fungus izole etmek için % 20'lik sodyum hipoklorit dört dakika uygulanmış ve ardından üç kez steril saf sudan geçirilmiştir. Simbiyotik kültür ortamı olarak ise yulaf ve modifiye yulaf ortamı kullanılmıştır. Simbiyotik kültür ortamına ekilen tohumların yüzey sterilizasyonu her iki tohum için en iyi çimlenmenin sağlandığı ayrı ayrı uygulamalarda yapılmıştır. Asimbiyotik çimlenmede seyreltik ve konsantre ortamlar kullanılırken, seyreltik kültür ortamına eklenen şekerin çimlenmeyi olumsuz etkilediği belirtilmiştir. Fide gelişimi için konsantre VWD kültür ortamı ve bu ortamın modifiye edilmesiyle hazırlanan ortamda şekerin ve inorganik azotun gerekli olduğu bildirilmiştir.

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

Vakkasoğlu (1995), Doğu Anadolu Bölgesi'nden toplanan *Orchis anatolica*, *Orchis coriophora*, *Ophrys vernixia*, *Ophrys apifera*, *Ophrys transyrcana*, *Ophrys umbilicata*, *Himantoglossum affine* ve *Serapias vomeracea* türlerinin tohumları ile bu orkidelerin rizosfer topraklarından elde edilen fungal izolatları kullanarak orkidelerin simbiyotik yaşamlarına bakmıştır. Çalışmada fungal izolat elde etmek için Papavizas ve ark.'nın (1975) bildirdiği tuzak şeker pancarı yöntemi ile Roberts ve Herr'in (1979) bildirdiği toprak kalıntı yönteminin kullanıldığı belirtilmiştir. Farklı orkide rizosfer topraklarından elde edilen fungal izolatların yine farklı orkide tohumlarına bulaştırılmasıyla çimlenme ve protokorm oluşumu gözlenmiş, çimlenme denemelerinde Knudson çözeltisi kullanılmış, ayrı bir ortam denemesi de yulaf ortamı kullanılarak yapılmıştır. Araştırmacı *Orchis coriophora* tohumlarının *Rhizoctonia solani* izolatı ile bu ortamda çimlendiğini bildirmiş olup, *O. coriophora* ve *O. vernixia* tohumlarının *R. solani* ile bulaşmasından sonra en yüksek protokorm oluşumunun 47 adet ile *O. coriophora* türünden elde edildiğini ve bunların 1.5-2 aylık sürede gelişme gösterdiklerini, 21 adet fide kaydedildiğini ve çimlenmede 70 günde % 1.14 başarı elde ettiğini belirtmiştir. Petri kaplarında çimlenen *O. coriophora*'nın birkaç fidesi steril ve steril olmayan toprakla hazırlanmış saksılara taşınmış, steril olmayan topraktaki fidelerin daha iyi geliştikleri görülmüş olup 2 ay sonunda bitkiciklerin canlılıklarını yitirdikleri; *O. vernixia* türünün ise 60 günde % 0.58 çimlenme gösterdiği kaydedilmiştir.

Topçuoğlu ve ark. (1996), Kahramanmaraş yöresinde doğal olarak yetişen salep (*Orchis mascula* L.) bitkisinin yetiştiği toprakların bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerini tespit etmişlerdir. Buna göre incelenen alandaki toprakların genellikle kumlu-killi-tınlı ve killi-tınlı tekstürlü; kireç miktarının düşük, hafif alkali reaksiyonlu,

azot yönünden yoksul, bitkiye yarayışlı fosforca zengin, değişebilir potasyumu yeter ve yüksek düzeyde içerdiği besin içerikleri yönünden ayrımlılık olduğu belirlenmiştir. King ve Buckney (2002), orkidelerin Avustralya koşullarında toprakta hayatlarının devam etmesinin, toprak içindeki organik madde ve mineral besin elementine bağlı olduğunu bildirmiştir. Karaburun Yarımadası'nda yayılış gösteren salep orkidelerinin toprak özelliklerinin incelendiği bir çalışmada türlerin genellikle kireç içeriği yüksek, kalkerli topraklarda yayılış gösterdiği belirlenmiştir. Bu topraklar kumlu balçık ve killi balçık olarak nitelendirilmiştir. Ayrıca tuz oranının düşük çıktığı bildirilmiştir (Parlak ve Tutar, 2011).

Çağlayan ve ark. (1998), Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetişen bazı salep orkidelerinin embriyolarını in vitro koşullarda 14 farklı ortamda kültüre aldıklarını ve en yüksek çimlenme ve bitki oluşumunun *Orchis coriophora*'ya ait olduğunu ve sırası ile % 2.22 ve % 1.11 olarak bulunduğunu; kullanılan ortamlar açısından en yüksek çimlenme ve protokormdan oluşan bitkicik sayısının yine sırası ile 58 günde % 2.29 ve 156 günde % 1.86 ile VWD+domates ekstraktı+aktif karbon ortamından elde edildiğini belirtmişlerdir. VWD ortamının yanında Knudson ortamı ve bu ortamlara ilaveten % 10 oranlarında patates, domates ve salep yumrularından elde edilen ekstraktların, ayrıca kontroller hariç her ortamda 1 g/l oranında aktif kömürün kullanıldığı bildirilmiştir. Embriyo kültüründe en iyi sonuç veren ilk iki bitki olan *O. coriophora* ve *O. anatolica*'nın yumru oluşturma potansiyellerine bakılmış; yine aynı ortamlar kullanılmış olup; *O. coriophora*'nın yine aynı ortamda en yüksek ortalamayla % 2.45 yumru oluşturduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, çalışmanın sonunda in vitroda çoğaltılan *O. coriophora* bitkiciklerini torf ortamına dikmişler ve in vitrodan çıkan bitkilerin % 20'sinin yaşadığını belirtmişlerdir.

Miyoshi ve Mii (1998), *Cypripedium macranthos* türüyle yaptığı in vitroda çimlendirme çalışmasında tohumların % 70'ine % 0.5'lik NaOCl ile 60 dakika % 3.2'lik $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ile 7 saat muamele etmiştir. Çimlenmeden 3 ay sonra farklı sıcaklık ve sitokinin uygulamaları yapılarak, soğuklama ve hormonun gelişmeye etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda hipokloritte bekletilen tohumlara, sitokinin uygulandığı ve 4°C sıcaklıkta bekletildiği denemelerden başarı elde edilmiştir.

Jorgensen (1998), birkaç türle beraber *Dactylorhiza majalis* türünün in vitroda üretilip saksı bitkisi olarak kullanılmasıyla ilgili yaptığı çalışmada, *D. majalis* ve başka

bitkilerden elde edilen fungal izolatların kullanılmasıyla simbiyotik yaşamın oluştuğunu bildirmiştir. Simbiyotik ve asimbiyotik uygulamaları için, olgunlaşmış tohumların sterilizasyonunda 5 dakika süre ile % 1 Tween 80+% 5 NaOCl uygulanmıştır. 3 g/l toz yulaf içeren besi ortamı içine ekilen tohumların, ekimden 6 hafta sonra çimlendikleri belirtilmiştir. Araştırmacı, çalışma sonunda *D. majalis* türünden izole edilen 19 fungal izolatla yaptıkları çimlendirmede en çok % 70 başarı elde ettiğini, bunların içinde 12 izolattan sağlıklı protokorm oluştuğunu; bunun yanında *Goodyera repens* bitkisinden alınan izolatla % 80 oranında çimlenme sağladıklarını belirtmiştir.

Önal (1999), Ege Bölgesi'nden toplanan 9 orkide türünün 3 tanesinden olumlu sonuç aldığı embriyo kültüründe; VWD ve Knudson ortamları ve bu ortamlara % 10-20 patates ekstraktı, % 10-20 muz ekstraktı, % 10 hindistan cevizi sütü, 0.2 mg/lit GA₃, 1 mg/lit BAP ilaveli 14 farklı ortam kullanıldığını; tohumun yüzey sterilizasyonunun ise 15-20 dakikada % 0.6'lık NaOCl'de yapıldığını bildirmiştir. Araştırmacıya göre *Orchis sancta* tüm ortamlarda en erken olarak bir ayda çimlenmiş olup, Knudson+% 10 patates ekstraktından % 100 başarı elde edilmiştir. Hormon uygulamalarının hemen hemen tüm türlerde ve ortam tiplerinde tatmin edici sonuç vermediği bildirilirken; en yüksek % 80 oranında protokormdan bitki oluşturan türün *Orchis laxiflora* türü olduğu ve bu sonucun yine Knudson+%10 patates ekstraktından elde edildiği belirtilmiştir. Yumru gelişimini takip etmek için ise, %10 patates ekstraktı eklenmiş KC ortamındaki bitkilerin 3-4 cm sürgün büyüklüğüne ve yeterli kök gelişimine ulaşması beklenmiştir. Bu şekildeki bitkilerin yarısı normal gelişim ortamlarında (24°C ve 16 saat/gün ışık), yarısı da 5°C sıcaklık ve devamlı karanlıkta bekletilmişlerdir. Her iki türe ait bitkilerin değişik sıcaklık altındaki yumru oluşturma potansiyelleri en çok 24°C ve 16 saat/gün ışık uygulamasında başarı göstermiştir. In vitroda elde edilen *O. sancta* ve *O. laxiflora* türlerine ait 25 adet yumru 7 cm çaplı saksılara koyulmuş 1:1:1 oranında kum, bahçe toprağı ve organik gübreden oluşan harca dikilmiş; *O. sancta*'da % 9.1, *O. laxiflora*'da % 12.9 sürme tespit edilmiştir.

Esitken ve ark. (2004), yapılan başka bir çimlenme ile ilgili çalışmada *Orchis palustris* tohumlarını 1-5 gün için polyethylen glycol (PEG-6000) solüsyonunda -0.5, -1.0 ve -1.5 MPa altında tutmuşlardır. Bu muameleye tabi tutulan tohumlar BNR 8-3 mikorizal fungus ile birlikte yulaf unundan hazırlanmış agar ortamında 22°C sıcaklıkta çimlenme göstermiştir. Çalışmanın sonunda çimlenme -1.5 MPa su basıncında 8 günde

görülürken, kontrol uygulamasında 18 gün olarak kayıt edilmiştir. Su basıncı azaldıkça çimlenmenin arttığı belirlenmiş ve çimlenme basınca göre % 55 (-0.5 MPa), % 58 (-1.0 MPa), % 65 (-1.5 MPa), % 43 (kontrol) olarak değişiklik göstermiştir. Bekleme süresinin ise çimlenme üzerinde az bir etki yaptığı gözlenirken, en iyi çimlenme oranı (% 68) 1 gün süre ile -1.5 MPa uygulamasından elde edilmiştir.

Gezgin'e (2004) göre orkide tohumlarının çok küçük olması yüzünden dış koşullarda çimlenme ve toprakta filizlenmeyi bekleme sonuç vermeyebilir. Araştırmacı Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nden toplanan ve salep elde edilen orkidelerin yaklaşık 103 adet kök ve yumru eksplantından mikorizal fungusların izolasyonunu yapmış ve tanımlanan 47 fungal izolattan 44 adet *Fusarium* sp., 2 adet *Rhizoctonia* sp. ve 1 adet *Papulaspora* sp. izolatları elde etmiş, *Rhizoctonia* sp. ve *Papulaspora* sp. suşlarının biyoformülasyonu için en uygun propagül boyutunu belirlemiş olup, *Rhizoctonia* sp. izolatının toprakta biyoformülasyonunun gerçekleştirildiğini bildirmiştir. Araştırmacıya göre salep yumru eksplantlarının sterilizasyonu için hazırlanan solusyon *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi toprakta yaygın olarak bulunan saprofitik toprak funguslarının gelişimini engellemiş ve etkisiz hale getirmiştir. Mikorizal fungus elde etmek için yapılan çalışmada toplanan salep orkidelerinin yumru ve kökleri için hazırlanan yüzey sterilizasyon solusyonu olarak % 5'lik NaOCl kullanılmış ve eksplantlar bu solusyonda 45 dakika tutulmuş, ardından % 70'lik etil alkolde 2.5 dakika çalkalandıktan sonra 3 kere steril distile sudan geçirilmiştir. Eksplantlar yeast ekstrakt içeren ortam (Clements ve ark., 1986), potato dextrose agar ortamı (Hasenekoğlu, 1991) ve MS ortamı (Murashige ve Skoog, 1962) içine yerleştirilmiştir. Gelişen mikorizal fungusların tanısı için ise malt extract agar ve corn meal agar (Hasenekoğlu, 1991) ortamları kullanılmıştır. Araştırmacı, yapmış olduğu çalışmada izole ettiği *Fusarium*'un gösterdiği gelişimin, *Rhizoctonia* fungusunun gelişmesinden daha hızlı olduğunu ve bu yüzden *Rhizoctonia*'yı baskıladığını düşünmektedir. Araştırmacı mikorizal fungus çalışmalarında kültürel metodların yetersiz kaldığını; orkidelerle simbiyotik olarak bulunan ve *Rhizoctonia*'ları da içeren bazı fungusların kültürel ortamda büyüyemediklerini ve bu yüzden yarış dışı kaldıklarını ifade etmiştir.

Sazak'a (2004) göre asimbiyotik ve simbiyotik koşullarda çimlenmeleri ve gelişmelerinin incelendiği *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* ve *Spiranthes spiralis* türlerine ait tohumlarda yüzey sterilizasyon için kullanılan çözeltinin konsantrasyonu ve

uygulanma zamanı türlere göre farklılık göstermiştir. Her iki türün çimlenmesinde kullanılan fungal izolatlar başarı elde etmede farklılık göstermiştir. Asimbiyotik şartlarda elde edilen çimlenmelerde inorganik azot, *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* türünde azaltıcı olarak belirlenirken, *Spiranthes spiralis* türünde arttırıcı etkiye sahip olmuştur.

Esitken ve ark. (2005), Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'nin farklı yerlerinden toplanmış doğal orkidelerden izole edilen *Rhizoctonia* funguslarının *Orchis palustris* ve *Serapias vomeracea* subsp *vomeracea* türlerine ait tohumların çimlenmesi ve protokorm oluşturmadaki etkilerini incelemiş olup; Erzurum, Erzincan ve Artvin bölgelerinde yetişen *Dactylorhiza*, *Orchis* ve *Serapias* bitkilerinden 15 adet binükleuslu *Rhizoctonia*, 1 adet *Rhizoctonia solani* izole etmişlerdir. *O. palustris* ve *S. vomeracea* türlerine ait tohumlar bu izolatlarla birlikteyken 21 günde çimlenme göstermiş olup, değerler sırası ile % 27 ve % 23 olarak elde edilmiştir. Hiç fungus aşılınmamış tohumlarda çimlenme % 1'in de altındayken, izole edilen iki ırk en yüksek çimlenme oranını (% 42) teşkil etmiştir. İzolatların hemen hemen hepsi çimlenmeyi teşvik etmiş fakat protokorm oluşumu sadece *O. palustris* türünde gözlenmiştir.

Andronova ve Ivasenko (2007), *Dactylorhiza maculata* türüne ait popülasyondan alınan 12 adet bitkiden tohum toplayarak çimlenme çalışmıştır. 12 adet genotipe ait tohumların çimlenmeleri ve bitki gelişimleri aynı seviyede ilerlememiş, dolayısıyla homojenlik görülmemiştir. Daha sonra 13 ve 18 aylık olan bitkiler laboratuvar koşullarından yine laboratuvar ve dış koşullarda toprağa transfer edilmiş; laboratuvar kalanlardan 13 aylıklarda % 45, 18 aylık bitkilerde ise % 83 canlılık görülürken; dış koşullarda bırakılanlardan 13 aylık bitkilerde % 8, 18 aylık bitkilerde ise % 30 canlılık oranı elde edilmiştir.

Verdugo ve ark. (2007), uzun vazo ömrüne sahip olmakla beraber, kesme çiçek gibi uzun bir sap ve bu sap üzerinde birçok çiçeği üzerinde bulunduran ve endemik bir tür olan *Chlorea crispa* bitkisinin küçük tohumlarının da *Rhizoctonia* ile ilişkili olarak çimlendiğini bildirmiştir. Araştırmacılar tohumları in vitro ortamda, *Rhizoctonia* aşılacakları yulaf unlu agar ortamına (8 gr agar/lit+25 gr yulaf/lit) ekerek protokorm elde etmişler, bunu takip eden üç farklı sıcaklık ve ışık uygulamasında bitki transferi yapmışlardır. Sonuçlar arasında 120 günde en az bir yaprak oluşturan ve 1.5-2.0 cm uzayan bitkilerin % 24-28 oranında hayatta kaldığı belirlenmiştir.

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

Gümüş ve ark. (2008), Batı Karadeniz Bölgesi'nden toplanan ve salep elde edilen 6 tür orkidinin toplanıp, tohumlarının % 10'luk NaOCl+1-2 damla Tween-20+10 dakika sterilize edilmesi sonrasında MS, ½ MS, VWD ve Knudson C ortamlarında kültüre alındıklarını bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda en yüksek çimlenme oranının % 17.43 ile *Dactylorhiza nischalkiorum* bitkisinden; besin ortamları ele alındığında en yüksek çimlenmenin % 7.34 ile VWD ortamından; türlere göre besin ortamının etkisi incelendiğinde en yüksek çimlenmenin *D. nischalkiorum* türünden % 24.41 ile VWD ortamından elde edildiği görülmektedir. Protokorm oluşumunun ise sadece 3 türde meydana geldiği ve en yüksek oluşumun % 13.11 ile *D. nischalkiorum*'dan elde edildiği belirtilmiştir.

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

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

dakika sterilize edildiğini bildirmiştir. *Orchis italica*'da sodyum hipoklorit+ultrason uygulamasında 15 günde % 81, kontrol uygulamasında 90 günde % 89 çimlenme elde edilirken 2 ay sonunda ilk yaprakların oluşmaya başladığı belirtilmiştir. Başka bir deneme *Ophrys tenthredinifera*'da yapılmış ve ultrason+5 dakika şok uygulamasından 60 günde % 5.3 çimlenme elde edildiği belirtilmiştir.

Gümüş (2009), Batı Karadeniz'de yetişen ve salep elde edilen 16 adet orkide türünde in vitro ve in vivo koşullarda asimbiyotik olarak üretim yapmıştır. Besi ortamı olarak ½ MS, MS, VWD, KC ve KC-N ortamları ile bu ortamlara GA₃ hormonunun 0, 0.1, 0.5 ppm dozları katılarak hazırlanmış ortamlar kullanılmış olup, çimlenme üzerinde farklı ışık uygulamaları denenmiştir. Tüm orkide türlerinde çimlenme ve protokorm elde edilirken, fide gelişimi sadece 8 türde görülmüştür. En yüksek bitkiye dönüşüm oranı KC besin ortamında yetişen *Orchis morio* türünde % 89.88 olarak belirlenmiştir. Dış koşullara alıştırmada başarı sağlanamazken, bitkiler en çok birkaç ay içinde canlılıklarını kaybetmişlerdir. Ayrıca denenen in situ çalışmasında bölünmüş ve bölünmemiş ana yumruların doğaya aktarılması sonucu bitkilerde çıkış gözlenmemiştir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Orkide türleri

Araştırmada kullanılan bitkiler, Van ilinde doğal olarak yetişen, ancak salep elde etmek için tahrip edilen ve bu sebepten dolayı özellikle Koyuncu ve ark. (1999) ile İşler (2005)'in risk altında gösterdikleri orkideler arasından seçilmiştir. Çalışmanın bitkisel materyal kısmını *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C.M. Richard, *Dactylorhiza iberica* (Bieb. ex Willd.) Soó, *Dactylorhiza romana* (Seb.) Soó subsp. *georgica* (Klinge) Soó ex Renz & Taub., *Dactylorhiza umbrosa* (Kar. et Kir.) Soó, *Orchis palustris* Jacquin ve *Ophrys straussii* (Fleischm. & Bornm.) Nelson türlerine ait olgunlaşmış tohumlar oluşturmuştur. Tohumların yanı sıra fungus izolasyonu için bitkinin rizosfer (kök çevresi) toprağı ile taze yumruları da kullanılmıştır. Materyal toplama çalışmaları 2008-2010 yılları arasında; Van ili civarında, Gevaş ilçesi Altınsaç ve İnkaya (İnköy) Köylerinde; Erciş ilçesi Tasmalı Geçidi ve Edremit ilçesi'nde yapılmıştır. Fotoğrafları (Anonim, 2011) ve bazı özellikleri aşağıda belirtilen bitki türlerinin teşhisi ve sistematik olarak tanımları Davis (1984)'e göre yapılmıştır.

3.1.1.1. *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C.M. Richard

Genel özellikler: Gövde ince, 20-50(80) cm boyundadır. Brakte benzeri yapraklar üsttedir. Dip yapraklar 25 cm boyundadır (Şekil 3.1). Çiçek başağı 4-6(7) adet çiçekten oluşan, çok çiçekli bir yapı gösterir (Şekil 3.2). Brakteler hafif olarak lanseolattır, sivridir ve ovaryumu biraz geçmektedir. Çiçekler kırmızı, koyu ya da açık gül pembesi, bazen de beyazdır. Sepaller ovate-lanceolate olup 6-8x3 mm büyüklüğündedir. Labellum 6-9 mm uzunluğunda olup, ortaya doğru dar bir mahmuz girişinden uzayan 2 uzun sırta sahiptir. Mahmuz ipliksi olup, 10-13 mm uzunluğunda,

dikey ya da dūşeydir. Bitki, maki ve fragiana taşlı yamaçlarda, çayırlarda, ağaçlık alanların otsu açıklıklarında, zeytinliklerde, kalkerli ve siltli alanlarda, deniz seviyesinden 1750 metreye kadar olan yüksekliklerde yetişmektedir.



Şekil 3.1. *A. pyramidalis* bitkisinin genel görünümü.



Şekil 3.2. *A. pyramidalis* bitkisinin çiçeği.

3.1.1.2. *Dactylorhiza iberica* (Bieb. ex Willd.) Soó

Genel özellikler: Bitkiler ince, 20-40(60) cm boyundadır (Şekil 3.3). Yapraklar dik, lanseolat-linear ve daha az geniştir. Çiçekler 5-7(8) adettir. Çiçek durumu dar silindirik ve yapıda, gül pembesi rengindedir (Şekil 3.4). Brakteler lanseolat ve hemen hemen ovaryuma eşit boydadır. Sepal ve petaller gevşek bir miğfer içinde zıt durumludur. Sepaller ovat-lanseolat, petaller daha dar durumludur. Labellumu düz ve yelpaze gibi geniş ovat şeklidir. Kısa 3 lobu, nadiren parçalıdır. 8-11 mm uzunluğunda olup koyu benek ve çizgileri vardır. Lateral loblar yarı ovat şeklinde, kenarlar testere dişlidir. Orta bazen diş görünümünde boştur. Mahmuz ovaryumun yarısı kadar olup ince ve sarkıktır. Nemli çayır bataklık ve su kenarında 900-2500 m rakımda yetişir. Stolonlarından dolayı sıklıkla geniş kümeler halinde bolca yetişir.



Şekil 3.3. *D. iberica* bitkisinin genel görünümü.



Şekil 3.4. *D. iberica* bitkisinin çiçeği.

3.1.1.3. *Dactylorhiza romana* (Seb.) Soó subsp. *georgica* (Klinge) Soó ex Renz&Taub

Genel özellikler: Bitkiler 15-40 cm boyundadır. Sap dibinde 2-3 adet bulunan geniş kahverengimsi kınlar çok sayıdaki linear ve lanseolat yaprakları içine alır (Şekil 3.5). Çiçekler 4-5(6) adettir. Çiçek durumu kısa ve silindirik (Şekil 3.6). Brakteler otsu, çiçekler genellikle sarı ve oldukça küçüktür. Sepaller oblong 13x15 mm, lateral sepaller ters durumludur. Petaller eğri olarak ovattır ve 10x4-7 mm'dir. Labellumun genişliği genellikle uzunluğundan daha fazladır. Mahmuz dar silindirik ovaryuma eşit ya da ondan daha kısa (8)10-12 mm düz ve dikeydir. İğne yapraklı ormanlıklar ve orman kenarları, meşe çalılıkları, alpin çayırliklarında ve 20-2000 m yüksekliklerde yetişir.



Şekil 3.5. *D. romana* subsp. *georgica* bitkisinin genel görünümü.



Şekil 3.6. *D. romana* subsp. *georgica* bitkisinin çiçeği.

3.1.1.4. *Dactylorhiza umbrosa* (Kar. & Kir.)

Genel özellikler: Bitkiler değişen boylarda olup bodurluktan 80 cm'e kadar yükselebilir. Sap serttir ve büyük bitkilerde içi boştur (Şekil 3.7). 4-6(9) adet olan, oblong-ovate durumdan lanceolata kadar değişen yapraklar dağınık olup bazen dipte sıklaşmıştır. Çiçekler 6-7(8) adettir. Çiçek durumu sıklıkla silindirik olup 15(22) cm uzunluğundadır (Şekil 3.8). Alt braktelelerden gül moru, nadiren beyaz çiçekler çıkar. Sepaller ve petaller oblong-lanceolat olup 12-16 mm uzunluğundadır. Lateral sepaller ise uzamış ve kıvrılmış olup, petaller daha kısadır. Labellum hemen hemen düzdür, genellikle boyu eninden uzundur. Pürüzlü görünümde uçlara doğru sivrilen tam ya da yarım olarak nadiren üç loplü, 7-10(13)x(4)7-10(13) mm büyüklüğünde, koyu benekli ve kesik çizgilidir. Mahmuz silindirik dışa dönük ve ovaryum kadar uzundur. Bataklık, nemli alpin çayırlıkları, su kenarları, nehir kenarlarındaki söğüt ve ılgın çalılıklarında 1500-3300 m arası rakımlarda yetişir.



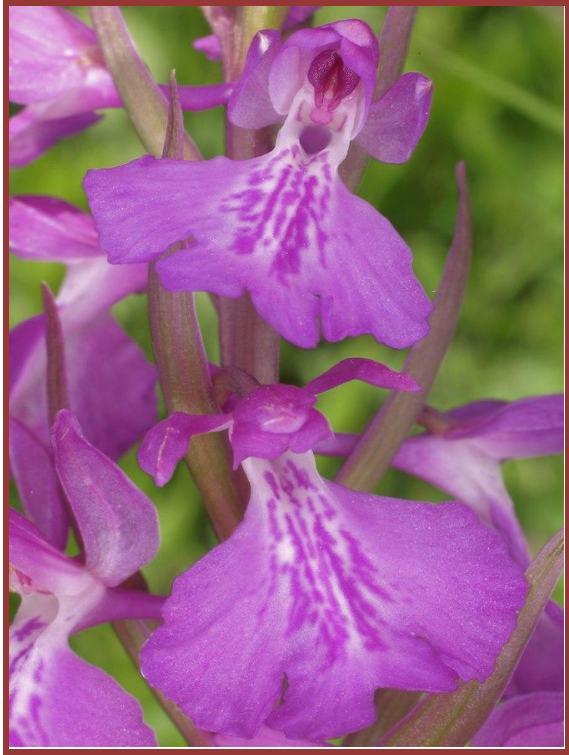
Şekil 3.7. *D. umbrosa* bitkisinin genel görünümü.



Şekil 3.8. *D. umbrosa* bitkisinin çiçeği.

3.1.1.5. *Orchis palustris* (Jacquin)

Genel özellikler: Bitki 80-100 cm boyunda olup sap üzerinde uniform olarak dizilmiş dik, linear, linear lanceolat, acuminate olan 4-6 adet yaprağa sahiptir (Şekil 3.9). Yaprakları 25x2.5 cm'den itibaren sivrilir. Çiçekler 6-7 adet olup, çiçek durumu silindirik, nadiren gevşektir. Çiçekler mor nadiren pembedir (Şekil 3.10). Lateral sepaller erecto-patenttir. Labellum değişebilen şekil ve boyutta olup düz, kama şekilli dipten, düz ve yelpaze şekilli olarak görülür. Genellikle üç loplu olup 9-15(20)x11-20 mm büyüklüğünde, ortası mor benekli ve beyazımsı (nadiren bölünmemiş beneksiz ve koyu mor); lateral loblar köşeli olup, bu köşeler yuvarlaklaşmıştır. Orta lop daha küçük ve tündür. Mahmuz düz ve ovaryuma eşittir. Nemli çayır ve bataklıklarda deniz seviyesinden 1950 m'ye kadar yetişebilmektedir.



Şekil 3.9. *O. palustris* bitkisinin genel görünümü.

Şekil 3.10. *O. palustris* bitkisinin çiçeği.

3.1.1.6. *Ophrys straussii* (Fleischm.&Bornm.) Nelson

Genel özellikler: Bitkiler 20-60 cm boyundadır; yapraklar, 3-6 adet olup dibe yakın olarak sıklaşmıştır (Şekil 3.11). Dik bitkidir. Çiçekler 4-5(6) adettir. Sepaller 12-16 mm uzunluğunda gül-menekşe, yeşil-pembe ya da beyazımsı olarak bulunmaktadır (Şekil 3.12). Dorsal sepal erecto-patenttir; petaller 6-7 mm uzunluğunda ligulate yapıdadır. Labellum lateral loblarla birlikte kahverengi-mor renklidir. Orta lop oblong olup, biraz düzdür. Spekulum iki değişik damar ya da noktalı çizgiler içerir, bazen tüysü siyah-mor bir yapı ile çevrilmiştir. Tür, meşe çalılıkları ve ormanlıkları, çam ormanları ile kalkerli yamaçlarda 200-1500 m yüksekliklerde yetişir.



Şekil 3.11. *O. straussii* bitkisinin genel görünümü. Şekil 3.12. *O. straussii* bitkisinin çiçeği.

Yaptığımız çalışmada teşhis edilen ve yerleri belirlenen bitkilere ait rizosfer topraklarından 2008-2009 ve 2010 yıllarına ait örnekler ve 2010 yılına ait yumrular alınarak fungus izolasyonları yapılmıştır. İzolasyondan elde edilen fungal izolatlar Bitki Koruma Bölümü tarafından teşhis edilmiştir. İzolatlar arasında, özellikle simbiyotik çimlenmede görev aldığı bilinen *Rhizoctonia* sp. fungusu teşhis edilerek denemelerde kullanılmıştır.

3.1.2. Araştırma yeri hakkında genel bilgiler

3.1.2.1. Araştırma yerinin konumu ve iklim özellikleri

Araştırma için materyalin elde edildiği Van ili, denizden 1725 m yükseklikte olup, 38° 25' kuzey enlemi, 43° 21' doğu boylamında yer almaktadır. Bitkisel materyallerin toplandığı alanların GPS koordinatlarına bakıldığında Altınsaç, İnköy, Tasmalı Geçit ve Edremit bölgelerinde 1682 metreden 1945 metreye uzanan yükseltilerin değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Araştırma materyalinin toplandığı bölgelerin koordinatları

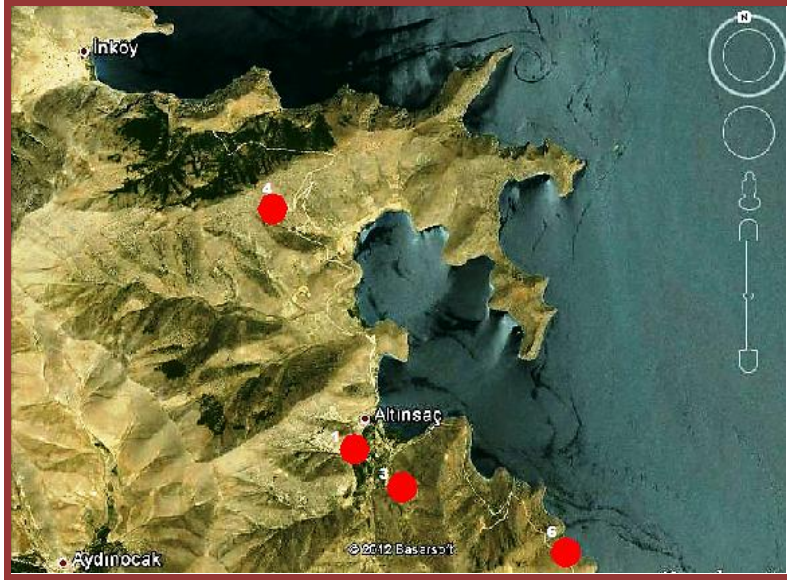
Bitki türleri	GPS koordinatları				Rakım
1- <i>Anacamptis pyramidalis</i>	utm	38S	315739	4252541	1682 metre
2- <i>Dactylorhiza iberica</i>	utm	38S	360906	4295411	1778 metre
3- <i>Dactylorhiza romana</i> subsp. <i>georgica</i>	utm	38S	316300	4251914	1781 metre
4- <i>Dactylorhiza umbrosa</i>	utm	38S	315224	4255883	1846 metre
5- <i>Orchis palustris</i>	utm	38S	349867	4254179	1705 metre
6- <i>Ophrys straussii</i>	utm	38S	318397	4250785	1788 metre

Materyallerin tamamı dağlar ve çayırliklardan olmak üzere Van ilinin çeşitli yerlerinden temin edilmiş olup, toplandıkları lokaliteler uydu resimleri üzerinde gösterilmiştir (Anonim, 2010a).

A. pyramidalis ve *D. romana* subsp. *georgica* türleri aynı alanda yer almış olup; *O. straussii* türü bu alana yakın yerlerde tespit edilmiştir (Şekil 3.13). *O. palustris* ve *D. umbrosa* türlerinin Edremit ilçesinde, *D. iberica* türünün ise Erciş ilçesi yolunda Tasmalı Geçit üzerinde yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.13. Tohum, yumru ve rizosfer toprağı toplanan orkidelerin lokasyonları.



Şekil 3.14. Dağlık alanlarda belirlenen orkidelerin lokasyonları.

Van ili konumu itibariyle Van Gölü'nün kıyısında yer almasından dolayı gölün olumlu etkisiyle iç kısımlara nazaran daha ılımandır. Van'da kış mevsimi soğuk ve karla örtülü, yazları ise serin ve kurak geçmekte olup, ilde karasal iklim hüküm sürmektedir. Kış aylarında toprak yüzeyinin karla örtülü olması kışlık ekimlerde soğuk zararının azalmasında önemli bir etken olmaktadır. Materyallerin toplandığı bölgelere ait 2008, 2009 ve 2010 yılları arasında bazı önemli iklim parametreleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Van ilinde uzun yıllar ortalaması, 2008-2009 ve 2009-2010 yılı vejetasyon dönemine ait bazı iklim verileri (Anonim, 2010b)

Aylar	Yağış (mm)			Ort. Sıc. (C°)			Nispi nem (%)		
	2008-2009	2009-2010	UYO	2008-2009	2009-2010	UYO	2008-2009	2009-2010	UYO
Ekim	56.6	15.9	44.4	11.0	10.5	10.9	60.8	46.8	59.0
Kasım	21.0	91.1	48.2	4.9	4.4	4.3	60.9	61.1	66.0
Aralık	36.7	34.8	37.1	-1.8	1.8	-0.5	63.1	63.5	67.0
Ocak	42.9	51.6	34.2	-3.9	0.1	-3.3	67.6	63.4	68.0
Şubat	49.2	71.1	32.3	0.0	1.3	-2.5	69.1	65.5	68.0
Mart	74.8	38.3	45.9	1.8	5.7	1.6	63.2	58.9	68.0
Nisan	47.1	46.3	55.0	6.5	8.3	8.1	57.0	62.2	61.0
Mayıs	31.9	69.8	45.6	13.1	13.2	13.1	46.3	61.1	56.0
Haziran	27.1	41.0	17.7	17.5	19.7	18.4	47.7	43.6	50.0
Temmuz	21.2	10.8	5.5	21.1	23.9	22.4	43.9	34.2	45.0
Toplam	408.5	470.7	365.9						
Ort.				7.02	8.89	7.25	58.0	56.0	60.6

3.1.2.2. Araştırma yerinin toprak özellikleri

Materyallerin toplandığı alanlardan alınan rizosfer toprağı örneklerinin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri, çalışmanın metod bölümünde (Bkz 3.2.2.) belirtilen yöntemlerle elde edilmiş olup, Çizelge 3.3’de ve Çizelge 3.4’de ortaya koyulmuştur.

Çizelge 3.3. Orkidelerin rizosfer topraklarına ait bazı fiziksel özellikler

Bitki adı	O.M. %	Kireç %	Tuz dS/m	pH	Bünye
<i>A. pyramidalis</i>	1.46	5.67	0.29	8.06	Tınlı
<i>D. iberica</i>	2.24	30.76	0.44	8.14	Siltli-tınlı
<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	1.02	0.63	0.27	7.19	Tınlı
<i>D. umbrosa</i>	2.02	27.61	0.44	8.26	Siltli-tınlı
<i>O. palustris</i>	2.17	30.24	0.18	8.42	Siltli-tınlı
<i>O. straussii</i>	0.82	9.87	0.28	8.07	Siltli-tınlı

Çizelge 3.4. Orkidelerin rizosfer topraklarına ait bazı kimyasal özellikler

Bitki Adı	N %	P ppm	Na ppm	Mg ppm	K ppm	Cu ppm	Zn ppm	Fe ppm	Mn ppm
<i>A. pyramidalis</i>	0.42	10	392.74	256.79	954.65	2.64	4.61	26.23	106.27
<i>D. iberica</i>	1.09	18	494.71	1186.75	360.42	4.29	2.61	419.80	152.78
<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	0.54	11.03	239.73	437.28	679.58	2.32	5.49	80.50	132.84
<i>D. umbrosa</i>	1.07	13.48	673.21	1617.26	600.50	4.06	1.75	420.96	154.63
<i>O. palustris</i>	0.87	17.15	902	2461.47	573.98	3.59	1.24	406.82	373.50
<i>O. straussii</i>	0.45	10.85	341	426.57	544.34	2.26	2.54	38.81	207.93

Bitkisel materyallerin toplandığı alanlara ait olan rizosfer toprağı örneklerinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri incelendiğinde toprakların organik madde içerikleri

çok az ve az, kireç bakımından çok az, az ve fazla; tuz içerileri bakımından tuzsuz; pH bakımından nötr ve kuvvetli alkalın; bünyelerinin tınlı ve siltli-tınlı; azot ve fosfor bakımından yeterli oldukları belirlenmiştir. K, Na, Mg, Fe, Mn, Zn ve Cu açısından ise türlere ait toprakların yeter ve fazla sınıflarında oldukları tespit edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tohum, yumru ve rizosfer toprağının toplanarak muhafaza edilmesi

Araştırmada kullanılan orkide türlerine ait materyaller Van ilinin farklı bölgelerinden toplanmış olup GPS ile koordinatları belirlenerek elde edilmiştir. Şekil 3.15'te görüldüğü gibi materyallerin bir kısmı çayırılık alanlardan, bir kısmı da dağlık alanlardan toplanmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.15. Çayırılık alandan materyal toplanması.

Şekil 3.16. Dağlık alandan materyal toplanması.

Türlere ait tohumlar temmuz-ağustos ayları arasında bitkilerin tohumu geçip kahverengi kapsül oluşturdıkları ve olgunlaştıkları zaman toplanarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Tohumlar kapsüllerinden ayrılıp 35 mesh'lik (0.25 mm) elekten geçirilmiştir. Kurutulan tohumlar çalışma başlayana dek cam petri kutularının içinde buzdolabında +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

Tohumlarla birlikte toplanan yumru ve rizosfer toprakları izolasyon başlayana kadar (2 gün) buzdolabında +4°C sıcaklıkta kese kağıtları içinde muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Rizosfer toprağının bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Bitkilere ait rizosfer toprakları yüzeyden 20 cm derinlikte alınmış olup, kurutulduktan sonra elenerek oda şartlarında naylon poşetler içinde muhafaza edilmiş ve aşağıda belirtilen bazı fiziksel ve kimyasal analizlere tabi tutulmuştur.

3.2.2.1. Toprak tekstürü

Deneme alanı topraklarının kum, kil ve silt fraksiyonları Bouyoucous (1951) tarafından bildirildiği şekilde hidrometre yöntemine göre belirlenmiş ve tekstür sınıfları “Soil Survey Manuel”e göre yapılmıştır.

3.2.2.2. Toprak reaksiyonu (pH)

Jackson (1958)’in belirttiği gibi, pH değerleri saf su ile 1:2.5 oranında sulandırılarak belirlenmiştir.

3.2.2.3. Kireç (%)

Hızalan ve Ünal (1966) tarafından belirtildiği gibi, Scheibler kalsimetresi kullanılarak saptanmıştır.

3.2.2.4. Tuz içeriği (dS/cm)

Kacar (1994)’ın bildirdiği şekilde, 1/2.5 yöntemi kullanılarak elektriksel iletkenlik, el tipi elektriki kondaktivimetre aleti ile belirlenmiştir.

3.2.2.5. Organik madde (%)

Modifiye edilmiş Walkley-Black yöntemine göre belirlenmiştir (Walkley, 1947).

3.2.2.6. Toplam azot (%)

Kjeldahl yöntemine göre belirlenmiştir (Kacar, 1994).

3.2.2.7. Yarıyışlı fosfor (ppm)

Sodyum bikarbonat yöntemine göre belirlenmiştir (Olsen ve ark., 1954).

3.2.2.8. Değişebilir potasyum, kalsiyum ve magnezyum (ppm)

Thomas (1982)'e göre 1 N Amonyum asetat ile çalkalanarak atomik absorpsiyon spektrofotometresinde belirlenmiştir.

3.2.2.9. Toprakta ekstrakte edilebilir mikro elementler (Fe, Mn, Zn ve Cu)

Alınan toprak örnekleri pH'sı 7.3'e ayarlanmış 0.05 M DTPA ile ekstrakte edilmiş olup, elde edilen süzükler atomik absorpsiyon spektrofotometresinde okutularak belirlenmiştir (Kacar, 1994).

3.2.3. Orkide tohumlarının in vitro koşullarda çimlendirilmesi

Orkide tohumlarının in vitro koşullarda çimlendirilmesinde simbiyotik ve asimbiyotik kültür ortamlarının etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

3.2.3.1. Orkide tohumlarının simbiyotik kültür ortamlarında çimlendirilmesi

3.2.3.1.1. Fungus izolasyon ortamlarının hazırlanması

Orkide yumruları ve rizosfer toprağından mikorizal fungus izole etmek için önceki çalışmalarda izolasyon ortamı için kullanılan su agar, PDA (potato dextrose agar) (Hasenekoğlu, 1991) ve YEA (yeast extract agar) (Clements ve ark., 1986) olmak üzere 3 farklı ticari besi ortamı hazırlanmıştır (Çizelge 3.5). Hazırlanan her besin ortamının içine, herhangi bir bakteriyel oluşumu engellemek için 50 mg/lt dozunda antibakteriyel olan streptomycin sülfat ilave edilmiştir. Ortamlar saf su ile hazırlandıktan sonra 121°C sıcaklıkta ve 1.2 atmosfer basıncında çalışan otoklavda 20 dakika steril edilmiş ve uygulanan metoda göre steril kabin içinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. Fungus izolasyonu için kullanılan besi ortamları

Ortam adı	Ortam bileşimine giren madde	Miktar gr/lt
Su agar	Agar bacteriological	15
PDA (potato dextrose agar)	PDA	39
YEA (yeast extract agar)	YEA	15

3.2.3.1.2. Simbiyotik kültür ortamlarının hazırlanması

Bu çalışmada simbiyotik kültür ortamına bulaştırılan *Rhizoctonia* sp. fungusunun gelişebileceği 3 farklı besi ortamı hazırlanmıştır.

3.2.3.1.2.1. Yulaf ortamı (YO)

Çizelge 3.6'da Clements ve Ellyard'ın (1979) tanımlamış olduğu yulaf ortamı görülmektedir. Bunun için öğütölüp toz haline getirilmiş 2.5 gr yulaf tanesi 1000 ml saf su içinde bir saat kaynatılmış ve tülbentten süzölmüştür. Soğuyan ortamın pH'sı 1 N HCl ve 1 N NaOH ile 5.7'ye ayarlanmış ve içine 7 g/lt miktarında agar katılarak, 121°C sıcaklıkta ve 1.2 atmosfer basıncında çalışan otoklavda 20 dakika steril edilmiştir.

Çizelge 3.6. Yulaf ortamı (YO) içinde yer alan maddeler ve miktarları

Ortamda yer alan maddeler	Miktar
Öğütülmüş yulaf tozu	2.5 gr
Agar	7 gr
Saf su	1000 ml
pH	5.7

3.2.3.1.2.2. Modifiye yulaf ortamı (MYO)

Çizelge 3.7’de Clements ve ark.’nın (1986) tanımlamış olduğu modifiye yulaf ortamı görülmektedir. Bunun için bazı kimyasal maddeler ile birlikte 3.5 gr öğütülmüş yulaf kullanılmıştır. Bir saat kaynatılıp soğutulan yulaf tozu tülbentten süzölmüş ve soğuduktan sonra tüm maddeler katılmıştır. Ortamın pH’ı 5.7’ye ayarlanmış olup YO’da olduğu gibi steril edilmiştir.

Çizelge 3.7. Modifiye yulaf ortamı (MYO) içinde yer alan maddeler ve miktarları

Ortamda yer alan maddeler	Miktar
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0.2 gr
KH ₂ PO ₄	0.2 gr
KCl	0.1 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 gr
Yeast extract	0.1 gr
Öğütölmüş yulaf tozu	3.5 gr
Agar	6.0 gr
Saf su	1000 ml
pH	5.7

3.2.3.1.2.3. Potato dextrose agar ortamı (PDA)

PDA ortamı, 39 gr/litre potato dextrose agar hesabıyla hazırlanmış olup diğer simbiyotik kültür ortamlarında olduğu gibi steril edildikten sonra kullanılmıştır (Hasenekoğlu, 1991; Zettler ve ark., 2001; Sharma ve ark., 2003).

3.2.3.1.3. Fungus izolasyonu için kullanılan yöntemler

Salep orkidelerinin rizosfer toprağında ve yumrularında özellikle *Rhizoctonia* sp. elde etmek ve olabilecek diğer fungusları belirlemek için yapılan çalışmalarda dört farklı yöntem kullanılmıştır. Elde edilen fungal izolatlar ışık mikroskobu ile Bitki Koruma Bölümü'ne ait Mikoloji Laboratuvarında teşhis edilmiştir.

İzolasyon için toplanan yumru ve toprak örnekleri temmuz-ağustos aylarında laboratuvara getirilerek kullanılıncaya kadar kese kâğıtları içinde ve buzdolabında bekletilmiştir. Şekil 3.17'de *Dactylorhiza iberica* türüne ait yumru; Şekil 3.18'de rizosfer toprağı örneği alınışı görülmektedir.



Şekil 3.17. Yumru örneğinin alınışı.

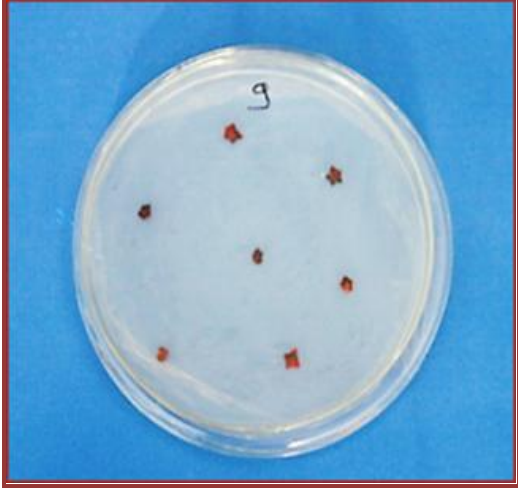


Şekil 3.18. Rizosfer toprak örneğinin alınışı.

3.2.3.1.3.1. Şekerpancarı ile tuzaklama yöntemi

Papavizas ve ark.'nın (1975) izlediği yöntem gere, her orkide rizosfer toprağından 0.5 kg toprak alınıp, petrilere 100'er gr koyulmuştur. İçinde toprak bulunan her petri kabına önceden otoklav edilmiş 1 gr şekerpancarı tohumu karıştırılmıştır. Sonra bu petriler 2 gün inkube edilmek üzere 24°C'de tutulmuş; 2 gün sonra tohumlar topraktan çıkartılıp 20 dakika çeşme suyu ile yıkanarak toprak kalıntılarından temizlenmiştir. Şekerpancarı tohumları daha sonra steril kabin içinde 3 kez steril edilmiş saf su ile durulanmış, bir kurutma kağıdı üzerinde fazla suyu alındıktan sonra içinde 7-8 adet olacak şekilde önceden hazırlanmış su agar petrilerine ekilmiştir (Şekil 3.19). Su agar petrilerinde 24°C'de 3-4 gün bekletilerek gelişen fungal hiflerden kesitler

alınıp, PDA petrilere aktararak gelişimleri sağlanmış ve teşhisleri yapılmıştır (Şekil 3.20).



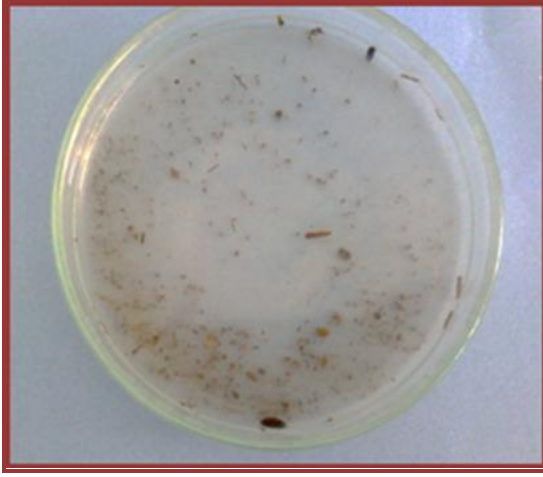
Şekil 3.19. Şekerpancarı tohumlarının su agar petrilere ekimi.



Şekil 3.20. Şekerpancarı tohumları etrafındaki fungal gelişim.

3.2.3.1.3.2. Toprak kalıntı yöntemi

Roberts ve Herr' in (1979) bildirdiği yönteme göre, her orkide türüne ait rizosfer toprağından 50 gr alınan örnek, 300 ml % 2'lik H_2O_2 (hidrojen peroksit) ile çalkalanmıştır. Bu karışımın üstünde yüzen artıklar 60 mesh'lik (0.5 mm) elekten süzülerek alınmıştır. Daha sonra aynı toprak örneği çeşme suyu ile süspanse edilerek her süspansiyondan sonra üstte yüzen artıklar yine aynı elekten süzülerek alınmıştır. Aynı toprak örneğine ait tüm artıklar birleştirilmiştir. Bu artıklar, otoklav edildikten sonra $45^{\circ}C$ 'ye soğutulmuş erlenmayerdeki 250 ml su agar ve PDA içerisine karıştırılarak, bu şekilde her besi yeri için 15 adet petriye dökülmüştür (Şekil 3.21). Dökülen petri kapları $24^{\circ}C$ 'de 3-4 gün, hif oluşturma dek inkube edilmiştir. İnkubasyondan sonra petrilere gelişen fungus kolonilerinden yine su agarı ve PDA içerisine saflaştırma yapılarak izole edilen funguslar teşhis edilmiştir (Şekil 3.22).



Şekil 3.21. Organik artıkların besi ortamlarına karıştırılması.



Şekil 3.22. Organik artıklar üzerindeki fungal gelişim.

3.2.3.1.3.3. Dökme plaka yöntemi

Madigan ve ark.'nın (2003) geliştirdiği metoda göre 10 gr tartılan orkide rizosfer toprağı steril kabin içinde, daha önce steril edilmiş 90 ml saf su ile 20 dakika süre ile karıştırılarak homojen bir süspansiyon (dilasyon- 10^1) elde edilmiştir (Şekil 3.23). Bu süspansiyon içinden ayrı ayrı 5 kez çekilen 1 ml'lik örnekler 45 ml steril saf su içeren başka bir kavanoza aktarılarak 10^2 'lik dilusyon, ve bu işlemin aynısının üç kez daha yapılmasıyla 10^3 , 10^4 ve 10^5 'lik dilusyonlar hazırlanmış olup toplam 5 kez seyreltme yapılmıştır (Şekil 3.24). Daha sonra bu beş kavanozun içinden her biri ayrı steril pipet ucuyla 1 ml çözelti çekilmiş ve her kavanoza ait 10'ar steril petri olacak şekilde dağıtılmıştır. Pipetleme işinden sonra her petriye 50°C 'ye soğutulmuş PDA dökülerek inkubatöre bırakılmıştır. 24°C 'de 3-4 gün bekledikten sonra, üzerinde gelişen fungus kolonileri tespit edilmiş ve gerekli saflaştırmalar yapılmıştır.



Şekil 3.23. 10^1 'lik dilusyonda oluşan fungal gelişim.



Şekil 3.24. 10^4 'lük dilusyonda oluşan fungal gelişim.

3.2.3.1.3.4. Yumrulardan fungus izolasyonu

Yapılan izolasyonda önce çeşme suyunda yıkanarak topraklardan temizlenen yumrular, steril kabinin içinde % 3'lük sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 3 dakika süre ile çalkalanmış ve ardından 3 kez steril saf su ile durulanıp, yine steril edilmiş kurutma kağıtları üzerinde fazla suları alınmıştır (Şekil 3.25). 0.5-1 cm büyüklüğünde bistüri ile kesilen yumru eksplantları petri başına 2 adet; her ortam için 6 adet olacak şekilde önceden hazırlanan su agar, PDA ve YEA petrilere dikilmiş olup, 24°C 'de 3-4 gün inkube edilmiştir (Şekil 3.26). Oluşan fungal hifler, aynı besi ortamı içeren petri üzerinde hemen belirlenmiş olup gerekli görüldüğü durumlarda su agar ve PDA petrilere aktararak ışık mikroskopunda teşhis edilmiştir.



Şekil 3.25. Yumru eksplantlarının sterilizasyonu.



Şekil 3.26. Yumru eksplantlarının besi yerlerine dikimi.

3.2.3.1.4. Genel sterilizasyon işlemleri

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

3.2.3.1.5. Tohumların yüzey sterilizasyonunun yapılması

Orkide tohumları çok küçük ve toz gibi bir yapıya sahip oldukları için kaba filtre kağıtlarından yapılmış küçük zarfların içine koyulduktan sonra zarfların kenarları toplu iğne ile iğnelenerek iplikle dikilmiştir. (Şekil 3.27). Her türe ait tohum 100 mg ağırlığında tartıldıktan sonra zarf içine alınmış olup; bir uygulama için kullanılmıştır. Her uygulama için 100 mg tartılan tohumlar, her tekerrürde 6 adet olmak üzere 3 tekerrürlü olarak toplam 18 adet kültür ortamı içeren kaplara ekilmiştir.

Deneme kurulmadan önce sterilizasyon ile ilgili yapılmış bazı önceki çalışmalar dikkate alınarak Tween-20 ile birlikte % 1 ve % 12 gibi düşük ve yüksek dozda ticari NaOCl konsantrasyonları ile ön çalışmalar yapılmış fakat hem sterilizasyon hem de çimlenmede olumsuzluklar yaşanmıştır. Valletta ve ark.,'nın (2008) bildirdiğine göre, tohum kabuğunun H₂SO₄ ile kırılması ve tohumun su almasının teşvik edilmesi mümkün olmaktadır. Araştırmacının tohum yüzey sterilizasyonunda % 5'lik H₂SO₄

kullanması üzerine, çalışmada homojenlik olması için cins farklılıkları gözetilmeden; kullanılan tüm orkide türleri tohumları önce % 2'lik H_2SO_4 (sülfirik asit) ile 5 dakika çalkalandıktan sonra 1-2 damla Tween-20 ve % 10'luk NaOCl ile 12 dakika steril edilmiştir (Şekil 3.28). Zarfların üzerinde kalıntı bırakmamak için son olarak 3 kez steril saf su ile birkaç dakika çalkalanarak durulanmıştır. Ekime başlamadan önce zarfların fazla suları steril bir kurutma kağıdı üzerinde alınmış ve iplikleri bistüri yardımıyla kesilmiştir (Şekil 3.29). Steril edilen tohumlar içlerinde besi ortamı bulunan kültür kaplarına ekilmiştir.



Şekil 3.27. Tohumların paketlenmesi.



Şekil 3.28. Tohumların sterilizasyonu.



Şekil 3.29. Tohumların ekilmesi.

3.2.3.1.6. Tohumların simbiyotik kültür ortamında ekilmesi

Orkide tohumlarının çimlenmesinde etkisi olduğu bilinen ve bu çalışmada kullanılan *Rhizoctonia* sp. fungusları önceden içinde PDA olan petri kaplarına ekilmiş olup, 10 günlük olunca mantar delici ile 0.5 cm'lik diskler alınmıştır. Alınan her disk simbiyotik besi ortamları olan YO, MYO ve PDA içeren petri kaplarının bir yanına yerleştirilmiştir. Petriler 24°C'de ve karanlıkta birkaç gün inkube edilmiştir. Tohum ekimi ise petrinin fungusun olmadığı diğer yanına yapılmıştır. Petriler ilk protokorm görülünceye kadar 23±1°C sıcaklıkta ve karanlıkta bekletilmiş ve ilk protokorm oluştuktan sonra 16/8 saat aydınlık/karanlık fotoperiyod sağlayan doku kültürü laboratuvarı iklim odasında bekletilmişlerdir. Protokormlardan sonra oluşan sürgünler yine tohum ekimlerinin yapılmış olduğu besi ortamları ve bulaştırıldıkları funguslar ile aynı içeriği içeren taze besi ortamlarına aktararak iklim odasında tutulmuşlardır. Alt kültüre alma işlemleri ayda bir kez yapılmıştır.

3.2.3.2. Orkide tohumlarının asimbiyotik kültür ortamlarında çimlendirilmesi

3.2.3.2.1. Asimbiyotik kültür ortamlarının hazırlanması

Besi ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962), ½ MS, 1/10 MS, KC (Knudson, 1950) ve VWD (Van Waes ve Debergh, 1986) ortamları kullanılmıştır. (Çizelge 3.8.).

MS, KC ve VWD ortamları temel olarak kullanıldıklarında bileşiminde bulunan maddelerin miktarları aynı oranlarda kalırken; ½ MS ve 1/10 MS ortamlarında ise, içeriğindeki maddelerin tamamının, belirtildiği gibi ½ ve 1/10 oranlarında azaltılmasıyla seyreltik besi ortamları hazırlanmıştır. Tüm ortamlar için 6 gr/lt agar kullanılmış; pH 1 N HCl ve 1 N NaOH ile 5.8'e ayarlandıktan sonra 121°C sıcaklıkta 1.2 atmosfer basınçta 20 dakika otoklav edilmiştir. Hazırlanan tüm besi ortamları kapaklı cam kavanozlara dökülmüştür.

Çizelge 3.8. Asimbiyotik kültür ortamlarında (VWD, KC, MS) yer alan maddeler ve miktarları

Ortamda yer alan maddeler		Madde miktarları (mg/lt)		
		VWD	MS	KC
Makro elementler	NH ₄ NO ₃	370	1650	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	60	-	-
	KNO ₃	400	1.900	-
	KH ₂ PO ₄	300	170	250
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	500
	CaCl ₂ .2H ₂ O	-	440	-
	MgSO ₄ .7H ₂ O	100	370	250
Mikro elementler	Na-EDTA	27.8	27.8	-
	FeSO ₄ .7H ₂ O	37.3	37.3	25
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	10	8.6	-
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	-
	H ₃ BO ₃	10	6.2	-
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	0.025	-
	CoCl ₂ .6H ₂ O	-	0.025	-
Aminoasitler	KI	-	0.83	-
	Glisin	-	20	-
Vitaminler	L. Gluta min	100	-	-
	Nikotinik asit	2	0.5	-
	Pyridoksine HCl	0.5	0.5	-
	Thia min HCl	0.5	0.1	-
	Biotin	0.05	-	-
	Myo-inositol	1000	100	-
Şeker	Sakkaroz	20	30	20

3.2.3.2.2. Genel sterilizasyon işlemleri

Asimbiyotik çimlendirme safhasında uygulanan genel sterilizasyon yöntemleri simbiyotik çimlendirme koşullarında bahsedilen metod ile aynıdır (Bkz. 3.2.3.1.4.).

3.2.3.2.3. Tohumların yüzeysel sterilizasyonunun yapılması

Asimbiyotik kültür ortamlarına ekilmeden önce, orkide tohumlarına uygulanan sterilizasyon işlemleri simbiyotik çimlendirme koşullarında bahsedilen işlemler ile aynıdır (Bkz. 3.2.3.1.5.).

3.2.3.2.4. Tohumların asimbiyotik kültür ortamında ekilmesi

In vitro koşullarda tohumların ekildiği, protokormların oluştuğu ve fidelerin geliştiği ortamlar, besi yerleri temel ortamlar olup; ortamların içine hiçbir aşamada hormon ilavesi yapılmamıştır. Ayrıca tohumun çimlenme, protokorm ve fide aşamalarında da farklı ortamlar kullanılmamış olup ekimden fide aşamasına kadar aynı ortamla devam edilmiştir. Tohum ekimi yapılan kavanozlar $23\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve karanlıkta bekletilmiş olup, protokorm oluşmasıyla birlikte karanlıktan 16/8 saat aydınlık/karanlık ortama alınmışlardır. Alt kültüre alma işlemi ayda bir tekrarlanmıştır.

3.2.3.2.5. Gelişen bitkiciklerin toprağa aktarılması

In vitro koşullarda, aseptik şartlarda ve sentetik besi ortamında kontrollü bir şekilde gelişen ve sürgün, kök ve yumru oluşturan bitkiciklerin toprağa ilk aktarımları yine laboratuvar koşullarında gerçekleşmiştir. Bitkiciklerin toprağa aktarılmasında göz önüne alınan ilk kriter yeterli büyüklükte yaprak ve kök büyüklüğüne sahip olmasıdır (Şekil 3.30). Bu özellikleri taşıyan bitkiciklerin içinde bulunduğu kavanozların ilk önce kapakları steril kabin içinde açılarak üzerileri streç filmle kaplanmış ve iğne ile delinerek birkaç gün alıştırılmaları yapılmıştır. Transferlerin yapıldığı kaplar olarak violler kullanılmış ve önceden % 30'luk sodyum hipoklorit çözeltisi ve arkasından çeşme suyu ile yıkanmıştır. Harç ise her orkide türüne ait olan rizosfer toprağından % 50 ve ince dişli kumdan % 50 oranlarında kullanılarak yapılmıştır. Dikim harcı kullanılmadan önce 121°C sıcaklıkta 1.2 atmosfer basınçta arka arkaya iki gün 60 dakika otoklav edilmiştir. Fideler hazırlanan steril harç içine dikilmeden önce biraz çeşme suyu ile yumru ve kökleri yıkanarak birkaç saniyelik, ticari ismi Benlate olan ve etken madde olarak % 50 benomyl içeren fungusit ile 50 gr/100 lt oranında muamele edilmiştir (Şekil 3.31). Dikimi yapılan fidelerin üzeri beyaz polietilen sera örtüsü ile kapatılmış ve içine sürekli nem uygulanmıştır. Bir süre sonra örtü kaldırılarak dış ortamla teması sağlanmıştır (Şekil 3.32).



Şekil 3.30. Kavanozdan çıkarılan bitki.



Şekil 3.31. Köklerin sterilizasyonu.



Şekil 3.32. Bitkicğin dikim harcına dikilmesi.

3.2.4. Orkide tohumlarının in vivo koşullarda çimlendirilmesi

Orkide tohumlarının in vivo koşullarda çimlendirilmesinde simbiyotik ve asimbiyotik kültür ortamlarının etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

3.2.4.1. Simbiyotik kültür ortamlarının hazırlanması

3.2.4.1.1. *Rhizoctonia* sp. funguslarının kültür işlemleri

Rhizoctonia sp. izolatları in vivo koşullarda simbiyotik kültür ortamı olan ekim harcına bulaştırılmak üzere kullanılmıştır. Bunun için PDA ortamına ekilen *Rhizoctonia* fungusları takip edilmiş ve 3 günlük olunca saksı harcına bulaştırılmak üzere, mantar delici ile 0.5 cm büyüklüğünde kültür diski alınmıştır. Fungusların bulaştırıldığı saksı harcı ise iki aşamadan oluşmuştur.

3.2.4.1.2. Saksı harcının hazırlanması

Saksı harcı iki farklı aşamadan geçerek hazırlanmıştır. İlk önce % 96 kum+% 4 mısır unu+% 20 su (v/w) içerecek şekilde karıştırılan harç, 121°C sıcaklıkta 1.2 atmosfer basınçta çalışan otoklavda ayrı iki adet erlenmayerin içinde 60 dakika steril edilmiştir. Hazırlanan bu ilk harcın içine steril kabinde, önceden geliştirilen ve 0.5 cm çapında kesilen 3 günlük funguslar ayrı ayrı bulaştırılmış olup elde edilen harç 30 gün süresince karanlıkta ve 24°C sıcaklıkta çalışan inkubatörde bekletilmiş ve ara ara steril kabinin içinde karıştırılmıştır. Sıcaklığın *R. solani*'nin canlı kalması üzerindeki etkisinin

araştırıldığı çalışmanın bir kısmında benzer yöntem uygulanmış ve fungusun bulaştırıldığı harçlar değişik derecedeki sıcaklıklarda 40 hafta bekletilmiştir (Papavizas ve ark., 1975).

İkinci harç ise her tür için ayrı hazırlanmış olup, orkide türüne ait rizosfer toprağından % 50 ve ince dişli kumdan % 50 oranlarında karıştırılarak oluşturulmuştur. Bu karışım 121°C sıcaklıkta 1.2 atmosfer basınçta arka arkaya iki gün 60 dakika otoklav edilmiştir. Hazırlanan harcın içine 30 gün bekletilen ilk harçtan % 10 oranında eklenmiş olup, meydana gelen bu harç önceden % 20'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ve çeşme suyundan geçirilmiş saksılara doldurulmuştur.

3.2.4.1.3. Genel sterilizasyon işlemleri

Çalışma süresince uygulanan genel sterilizasyon yöntemleri in vitro ve in vivo şartlarda ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Fungusların kültüre alınma işlemleri için steril kabin içinde çalışılırken, in vitro çalışmalarında esas alınan sterilizasyon işlemleri (Bkz. 3.2.3.1.4.) yerine getirilmiştir.

3.2.4.1.4. Tohumların yüzey sterilizasyonunun yapılması

Tohum kabuğunun aşınması ve dolayısıyla ortamdaki su ve besinlerin tohum tarafından geçirilmesini kolaylaştırmak ve yüzeysel sterilizasyonu sağlamak için in vitro çalışmasındaki sterilizasyon yöntemi direkt toprağı ekim anında da uygulanmıştır (Bkz. 3.2.3.1.5.).

3.2.4.1.5. Tohumların simbiyotik kültür ortamında ekimi

Steril edilen tohumlar içinde harç bulunan saksılara ekilmiş olup, üzerileri tohum büyüklükleri ile orantılı olarak kapatılmıştır. Ekimi yapılan saksılar karanlıkta 24°C sıcaklıkta bekletilmiş olup ihtiyaç duyuldukça çeşme suyu ile sulanmıştır.

3.2.4.2. Orkide tohumlarının asimbiyotik kültür ortamlarında imlendirilmesi

3.2.4.2.1. Saksı harcının hazırlanması

Tohumların ekildiği harç, her orkide türüne ait rizosfer toprağından ayrı ayrı olarak % 50 ve ince dişli kumdan % 50 oranlarında karıştırılarak oluşturulmuştur. Bu karışım 121°C sıcaklıkta 1.2 atmosfer basınçta arka arkaya iki gün 60 dakika otoklav edilmiştir.

3.2.4.2.2. Genel sterilizasyon işlemleri

Çalışma dışarıda gerçekleştirildiği için sadece tohum, harç ve saksı sterilizasyonu yapılmıştır.

3.2.4.2.3. Tohumların yüzey sterilizasyonunun yapılması

In vitro çalışmasındaki tohumların sterilizasyon yöntemi toprağa ekim anında da uygulanmıştır (Bkz. 3.2.3.1.5.).

3.2.4.2.4. Tohumların asimbiyotik kültür ortamında ekimi

Tohum ekimi in vivo koşullarda simbiyotik olarak ekilen tohumlarda olduğu gibi yapılmıştır.

3.2.5. Verilerin değerlendirilmesi

Çimlenme ve gelişimlerle ilgili veriler, tohum ekiminden yumru oluşumuna kadar takip edilen süreçte değerlendirmeye alınmıştır. Denemelerde tüm sonuçların görülebilmesi için; çimlenmeden başlayan protokorm ve sürgün oluşumuyla devam edip, bitkicik oluşumuna kadar tüm oluşumlar ayrı ayrı ele alınmıştır. Tohumdan

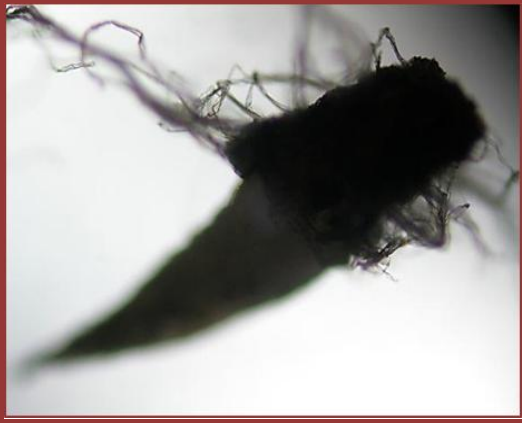
sonraki gelişimler bir skala şeklinde verilmek istendiğinde Şekil 3.33, 3.34, 3.35, 3.36, 3.37 ve 3.38’de görüldüğü gibi gruplandırılarak takip edilmiştir.



Şekil 3.33. Stero mikroskop altında tohum (10X).



Şekil 3.34. Stero mikroskop altında çimlenme (10X).



Şekil 3.35. Stero mikroskop altında protokorm (4X).



Şekil 3.36. Besi ortamında protokorm gelişimi.



Şekil 3.37. Sürgün gelişimi.



Şekil 3.38. Köklü ve yumrulu sürgün gelişimi.

3.2.5.1. Sağlam protokorm oranı (%)

Kararan protokormların toplam protokormlardan ayrılmasıyla elde edilen ve toplam tohum sayısına oranlanarak bulunan değerdir.

3.2.5.2. Kararmış protokorm oranı (%)

Çimlenen tohumların oluşturdukları kararmış protokormların toplam tohum sayısına oranlanmasıyla yüzde miktarı hesaplanmıştır.

3.2.5.3. Toplam protokorm oranı (%)

Çimlenen tohumların şişkinleşerek çiviye benzer oluşturdukları ilk yapıdır. Sağlam ve kararan protokormların toplamı olup, tohum sayısına oranlanarak yüzde oranlarının hesaplanmasıyla elde edilmiştir.

3.2.5.4. Sağlıklı protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)

Kararmış protokormların toplam protokorm sayısından ayrılmasıyla elde edilen sürgün sayısı oranlarını ifade etmektedir.

3.2.5.5. Tüm protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)

Gelişen sürgünlerin tüm protokormların sağlıklı ya da kararmış olup olmadığına bakılmaksızın toplam protokorm sayısına oranlanmasıyla elde edilen değerdir.

3.2.5.6. Tohumdan sürgün oluşma oranı (%)

Oluşan sürgünlerin tohum sayısına oranlanmasıyla elde edilen değerdir.

3.2.5.7. Sağlıklı protokormdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)

Kararmış sürgünlerin; kararmış protokormların toplam protokormdan ayrılarak arta kalan sağlıklı protokorm sayısına oranlanmasıyla elde edilmiştir.

3.2.5.8. Tüm protokormdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)

Gelişmesi sırasında ya da çıkışından itibaren kararmış olarak gelişen kararmış sürgünlerin, oluşan toplam protokorm sayısına oranlanmasıyla elde edilen değerdir.

3.2.5.9. Tohumdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)

Oluşan kara sürgünlerin tohum sayısına oranlanmasıyla elde edilen değerdir.

3.2.5.10. Tüm protokormdan oluşan köklü sürgün oranı (%)

Oluşan köklü sürgünlerin toplam protokorm sayısına oranlanmasıyla elde edilen değerdir.

3.2.5.11. Sürgünlerde kök oluşum oranı (%)

Kök geliştiren sürgünlerin toplam sürgün sayısına oranlanmasıyla elde edilen değerdir.

3.2.5.12. Tüm protokormdan oluşan yumrulu sürgün oranı (%)

Oluşan yumrulu sürgünlerin toplam protokorm sayısına oranlanmasıyla elde edilen değerdir.

3.2.5.13. Sürgünlerde oluşan yumru oranı (%)

Yumru geliştiren sürgünlerin toplam sürgün sayısına oranlanmasıyla elde edilen değerdir.

3.2.5.14. Kallus benzeri oluşumların oranı (%)

Ekilen tohumların çimlendikten sonra protokorm oluşturmayıp; kallus vb. oluşumları göstermesiyle ortaya çıkan yapılardır. Bu yapıların tohum sayısına oranlanmasıyla kallus oranı elde edilmiştir.

3.2.5.15. Kararmış kallus benzeri oluşumların oranı (%)

Kallus vb. yapıların bazılarının kararması ve kararmış olan bu yapıların tohum sayısına oranlanmasıyla elde edilen değerdir.

3.2.5.16. Çimlenme süresi (gün)

Tohum ekiminden itibaren çimlenmeye kadar geçen süreyi ifade etmektedir.

3.2.5.17. Protokorm oluşum süresi (gün)

Tohum ekiminden itibaren protokorm oluşumuna kadar geçen süreyi ifade etmektedir.

3.2.5.18. Sürgün oluşum süresi (gün)

Tohum ekiminden itibaren sürgün oluşumuna kadar geçen süreyi ifade etmektedir.

3.2.5.19. İstatistiki değerlendirmeler

Üzerinde durulan özellikler bakımından tanımlayıcı istatistikler; ortalama ve standart hata ifade edilmiştir. Bu özellikler bakımından, tür ve ortam arasında fark olup olmadığını belirlemek amacıyla, “tesadüf parselleri deneme tertibinde faktöriyel düzende varyans analizi” yapılmıştır. Ölçümü yapılan yüzde değişkenlerine “varyans analizi öncesi aç ı transformasyonu yapılmıştır”. Varyans analizini takiben farklı tür ve ortamları belirlemede; “Duncan çoklu karşılaştırma testi” kullanılmıştır. Hesaplamalarda istatistik önemlilik düzeyi % 5 olarak alınmış ve hesaplamalar SPSS (ver:13) istatistik paket programında yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Orkide Tohumlarının In vitro Koşullarda Çimlendirilmesi

4.1.1. Simbiyotik çimlenme

4.1.1.1. Fungus izolasyonu

Çalışmada biri yumrulardan, üçü rizosfer toprağından elde edilmek üzere toplam dört ayrı fungus izolasyon yöntemi denenmiştir. Denemede kullanılan orkide türlerine ait yumru ve rizosfer toprağı örneklerinin sayısı homojenlik göstermemektedir. Buna göre bitki türleri üzerinde kullanılan tüm izolasyon yöntemlerinden elde edilen funguslar genel olarak bir çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Yumru ve rizosfer toprağında farklı yöntemlerle elde edilen funguslar

Orkide türleri	Fungus izolasyon yöntemleri			
	Şekerpancarı ile tuzaklama yöntemi	Toprak kalıntı yöntemi	Dökme plaka yöntemi	Yumru yöntemi
<i>A. pyramidalis</i>	B, C, D	B, C	B, C	C
<i>D. iberica</i>	C, D	C	B, C	A, B, C
<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	B, C	C	A, B, C, F	A, B, C
<i>D. umbrosa</i>	B, C, G	C	A, B, C, F, G	A, B, C, E
<i>O. palustris</i>	B, C, D	A, B, C	A, B, C	B, C, D, E, F, G
<i>O. straussii</i>	-	-	-	-

A: *Alternaria* sp., B: *Aspergillus* sp., C: *Fusarium* sp., D: *Macrophomina* sp., E: *Rhizoctonia* sp., F: *Trichoderma* sp., G: *Verticillium* sp.

Çizelge 4.1’den anlaşıldığı gibi kullanılan tüm yöntemlerde en çok izole edilen fungus *Fusarium* sp.’dir. Kullanılan yöntemler sonucunda *O. straussii* türüne ait tanılanan bir fungus belirlenmemiştir. Teşhis sırasında özellikle *Rhizoctonia* sp. arandığı için fungal özellik belirten yapılar dikkate alınmış olup elde edilen diğer izolatların tür teşhisi yapılmamıştır. Bilinen fungusların yanı sıra izolat olarak elde edilen fakat mikorizal özellik göstermeyeceği kanısına varılan bazı izolatlar da bulunmuş fakat kültüre alınmamıştır. İzolasyonu yapılan rizosfer toprağı ve yumrularda bazen tek cins fungus bulunurken bazen birkaç fungusun bir arada olduğuna da rastlanılmıştır. İzolasyon ortamlarının içine antibakteriyel olan streptomycin koyulmasına rağmen

izolasyonların neredeyse tamamında bakteriyel bulaşıklar, *Penicillium* ve *Rhizopus* fungusları gözlenmiştir.

Simbiyotik çimlendirme çalışmalarında ortama inokule edilen binükleuslu (2 nükleuslu) *Rhizoctonia* ve *Rhizoctonia solani* funguslarının bulunması oldukça güç olmuştur. Simbiyotik ortamlarda inokule edilen *Rhizoctonia solani* AG-3 fungal izolatu, su-agar petrilerine ekimi yapılan *D. umbrosa* türüne ait yumru eksplantlarından elde edilirken (Şekil 4.1); binükleuslu *Rhizoctonia*, PDA petrilerine ekilmiş olan *O. palustris* türüne ait yumru eksplantlarından izole edilmiştir (Şekil 4.2).



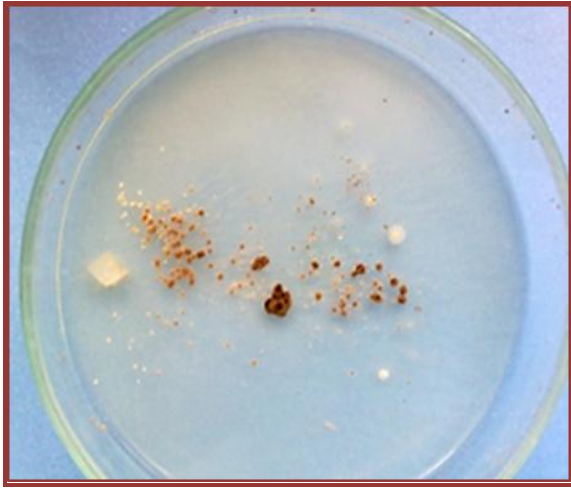
Şekil 4.1. *Rhizoctonia solani* ve elde edildiği *Dactylorhiza umbrosa* türüne ait yumru.



Şekil 4.2. Binükleuslu *Rhizoctonia* ve elde edildiği *Orchis palustris* türüne ait yumru.

4.1.1.2. Simbiyotik kültür

R. solani (R) ve binükleuslu *Rhizoctonia* (2R) funguslarının bulaştırıldığı YO, MYO ve PDA besi ortamlarına ekilen *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* ve *O. straussii* türlerine ait tohumların tamamında çimlenme, protokorm ve bitkicik oluşumu gözlenmeyip, yalnızca *D. iberica*, *D. umbrosa* ve *O. palustris* türlerinde başarı sağlanmıştır. *A. pyramidalis*, *D. romana* subsp. *georgica* ve *O. straussii* türleri ise çimlenme ve takiben diğer gelişmeleri sağlayamadığı için istatistik dışı bırakılmış ve analizlere dâhil edilmemiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.3. R+MYO kültür ortamındaki *D. romana* subsp. *georgica* tohumları.



Şekil 4.4. R+MYO kültür ortamındaki *A. pyramidalis* tohumları.

Elde edilen veriler, 2R'nin bulaştırıldığı YO ve MYO besi ortamları içinde ekilen *D. iberica*, *D. umbrosa* ve *O. palustris* türlerinde tespit edilmiştir. Besi ortamları açısından değerlendirildiğinde kullanılan besi ortamları arasından PDA ortamında; fungal izolatlar göz önüne alındığında *R. solani* fungusunun bulaştırıldığı ortamların hiçbirinde çimlenme, protokorm ve dolayısıyla bitkicik gelişiminin olmadığı belirlenmiştir. Bu yüzden aynı şekilde PDA besi ortamı ile *R. solani* fungusunun dâhil edildiği denemeler istatistik olarak değerlendirilmemiştir. İncelenen kriterler besin ortamı x tür interaksiyonu göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. Çimlenme, fungusun petri kapları içindeki besi ortamına çabuk yayılmasından dolayı net olarak belirlenememiş olup, protokorm ve sürgün oluşumu gözlenebilmiştir.

4.1.1.3. Kararmış protokorm oranı (%)

Oluşan protokormların bir kısmı fungus baskısı ile kararmış ve yumuşak bir yapı oluşturarak canlılıklarını kaybetmiştir. Bu protokormlar da sayılan toplam protokormların içinde yer almış olup açıkça görülmesi için istatistik olarak ayrıca değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2).

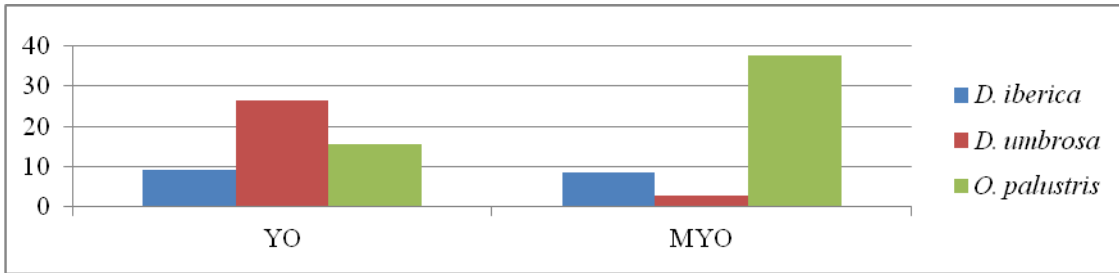
Besi ortamı olarak kullanılan yulaf ve modifiye yulaf ortamlarına ekilen *D. iberica*, *D. umbrosa* ve *O. palustris* türlerinin kararan protokorm oluşumu üzerine etkileri incelenmiş olup ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). *D. iberica* türüne ait tohumların YO (% 9.31) ve MYO (% 8.71) içinde oluşturdukları kararan protokormlara ait ortalamalar Şekil 4.5'te gösterilmiş olup; *D. umbrosa* türüne ait kararan protokormların oranı en yüksek % 26.43 değeri ile YO'dan elde edilirken, MYO'dan % 2.99 ile en az ortalama değer kayıt edilmiştir. *O. palustris* türüne ait kararan protokorm ortalama değeri MYO'da % 37.38 olarak bulunmuş olup YO'dan elde edilen değer (% 15.57) ile aralarında anlamlı bir farkın olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).

Çizelge 4.2. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* protokormlarının kararması üzerine etkisi (%)

Ortamlar	<i>D. iberica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>
Yulaf ortamı (YO)	9.31±0.27 a* C**	26.43±0.26 a A	15.57±0.35 b B
Modifiye yulaf ortamı (MYO)	8.71±0.25 a B	2.99±0.11 b C	37.38±0.56 a A

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.5. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* protokormlarının kararması üzerine etkisi (%).



Şekil 4.6. 2R+YO kültür ortamındaki *O. palustris* türüne ait kararmış protokormlar.



Şekil 4.7. 2R+MYO kültür ortamındaki *D. umbrosa* türüne ait kararmış protokormlar.

Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, YO'da *O. palustris* türünden gelişen kararmış protokormların yumuşak ve açık kahverengi olduğu; MYO'da *D. umbrosa* türünden

gelişen kararmış protokormların ise çürümüş görünümlü, koyu kahverengi ve sulu bir yapıya sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.7).

4.1.1.4. Toplam protokorm oranı (%)

2R'nin bulaştırıldığı besi ortamlarında, fungusun hemen hemen tüm ortamı kapladığı ve tohumları tamamen sardığı görülmüştür. Bu yüzden çimlenme çok net olarak görülememiş, veri olarak kayıt altına alınamamıştır. PDA içeren kültürlerde bu durum daha yoğun şekilde fark edilmiş ve tohumları gözle görülmeyecek kadar kapatmıştır (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Bu sebepten dolayı PDA'nın uygulandığı denemelerden bir sonuç alınamamıştır. Sonuç alınamayan bir diğer uygulama ise *R. solani*'nin bulaştırıldığı denemelerdir. *R. solani*'nin yalnızca PDA'da değil, YO ve MYO'ya ekili tohumların üzerinde kümeleştiği, çimlenmeyi ve protokorm oluşumunu engellediği görülmektedir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).



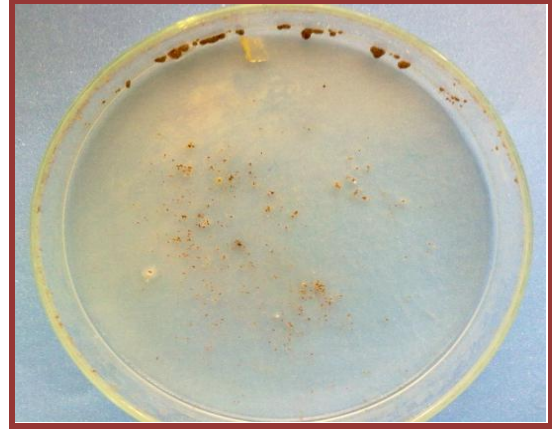
Şekil 4.8. Tohum ekilen R+PDA kültür ortamı.



Şekil 4.9. Tohum ekilen 2R+PDA kültür ortamı.



Şekil 4.10. Tohum ekilen R+YO kültür ortamı.



Şekil 4.11. Tohum ekilen R+MYO kültür ortamı.

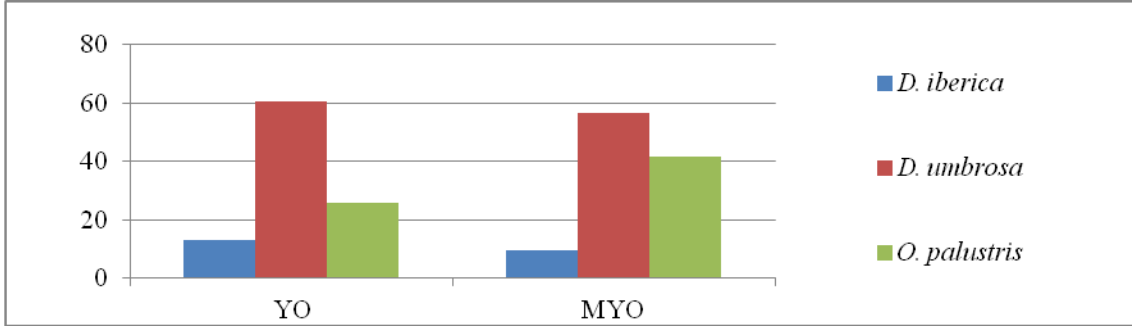
Çizelge 4.3. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin toplam protokorm oluşumu üzerine etkisi (%)

Ortamlar	<i>D. iberica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>
Yulaf ortamı (YO)	12.98±0.38 a* C**	60.74±0.54 a A	25.95±0.29 b B
Modifiye yulaf ortamı (MYO)	9.45±0.81 b C	56.74±0.30 b A	41.84±0.39 a B

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

Besi ortamı olarak kullanılan yulaf ve modifiye yulaf ortamlarına ekilmiş olan *D. iberica*, *D. umbrosa* ve *O. palustris* türlerinin toplam protokorm oluşumu üzerine etkileri incelenmiş olup; toplam protokorm oranına ait ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.3). YO içine ekilmiş olan tohumlara bakıldığında toplam protokorm oranına ait en yüksek ortalama % 60.74 ile *D. umbrosa* türünden elde edilirken en düşük ortalama ise % 12.98 ile *D. iberica* türünden elde edilmiştir. MYO içine ekilen tohumların protokorm oluşturma oranları karşılaştırıldığında ise YO'ya ekilen tohumların performanslarına benzer bir sıralama görülmektedir. En yüksek ortalama % 56.74 ile *D. umbrosa* türünden, en düşük ortalama ise % 9.45 ile *D. iberica* türünden elde edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin toplam protokorm oluşumu üzerine etkisi (%).



Şekil 4.13. 2R+MYO kültür ortamındaki *D. umbrosa* protokormları.



Şekil 4.14. 2R+MYO kültür ortamındaki *O. palustris* protokormları.

Şekil 4.13'te görüldüğü gibi MYO içindeki *D. umbrosa* türüne ait protokormlar son derece sağlıklı ve sürgün gelişimine uygun durumdadır. Bu protokormlar içinde sağlıklı olanlar kadar kararan protokormlar da yer almaktadır. MYO içindeki *O. palustris* türüne ait kararan protokormlar ile sağlıklı protokormların bir arada bulunduğu kültür Şekil 4.14'te yer almaktadır. Kararan protokormların, aynı petri kabı içinde birlikte yer aldıkları sağlıklı protokormları etkilemediği görülmüştür. Bu da kararmanın herhangi bir enfeksiyondan kaynaklanmadığının, fizyolojik bir gelişmenin belirtisi olarak değerlendirilmiştir.

4.1.1.5. Sağlıklı protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)

Kültür ortamlarına ekilen tohumların oluşturdukları toplam protokorm sayısı; sağlıklı ve sağlıklarını kaybedip kararan protokormların toplamından oluştuğu için sürgün ortalama değerleri, daha ayrıntılı şekilde görülebilmesi açısından toplam protokormdan oluşan sürgün sayıları yanında, çürük protokormların genel toplam protokormdan çıkarılarak kalan sağlıklı protokormların oluşturdukları sürgün ortalamaları ile ayrıca değerlendirilmiştir. Sağlıklı protokormlar ve bu protokormlardan oluşan sürgünler oranlanarak yüzde değerleri belirlenmiş olup, veriler istatistik analize tabi tutulmuştur.

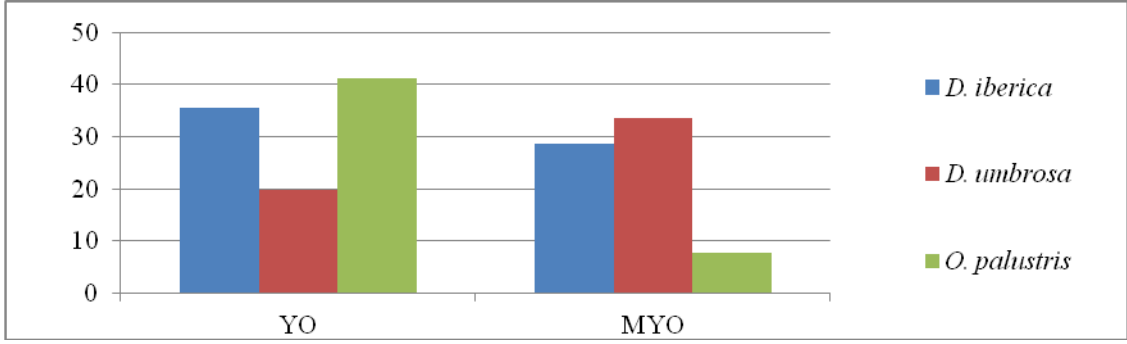
Çizelge 4.4'e göre sağlıklı protokormdan sürgün oluşumuna ait ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Şekil 4.15 incelendiğinde YO ve MYO içinde gelişen protokormlardan en yüksek sürgün oluşum oranının *D. iberica*, *D. umbrosa* ve *O. palustris* türlerinde sırasıyla YO'da % 35.62; MYO'da % 33.66; YO'da % 41.09 olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin sağlıklı protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>D. iberica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>
Yulaf ortamı (YO)	35.62±1.22 a* B**	19.82±0.36 b C	41.09±0.89 a A
Modifiye yulaf ortamı (MYO)	28.57±0.58 b B	33.66±0.54 a A	7.79±0.58 b C

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.15. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerin in sağlıklı protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%).



Şekil 4.16. 2R+YO kültür ortamındaki *O. palustris* türüne ait sürgünler.



Şekil 4.17. 2R+MYO kültür ortamındaki *O. palustris* türüne ait sürgünler.

Sağlıklı protokormlardan elde edilen sürgünler ele alındığında özellikle *O. palustris* türünün YO ve MYO içinde sayısal olarak farklılık gösterdiği göze

çarpmaktadır. Kültür işlemlerinde, sağlıklı protokormların yeni besi ortamına aktarılması sonrasında *O. palustris* türünün sürgünleri YO'da Şekil 4.16'da görüldüğü gibi protokorm sayısına neredeyse eşdeğer oranda gelişmişken; MYO'da protokormların yarısından azının sürgün oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17).

4.1.1.6. Tüm protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)

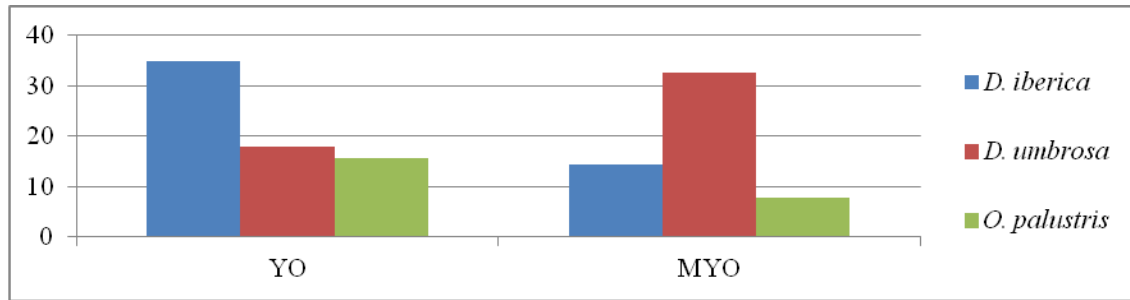
Yapılan çimlenme çalışmalarında kültür ortamlarına ekilen tohumların hepsinde aynı anda ve aynı oranda çimlenme olmadığı görülmüştür. Buna bağlı olarak çimlenen tohumların protokorm ve sürgün oluşturma oranlarında da homojenlik olmamıştır. Ekilen tohumların çimlenme sonrasında oluşan toplam protokorm sayıları; sağlıklı ve sonradan kararıp sağlıklarını kaybeden protokormların toplamından ibaret olup, tüm oluşan protokormlardan sürgün oluşma oranları belirlenmiştir. Bu ortalama değerler oluşan toplam protokormlar ile oluşan sürgünlerin oranlanmasıyla elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin tüm protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>D. iberica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>
Yulaf ortamı (YO)	35.04±1.12 a* A**	18.00±0.51 b B	15.56±0.17 a B
Modifiye yulaf ortamı (MYO)	14.28±0.58 b B	32.59±1.00 a A	7.77±0.59 b C

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.18. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin tüm protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%).

Toplam protokormdan sürgün oluşumu üzerine tür ve besi ortamlarının etkisi incelendiğinde *D. iberica* ve *O. palustris* türlerine ait sürgünlerin en çok YO'da (% 35.04 ve % 15.56); *D. umbrosa* sürgünlerinin MYO'da (% 32.59) geliştikleri

görülmektedir (Şekil 4.18). Toplam protokormdan sürgün oluşumuna ait ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak ($p<0.05$)’e göre önemli bulunmuştur (Çizelge 4.5).



Şekil 4.19. 2R+MYO kültür ortamındaki *D. umbrosa* türüne ait sürgünler.



Şekil 4.20. 2R+YO kültür ortamındaki *D. iberica* türüne ait sürgün başlangıcı.

Şekil 4.19’da görüldüğü gibi kültür ortamı içinde sağlıklı ve kararan protokormlar toplamı değerlendirilip sürgün oluşum oranları belirlenmiştir. MYO ele alındığında en yüksek oran *D. umbrosa* türünde belirlenmiş olup, YO incelendiğinde ise

en yüksek oran *D. iberica* türünün toplam protokormlarından elde edilmiştir. Ancak *D. iberica* türünün protokormlarından elde edilen sürgünler diğer türlerde olduğu kadar istenen özellikte sağlıklı gelişmemiş olup, sadece kısa ve zayıf olarak yaşamlarını devam ettirmiştir (Şekil 4.20).

4.1.1.7. Tohumdan sürgün oluşma oranı (%)

Oluşan sürgünlerin ekilen orkide tohumlarına oranlanmasıyla yüzde miktarı belirlenmiş olup elde edilen veriler istatistik analize tabi tutulmuştur. Sürgünlerin belirli bir boya ve gelişime geldikten sonra gelişmelerinin durduğu; kök ve yumru oluşturmada uzun süre harcandığı ve bu sürede mikorizal fungusun bitki gelişimini engelleyebileceği şüphesi ortaya çıkmıştır.

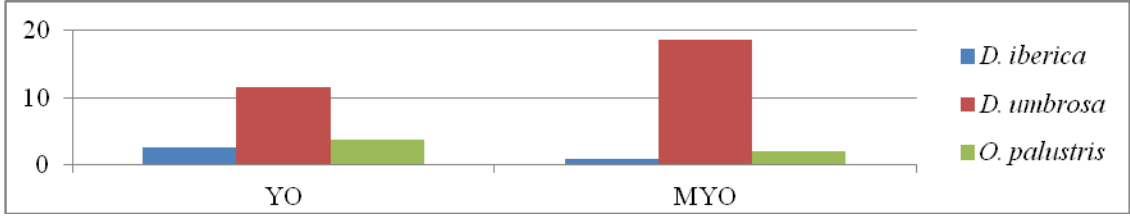
Çizelge 4.6'ya göre, *D. iberica*, *D. umbrosa* ile *O. palustris* türlerine ait tohumların içlerinde YO ve MYO bulunan kültür kaplarına ekilmesiyle gelişen sürgünlerin oransal miktarları arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Türlerin besi ortamlarıyla birlikte sürgün oluşumu üzerine etkisi incelendiğinde *D. iberica* ve *O. palustris* türlerine ait en yüksek sürgün oluşum oranının YO'dan sırasıyla % 2.53 ve % 3.77 olarak elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.21). Buna karşılık *D. umbrosa* türüne ait en yüksek ortalama % 18.71 ile MYO'dan elde edilmiş olup; istatistik olarak YO ile aralarındaki fark önemsiz çıkmıştır ($p<0.05$) (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin tohumdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>D. iberica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>
Yulaf ortamı (YO)	2.53±0.16 a* B**	11.57±0.78 b A	3.77±0.32 a B
Modifiye yulaf ortamı (MYO)	0.79±0.01 b C	18.71±0.36 b A	1.97±0.01 b B

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.21. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin tohumdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%).



Şekil 4.22. 2R+YO kültür ortamındaki *D. umbrosa* türüne ait sürgünler.



Şekil 4.23. 2R+YO kültür ortamındaki *O. palustris* türüne ait sürgünler.

Tohum ekiminden itibaren sürgün gelişiminin başlamasına kadar takip edilen protokormların gelişip sürgün vermesiyle elde edilen ortalama değerler dikkate

alındığında, *D. iberica* türünün sürgün oluşturma oranının en düşük olduğu, sürgünlerin gelişiminin de sayısal verileri destekler nitelikte aynı derecede zayıf olduğu görülmüştür. Ancak Şekil 4.22’de ve Şekil 4.23’te görüldüğü gibi *D. umbrosa* ve *O. palustris* türlerinde sürgünler besi ortamlarında daha sağlıklı olarak gelişmişlerdir.

4.1.1.8. Protokorm oluşum süresi (gün)

Orkide tohumlarının mikorizal fungus ile birlikte petri kapları içindeki kültür ortamlarına ekildiği günden başlayıp ilk protokormun görüldüğü zamana kadar geçen süre kayıt altına alınmıştır ve protokorm oluşum süresi olarak değerlendirilmiştir. Çimlenme, fungusun petri kapları içindeki besi ortamına çabuk yayılmasından dolayı net olarak belirlenememiş olup, protokorm oluşumu gözlenebilmiştir.

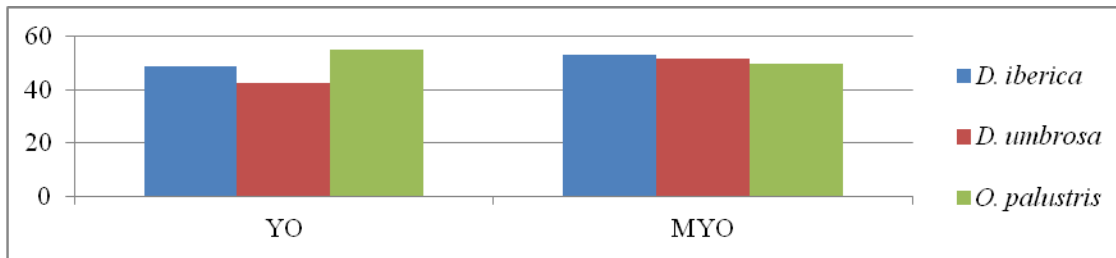
Besi ortamlarının protokorm oluşum süreleri üzerine etkisi incelenmiş olup ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak ($p < 0.05$)’e göre önemli bulunmuştur (Çizelge 4.7). Türlerin protokorm oluşum süresi ortalamalarına bakıldığında; en erken protokorm gelişiminin YO içine ekilmiş olan *D. iberica* ve *D. umbrosa* türlerine ait tohumlardan sırasıyla 48.67 gün ve 42.67 gün ile MYO içinde gelişen *O. palustris* tohumlarından 49.67 gün olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24).

Çizelge 4.7. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin protokorm oluşum süresine etkisi (gün)

Ortamlar	<i>D. iberica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>
Yulaf ortamı (YO)	73.33±0.33 b* A**	66.00±1.00 b B	75.67±0.88 a A
Modifiye yulaf ortamı (MYO)	78.67±0.88 a A	78.33±0.88 a A	63.67±0.88 b B

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.24. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin protokorm oluşum süresine etkisi (gün).

4.1.1.9. Sürgün oluşum süresi (gün)

Orkide tohumlarının mikorizal fungus ile birlikte petri kapları içindeki kültür ortamlarına ekildiği günden başlayıp ilk sürgünün görüldüğü zamana kadar geçen süre kayıt altına alınmıştır ve sürgün oluşum süresi olarak değerlendirilmiştir.

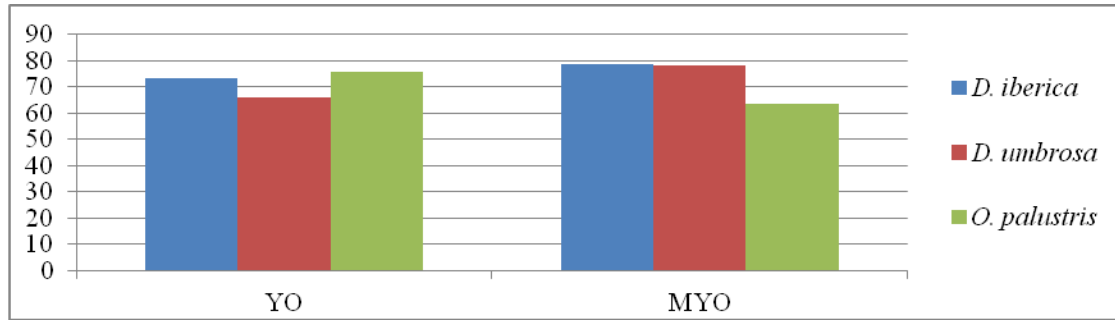
Çizelge 4.8'e göre tür ve besi ortamları interaksyonu tohum ekiminden sürgün oluşturmaya kadar geçen süre üzerinde etkili olmakta ve ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli çıkmaktadır ($p < 0.05$). *D. iberica* ve *D. umbrosa* türlerine ait tohumlar en erken sırasıyla 73.33 günde ve 66.00 günde YO'da sürgün oluşturmaya; *O. palustris* türüne ait tohumlar en erken 63.67 günde MYO'da sürgün oluşturmaktadır (Şekil 4.25).

Çizelge 4.8. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin sürgün oluşum süresine etkisi (gün)

Ortamlar	<i>D. iberica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>
Yulaf ortamı (YO)	48.67±0.88 b* B**	42.67±0.88 b C	55.33±0.67 a A
Modifiye yulaf ortamı (MYO)	53.00±1.15 a A	51.67±0.88 a AB	49.67±0.33 b C

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.25. Besi ortamlarının *D. iberica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* türlerinin sürgün oluşum süresine etkisi (gün).

4.1.2. Asimbiyotik çimlenme

Tohumların kavanoz içine ekilmesinden dolayı çimlenmenin başladığı belirlenmiş ancak mikroskop altında sayımı ve fotoğraflandırılması mümkün olamamıştır. Bu yüzden protokorm ve sürgün oluşumları gözlemlenmiştir.

4.1.2.1. Kararmış protokorm oranı (%)

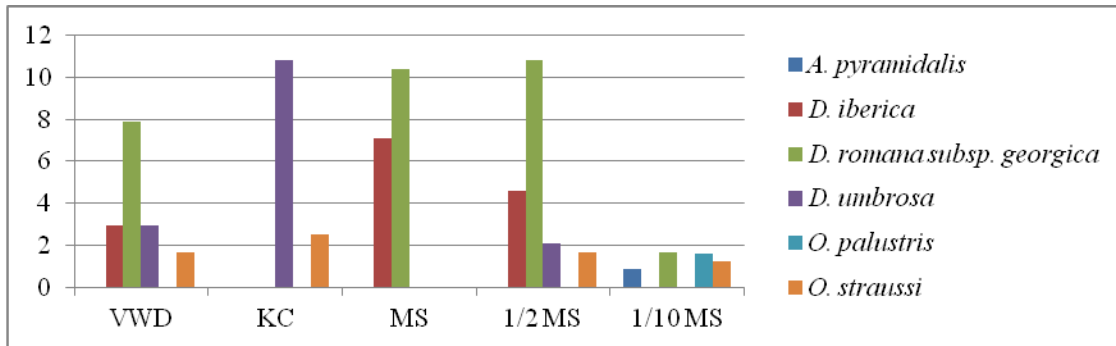
Orkide türlerine ait tohumların asimbiyotik olarak farklı besin ortamlarında oluşturdukları protokormların bir kısmı çürümüştür. Kararmış protokormlara ait ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.9). *A. pyramidalis* ve *O. palustris* türlerine ait kararmış protokorm oluşumu yalnızca 1/10 MS ortamında gerçekleşirken (sırasıyla % 0.83 ve % 1.60); diğer ortamlarda kararmış protokorm oluşmamıştır. *D. iberica* türüne ait tohumlar, KC ve 1/10 MS ortamında kararan protokorm oluşturmamış olup; türe ait en yüksek ortalama (% 7.08) MS besi ortamında elde edilmiştir. *D. romana* subsp. *georgica* ve *D. umbrosa* türlerinde kararmış protokormlara ait ortalama değerler farklı besi ortamlarında % 0.00-10.83 arasında elde edilirken; *O. straussii* türünde ise % 0.00-2.50 arasında değişkenlik göstermiştir (Şekil 4.26).

Çizelge 4.9. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin protokorm kararmasına etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 b* D**	2.92±0.42 c B	7.92±0.42 b A	2.92±0.42 b B	0.00±0.00 D	1.67±0.42 ab C
KC	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 d C	0.00±0.00 d C	10.83±0.42 a A	0.00±0.00 C	2.50±0.00 a B
MS	0.00±0.00 b C	7.08±0.42 a B	10.42±0.42 a A	0.00±0.00 c C	0.00±0.00 C	0.00±0.00 c C
½ MS	0.00±0.00 b D	4.58±0.42 b B	10.83±0.42 a A	2.08±0.42 b C	0.00±0.00 D	1.67±0.42 ab C
1/10 MS	0.00±0.42 a B	0.00±0.00 d C	1.67±0.42 c A	0.00±0.00 c C	1.60±0.00 AB	1.25±0.00 b AB

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

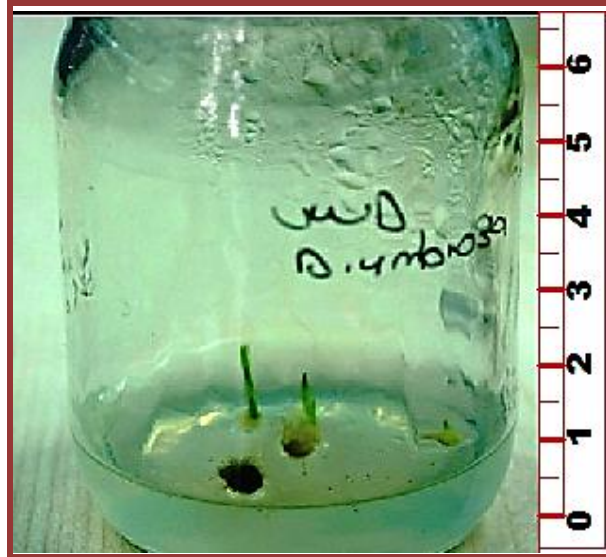
** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.26. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin protokorm kararmasına etkisi (%).



Şekil 4.27. ½ MS içindeki *D. romana* subsp. *georgica* türüne ait kararmış protokormlar.



Şekil 4.28. VWD içindeki *D. umbrosa* türüne ait kararmış protokormlar.

Şekil 4.27’de, ½ MS içindeki *D. romana* subsp. *georgica* örneğinde görüldüğü gibi protokormlar ya başlangıçtan itibaren ya da sonradan kararma göstermiştir. Şekil 4.28’de görüldüğü gibi, gelişen ve sürgün oluşturan protokormların yanında kültür ortamları içinde yer alan kararmış protokormların gelişim süreçleri takip edilmiştir.

4.1.2.2. Toplam protokorm oranı (%)

Çizelge 4.10’a göre beş farklı asimbiyotik kültür ortamına ekilmiş olan *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* ve *O.*

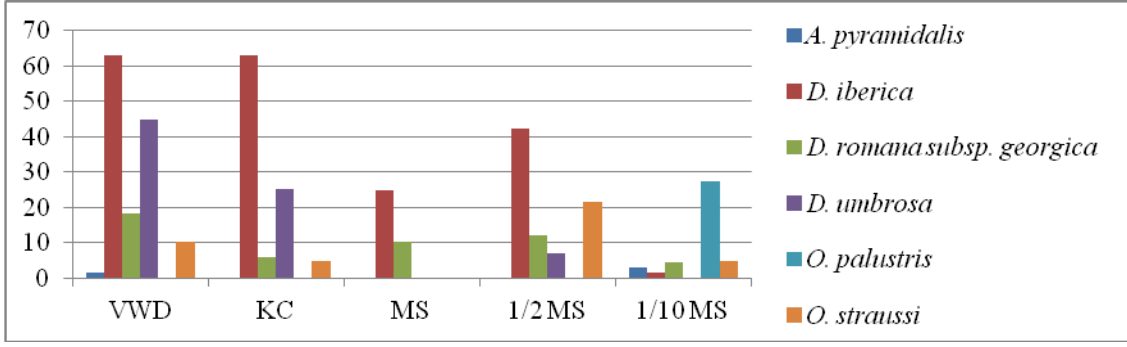
straussii türlerine ait tohumlar protokorm oluşturmada ortamlara bağlı olarak farklılık göstermişlerdir. Besi ortamının türler üzerine etkisi incelendiğinde, toplam protokorm oranına ait ortalamalar arasındaki fark istatistik analizlerinde önemli bulunmuştur ($p<0.05$). *A. pyramidalis* tohumlarının farklı besli ortamlarındaki protokorm oluşturma oranına ait en yüksek ortalama % 2.92 olup 1/10 MS ortamından elde edilirken ½ MS, MS ve KC ortamlarında gelişme kayıt edilmemiştir. *D. iberica* türüne ait tohumlardan ise en yüksek toplam protokorm oluşma oranına ait ortalama bu türün VWD ve KC ortamlarına ekilmesiyle elde edilmiş olup % 62.92 olarak kayıt edilmiştir. *D. iberica* türüne ait en az toplam protokorm oranı ise 1/10 MS ortamına ekilen tohumlardan % 1.67 olarak belirlenmiştir. *D. romana* subsp. *georgica* türüne ait tohumlarda ise protokorm oluşumuna ait en yüksek ve en düşük ortalama % 18.33 (VWD) ile % 4.58 (1/10 MS) arasında değişkenlik göstermiştir. *D. umbrosa* türünün tohumları ise MS ve 1/10 MS ortamlarında protokorm geliştirememiş olup en yüksek ortalama VWD ortamında % 45.00 oranında oluşmuştur. *O. palustris* türüne ait tohumlar yalnız 1/10 MS ortamında ve % 27.47 oranında protokorm geliştirmiş olup; diğer dört besli ortamında başarı elde edilememiştir. *O. straussii* türünün tohumları ise en yüksek toplam protokorm oranına ait ortalamayı (% 21.67) ½ MS ortamında ekilmesiyle elde etmiştir (Şekil 4.29).

Çizelge 4.10. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin toplam protokorm oranına etkisi (%)

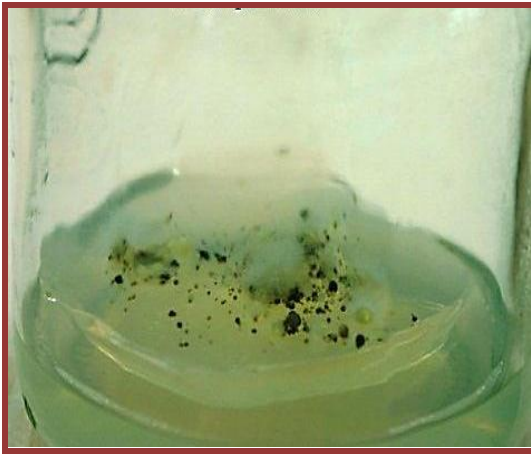
Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	1.67±0.42 b* E**	62.92±0.83 a A	18.33±0.42 a C	45.00±0.72 a B	0.00±0.00 b E	10.42±0.83 b D
KC	0.00±0.00 c D	62.92±0.42 a A	5.83±0.42 d C	25.42±0.42 b B	0.00±0.00 b D	50.00±0.72 bc C
MS	0.00±0.00 c C	25.00±0.72 c A	10.42±0.42 c B	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 c C
½ MS	0.00±0.00 c D	42.50±0.72 b A	12.08±0.42 b C	7.08±0.42 c CD	0.00±0.00 b D	21.67±5.42 a B
1/10 MS	2.92±0.42 a C	1.67±0.42 d C	4.58±0.83 d B	0.00±0.00 d D	27.47±0.07 a A	4.78±0.52 bc B

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.29. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana subsp. georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin toplam protokorm oranına etkisi (%).



Şekil 4.30. VWD içindeki *D. iberica* türüne ait protokormlar.



Şekil 4.31. 1/2 MS içindeki *D. umbrosa* türüne ait protokormlar.

Toplam protokorm denildiğinde sağlıklı ve kararan protokormların birarada bulunması anlaşılmaktadır. Şekil 4.30'da, *D. iberica* türünün toplam protokorm değerine ait en yüksek ortalamalardan biri olan VWD ortamındaki protokormlar görülmektedir. Şekil 4.31'e göre 1/2 MS ortamındaki *D. umbrosa* türü örneği ile diğer türlerin çeşitli ortamlarda geliştirdiği ve toplam ifadesinden de anlaşılacağı gibi sağlıklı ve kararan protokormlar görülmektedir.

4.1.2.3. Sağlıklı protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)

Çizelge 4.11'e göre oluşan toplam protokormlardan kararmış protokormların ayrılmasıyla elde edilen sağlıklı protokormlardan oluşan sürgün ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemli çıkmıştır ($p < 0.05$). *A. pyramidalis* türüne ait sağlıklı protokormdan sürgün oluşmazken; *D. romana subsp. georgica* ve *O. palustris* türlerine

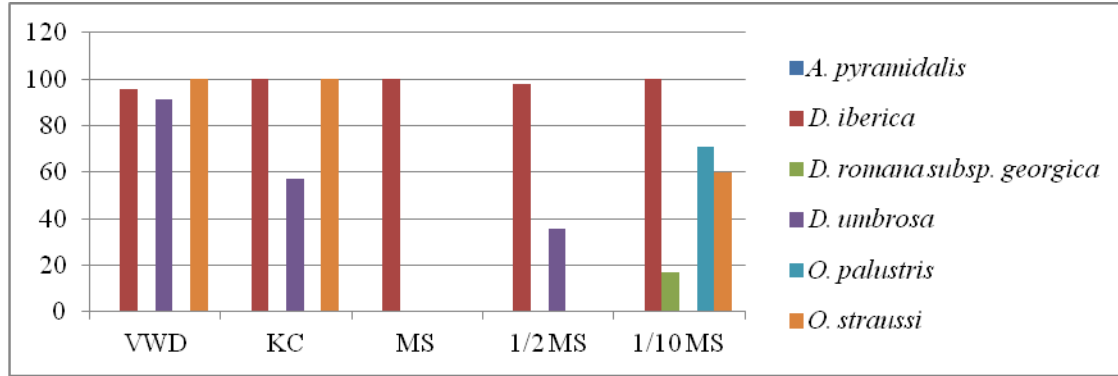
ait sağlam protokormlardan yalnızca 1/10 MS ortamında sırasıyla % 16.67 ve % 70.76 oranlarında sürgün oluşmuştur. *D. iberica* ve *O. straussii* türlerine ait sağlam protokormların tamamından (% 100.00) sürgün elde edilmiştir. % 100 sürgün elde edilen ortamlar *D.iberica* türünde KC, MS ve 1/10 MS; *O. straussii* türünde VWD ve KC olmuştur. *D. umbrosa* türünde ise MS ve 1/10 MS besi ortamlarında sürgün oluşumu elde edilemezken; en yüksek ortalama % 91.09 olarak VWD ortamından elde edilmiştir (şekil 4.32).

Çizelge 4.11. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin sağlıklı protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 D**	95.88±1.14 b* B	0.00±0.00 a D	91.09±0.09 a C	0.00±0.00 b D	100.00±0.00 a A
KC	0.00±0.00 C	100.00±0.00 a A	0.00±0.00 a C	57.07±1.26 b B	0.00±0.00 b C	100.00±0.00 a A
MS	0.00±0.00	100.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c
½ MS	0.00±0.00 C	97.74±1.13 ab A	0.00±0.00 a C	35.55±2.22 c B	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 c C
1/10 MS	0.00±0.00 C	100.00±0.00 a A	16.67±16.67 a C	0.00±0.00 d C	70.76±1.17 a B	59.87±1.94 b B

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



şekil 4.32. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin sağlıklı protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%).

Çizelge 4.11'te görüldüğü gibi birkaç tür bazı ortamlarda protokormlardan sürgün oluşturamamış olsa da bazı türler de % 100 başarı göstermiştir. *O. palustris* türü beş farklı ortam arasından sadece 1/10 MS ortamında sürgün geliştirmiştir (şekil 4.33). Protokormdan en çok sürgün oluşturana türlerden biri de *D. iberica* türü ise önce zayıf olarak beliren sürgünlerin zamanla kararıp canlılığını kaybetmesiyle dikkat çekmiştir (şekil 4.34).



Şekil 4.33. 1/10 MS içindeki *O. palustris* türüne ait sağlıklı protokormlardan oluşan sürgünler.



Şekil 4.34. VWD içindeki *D. iberica* türüne ait sağlıklı protokormlardan oluşan sürgünler.

4.1.2.4. Tüm protokormdan elde edilen sürgün oranı (%)

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi beş farklı besi ortamına ekilen orkide tohumlarının toplam protokormlarından gelişen ortalama sürgün sayıları oranı arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Şekil 4.35’e göre *A. pyramidalis*, *D. romana* subsp. *georgica* ve *O. palustris* türlerine ait tohumların ekilmiş oldukları besi ortamlarında tüm protokormlarda sürgün gelişimi sadece 1/10 MS

ortamında ve sırasıyla % 27.83, % 6.67 ve % 29.37 oranında gerçekleşmiş olup diğer besi ortamlarından veri elde edilememiştir. *D. iberica* türünde ise KC ve 1/10 MS ortamlarında oluşan protokormların tamamında (% 100.00) sürgün gelişimi gözlenmiştir. Diğer ortamlarda da sürgün gelişimi gözlenmiş olup, en düşük ortalama MS ortamında % 71.70 olarak tespit edilmiştir. *D. umbrosa* türüne ait en yüksek sürgün ortalaması VWD ortamında % 72.58 olarak belirlenmiş olup MS ve 1/10 MS ortamlarında sürgün gelişimi elde edilememiştir.

Çizelge.4.12. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tüm protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%)

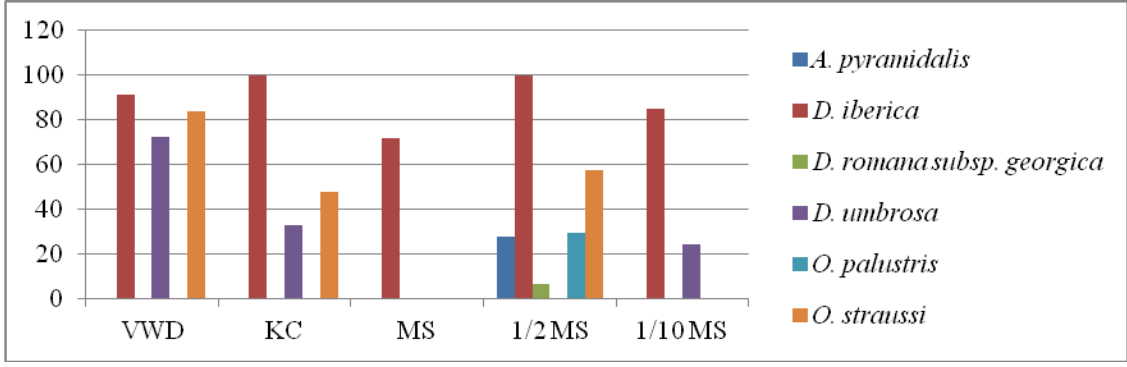
Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 b* C**	91.40±0.61 b A	0.00±0.00 a C	72.58±13.33 a B	0.00±0.00 b C	84.12±3.30 a AB
KC	0.00±0.00 b C	100.00±0.00 a A	0.00±0.00 a C	32.78±1.47 b C	0.00±0.00 b C	47.78±7.78 b B
MS	0.00±0.00 b B	71.70±1.07 d A	0.00±0.00 a B	0.00±0.00 c B	0.00±0.00 b B	0.00±0.00 c B
½ MS	0.00±0.00 b C	85.28±0.25 c A	0.00±0.00 a C	24.44±4.44 b B	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 c C
1/10 MS	27.83±14.71 a C	100.00±0.00 a A	6.67±6.67 a D	0.00±0.00 c D	29.37±0.45 a C	57.70±1.94 b B

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

O. straussii türünün tohumlarından gelişen protokormların oluşturdıkları sürgünlere ait en yüksek ortalama % 84.12 oranıyla VWD ortamından elde edilmiş olup, MS ve ½ MS ortamından hiçbir başarı elde edilememiştir.

Tüm protokormlardan gelişen sürgün oranları dikkate alındığında *O. palustris* ve *D. iberica* türlerinin farklı ortamlarda daha başarılı oldukları görülmektedir. Ancak *O. palustris* ve diğer türlere ait protokormların sağlıklı sürgünler geliştirdiği görülürken (Şekil 4.36), *D. iberica* türüne ait protokormlardan gelişen sürgünlerin çok sayıda, fakat zayıf geliştikleri, kök ve yumru gelişimi gibi ileriki aşamalara geçemediği gözlenmiştir (Şekil 4.37).



Şekil 4.35. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana subsp. georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tüm protokormdan sürgün oluşturma oranına etkisi (%).



Şekil 4.36. 1/10 MS içindeki *O. straussii* protokormlarına ait sürgünler.



Şekil 4.37. KC içindeki *D. iberica* protokormlarına ait sürgünler.

4.1.2.5. Tohumdan sürgün oluşma oranı (%)

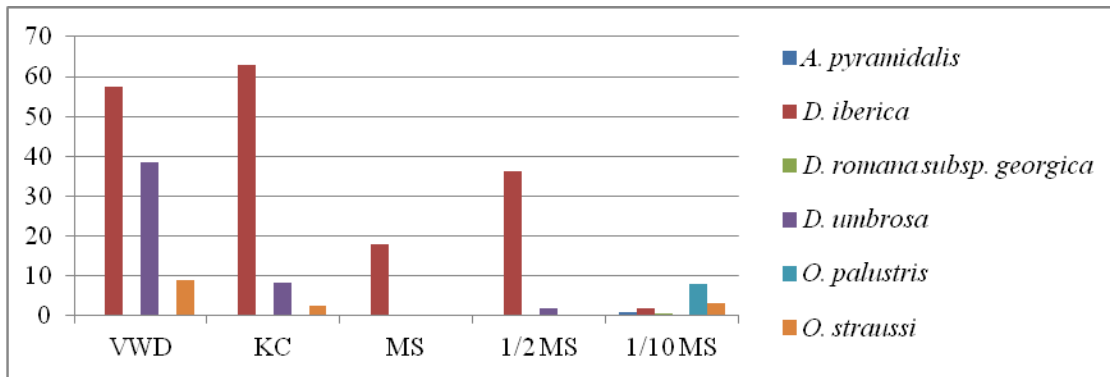
Sürgün oluşumunun, besi ortamlarına ekilen orkide tohumlarına oranlanarak hesaplanmasıyla bulunan ortalama değerleri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.13). *A. pyramidalis*, *D. romana* subsp. *georgica* ve *O. palustris* türlerine ait tohumların sadece 1/10 MS ortamına ekildiklerinde sürgün oluşturduğu; diğer ortamlarda başarı elde edilemediği görülmüştür. Bu türlerden sırasıyla % 0.83; % 0.42 ve % 8.07 oranında sürgün elde edilmiştir. *D. iberica* türünün tohumları ise en düşük % 1.67 oranında 1/10 MS ortamında sürgün oluşumu gösterirken; en fazla sürgün oluşumu % 62.92 oranında KC ortamından elde edilmiştir. *D. umbrosa* türü MS ve 1/10 MS ortamlarında hiç sürgün oluşturamamış fakat; VWD ortamında % 38.33 düzeyinde en yüksek sürgün ortalaması elde edilmiştir. *O. straussii* türüne ait en yüksek sürgün ortalama değeri (% 8.75) VWD ortamında elde edilirken; MS ve ½ MS ortamlarında başarı sağlanamamıştır (Şekil 4.38).

Çizelge 4.13. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tohumdan sürgün oluşum oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 b* D**	57.50±0.72 bA	0.00±0.00 a D	38.33±0.42 a B	0.00±0.00 b D	8.75±0.72 a C
KC	0.00±0.00 b D	62.92±0.42 a A	0.00±0.00 a D	8.33±0.42 b B	0.00±0.00 b D	2.50±0.72 b C
MS	0.00±0.00 b B	17.92±0.42 d A	0.00±0.00 a B	0.00±0.00 d B	0.00±0.00 b B	0.00±0.00 c B
½ MS	0.00±0.00 b C	36.25±0.72 c A	0.00±0.00 a C	1.67±0.42 c B	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 c C
1/10 MS	0.83±0.42 a CD	1.67±0.42 e C	0.42±0.42 a D	0.00±0.00 d D	8.07±0.13 a A	3.20±0.23 b B

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.38. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tohumdan sürgün oluşum oranma etkisi (%).

4.1.2.6. Sağlıklı protokormdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)

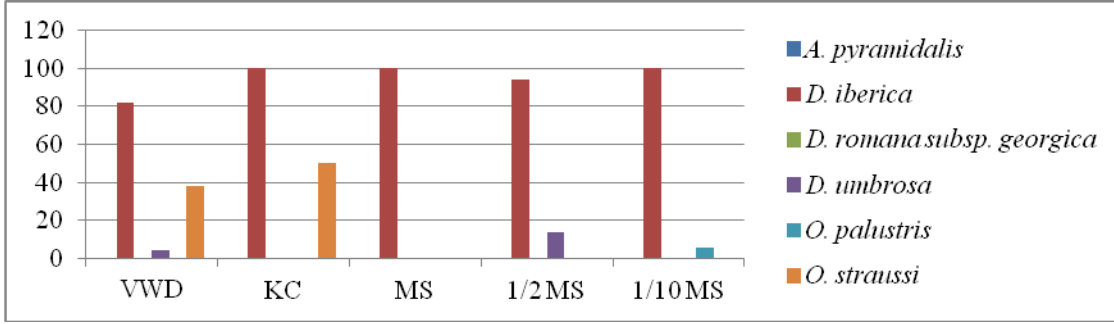
Çizelge 4.14'e göre, tüm protokormlardan kararmış protokormların ayrılmasıyla elde edilen sağlıklı protokormlardan oluşan kararmış sürgün oranına ait ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). *A. pyramidalis* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerine ait sağlam protokormlardan hiçbir besi ortamında kararan sürgün oluşumu gözlenmemiştir. *D. iberica* türüne ait tohumların ekim yapıldığı tüm besi ortamlarında, sağlıklı protokormlardan kararan sürgün oluşumu gerçekleşmiş olup; KC, MS ve 1/10 MS ortamlarında bulunan sağlıklı protokormların tamamında (% 100.00) kararan sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. *D. umbrosa* türüne ait kararmış sürgün oluşumu ise VWD (% 3.98) ve ½ MS (% 13.33) besi ortamlarında meydana gelmiş olup; KC, MS ve 1/10 MS ortamlarında oluşum gözlenmemiştir. *O. palustris* türüne ait sağlıklı protokormlardan sadece 1/10 MS ortamında % 5.26 oranında kararmış sürgün oluşmuş olup; diğer besi ortamlarında kayıt alınmamıştır. *O. straussii* türünde; MS, ½ MS ve 1/10 MS ortamlarında gelişen sağlıklı protokormlardan kararmış sürgün oluşumu gerçekleşmemiş olup; sadece KC (% 50.00) ve VWD (% 37.90) besi ortamlarında görülmüştür (Şekil 4.39).

Çizelge 4.14. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin sağlıklı protokormdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 C**	82.00±1.51 c* A	0.00±0.00 C	3.98±1.04 ab C	0.00±0.00 C	37.90±2.76 ab B
KC	0.00±0.00 C	100.00±0.00 a A	0.00±0.00 C	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 C	50.00±28.87 a B
MS	0.00±0.00	100.00±0.00 a	0.00±0.00	0.00±0.00 b	0.00±0.00	0.00±0.00 b
½ MS	0.00±0.00 C	94.33±1.17 b A	0.00±0.00 C	13.33±6.67 a B	0.00±0.00 C	0.00±0.00 b C
1/10 MS	0.00±0.00	100.00±0.00 a	0.00±0.00	0.00±0.00 b	5.26±0.00	0.00±0.00 b

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.39. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana subsp. georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin sağlıklı protokormdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%).

4.1.2.7. Tüm protokormdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)

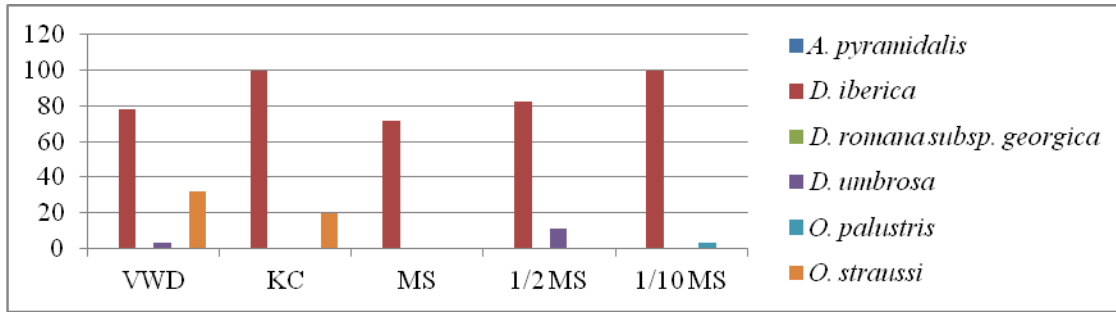
Tüm protokormlardan oluşan kararmış sürgün gelişiminde, besi ortamının orkide türleri üzerine istatistik olarak önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Çizelge 4.15'e göre *A. pyramidalis* ve *D. romana subsp. georgica* türleri ekildikleri hiçbir besi ortamında kararan sürgün oluşturmamışlardır. *D. umbrosa* ve *O. straussii* türlerine ait toplam protokormlardan ise kararan sürgün ortalaması en fazla VWD ortamından sırasıyla % 3.15 ve % 31.74 olarak elde edilmiştir. Buna karşılık bu iki orkide türüne ait protokormlardan oluşan kararan sürgün oranına ait en düşük ortalama, hiç kararan sürgün oluşturmayan 1/10 MS ortamından elde edilmiştir. Ayrıca *D. umbrosa* türüne ait kararan sürgünlerin görülmediği besi ortamlarının KC ve MS; *O. straussii* türünde ise MS ve 1/2 MS ortamları olduğu açıkça görülmektedir. *O. palustris* türünde ise 1/10 MS ortamında % 2.83 oranında kararan sürgün gelişirken; diğer besi ortamlarında bu oluşumların gerçekleşmediği görülmektedir. *D. iberica* türüne ait en az kararan sürgün oranı (% 71.70) MS ortamından elde edilirken; en fazla kararan sürgün oranı (% 100.00) KC ve 1/10 MS besi ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.40). Genel olarak bakıldığında en çok kararan sürgünün % 100.00 oranda KC ve 1/10 MS besi ortamlarında gelişen *D. iberica* türüne ait protokormlardan elde edildiği ve bu türün diğer besi ortamlarında da yüksek oranda kararan sürgün geliştirdiği açıkça görülmektedir.

Çizelge.4.15. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tüm protokormdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 D**	78.16±0.91 c*A	0.00±0.00 D	3.15±0.08 b C	0.00±0.00 a D	31.74±1.59 a B
KC	0.00±0.00 C	100.00±0.00 a A	0.00±0.00 C	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 a C	19.44±10.01 a B
MS	0.00±0.00 B	71.70±1.07 d A	0.00±0.00 B	0.00±0.00 b B	0.00±0.00 a B	0.00±0.00 b B
½ MS	0.00±0.00 C	82.37±1.55 b A	0.00±0.00 C	1.11±5.56 a B	0.00±0.00 a C	0.00±0.00 b C
1/10 MS	0.00±0.00 C	100.00±0.00 a A	0.00±0.00 C	0.00±0.00 b C	2.83±0.07 b B	0.00±0.00 b C

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.40. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tüm protokormdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%).

4.1.2.8. Tohumdan oluşan kararmış sürgün oranı (%)

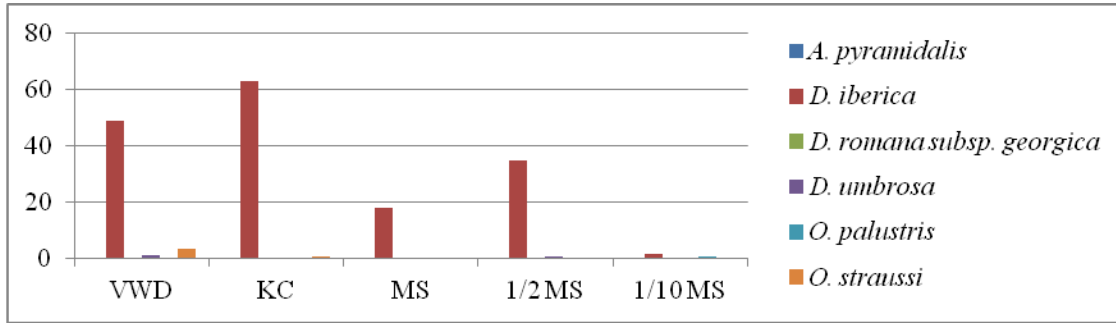
Çizelge 4.16'ya göre farklı besli ortamlarına ekilen orkide tohumlarından kararmış sürgün oluşma oranına ait ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). *A. pyramidalis* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerinde kararmış sürgün oluşumu gözlenmezken, *O. palustris* türünde sadece 1/10 MS ortamında ekili tohumlardan % 0.60 oranında kararmış sürgün oluşmuştur. *D. iberica* türüne ait en yüksek ortalama % 62.92 (KC) olarak bulunurken en düşük ortalama % 1.67 (1/10 MS) elde edilmiştir. *D. umbrosa* türünde KC, MS ve 1/10 MS ortamlarında kararmış sürgün oluşmamış olup; en yüksek kararmış sürgün oranı % 1.25 olarak VWD ortamından elde edilmiştir. *O. straussii* türüne ait tohumların VWD ortamına ekilmesiyle en yüksek sürgün kararma oranı (% 3.33) elde edilmiş olup; MS, ½ MS ve 1/10 MS ortamlarında hiç sürgün kararması gözlenmemiştir (Şekil 4.41).

Çizelge 4.16. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tohumdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 D**	49.17±0.42 b* A	0.00±0.00 D	1.25±0.00 a C	0.00±0.00 D	3.33±0.42 a B
KC	0.00±0.00 C	62.92±0.42 a A	0.00±0.00 C	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 C	0.83±0.42 b B
MS	0.00±0.00 B	17.92±0.42 d A	0.00±0.00 B	0.00±0.00 b B	0.00±0.00 B	0.00±0.00 b B
½ MS	0.00±0.00 B	35.00±0.72 c A	0.00±0.00 B	0.83±0.42 a B	0.00±0.00 B	0.00±0.00 b B
1/10 MS	0.00±0.00 C	1.67±0.42 e A	0.00±0.00 C	0.00±0.00 b C	0.60±0.00 B	0.00±0.00 b C

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.41. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tohumdan oluşan sürgünlerin kararma oranına etkisi (%).



Şekil 4.42. KC içindeki *D. iberica* tohumuna ait kararmış sürgünler.



Şekil 4.43. VWD içindeki *O. straussii* tohumuna ait kararmış sürgünler.

Şekil 4.41’de görüldüğü gibi kullanılan tüm besiy ortamlarında kararmış sürgün oluşturan orkide türü *D. iberica* türüdür. Şekil 4.42’de *D. iberica* türünün en çok kararan sürgün oluşturduğu KC besiy ortamındaki gelişimi görülmektedir. Kararan sürgünlerin çok fazla gelişmedikleri ve zayıf oldukları dikkat çekmiştir. Şekil 4.43’te ise

gelişmesi kuvvetli ancak kararmış olan VWD ortamı içindeki *O. straussii* sürgünleri görülmektedir.

4.1.2.9. Tüm protokormdan oluşan köklü sürgün oranı (%)

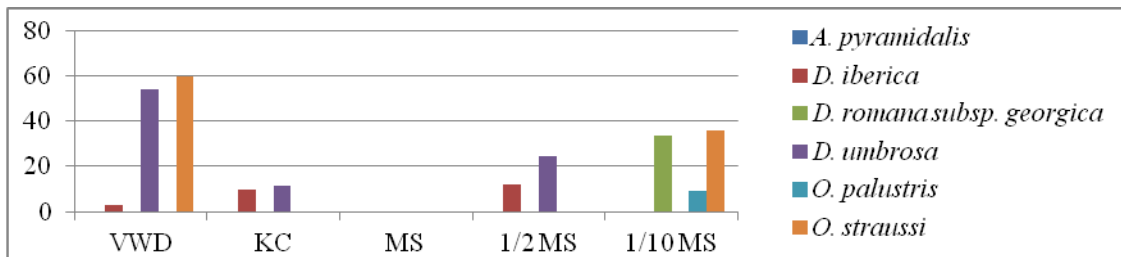
Protokormların tamamının geliştirdiği köklü sürgün oranlarına ait ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.17). *A. pyramidalis* türüne ait köklü sürgün elde edilemezken; 1/10 MS ortamı içinde gelişen *D. romana* subsp. *georgica* ve *O. palustris* sürgünleri sırasıyla % 33.33 ve % 9.22 oranlarında başarı göstermiş olup; diğer besi ortamlarında köklü sürgün oluşumu gerçekleştirilmemiştir. MS ve 1/10 MS ortamlarında yetişen *D. iberica* ve *D. umbrosa* türlerine ait protokormlardan köklü sürgün oluşmamış olup; gelişmenin görüldüğü diğer besi ortamları içinde en yüksek ortalamalar sırasıyla KC (% 9.93) ve VWD (% 54.10) ortamlarında elde edilmiştir. *O. straussii* türünün protokormlarından ise köklü sürgün oluşum oranına ait en yüksek ortalama (% 59.79) VWD ortamından elde edilirken; KC, MS ve 1/2 MS besi ortamlarında köklü sürgün gelişimi gözlenmemiştir (Şekil 4.44).

Çizelge 4.17. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tüm protokormdan oluşan sürgün oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00	2.71±0.61 b*	0.00±0.00 a	54.10±0.77 a	0.00±0.00 b	59.79±3.47 a
KC	0.00±0.00 B**	9.93±0.07 a A	0.00±0.00 a B	11.43±1.43 c A	0.00±0.00 b B	0.00±0.00 c B
MS	0.00±0.00	0.00±0.00 c	0.00±0.00 a	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c
1/2 MS	0.00±0.00 C	11.74±1.63 a B	0.00±0.00 a C	24.44±4.44 b A	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 c C
1/10 MS	0.00±0.00 A	0.00±0.00 c A	33.33±33.33 a A	0.00±0.00 d A	9.22±0.23 a A	36.11±0.76 b A

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.44. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tüm protokormdan oluşan sürgün oranına etkisi (%).

4.1.2.10. Sürgünlerde kök oluşum oranı (%)

Çizelge 4.18’de görüleceği üzere, oluşan sürgünlerden kök gelişimlerine göre ayrıca ele alınan köklü sürgün oluşma oranlarına ait ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). *A. pyramidalis* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerine ait sürgünler içinde bulundukları besi ortamlarının hiçbirinde kök oluşturmamıştır. *D. iberica* ve *D. umbrosa* türlerinin MS ve 1/10 MS ortamları içindeki sürgünleri de kök oluşturmamış olup; her iki türden en yüksek oranlar sırasıyla, % 13.93 ve % 100.00 olarak ½ MS besi ortamından elde edilmiştir. *O. palustris* türüne ait sürgünlerin 1/10 MS ortamında gelişmesiyle % 31.39 oranında köklü sürgün elde edilmiş olup; diğer besi ortamlarında köklü sürgün oluşumu gözlenmemiştir. *O. straussii* türünde KC, MS ve ½ MS ortamlarında köklü sürgün oluşmamış olup; en yüksek oranlar VWD (% 71.03) ve 1/10 MS (% 62.53) besi ortamlarından elde edilmiştir (Şekil 4.45).

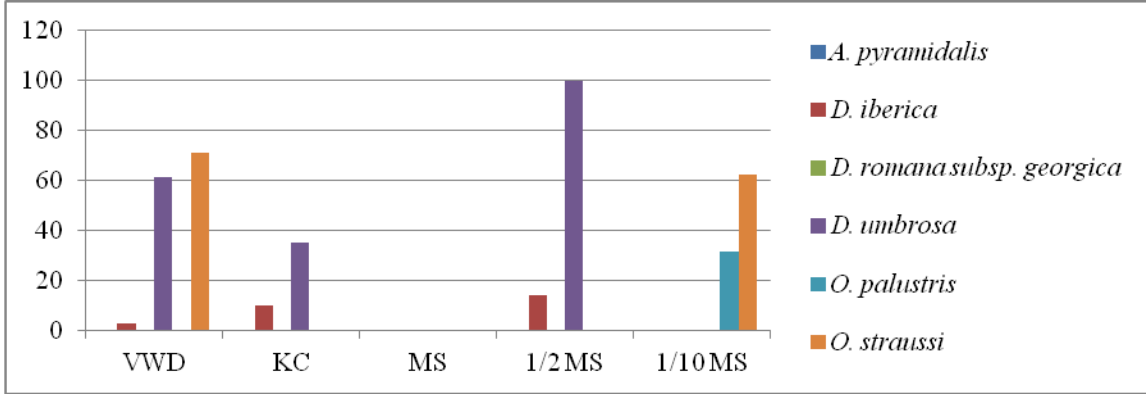
Çizelge 4.18. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin sürgünlerinden kök oluşum oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 C**	2.90±0.73 c* C	0.00±0.00 C	61.38±1.11 b B	0.00±0.00 b C	71.03±2.41 a A
KC	0.00±0.00 C	9.93±0.07 b B	0.00±0.00 C	34.92±4.20 c A	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 c C
MS	0.00±0.00	0.00±0.00 c	0.00±0.00	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c
½ MS	0.00±0.00 C	13.93±2.05 a B	0.00±0.00 C	100.00±0.00 a A	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 c C
1/10 MS	0.00±0.00 C	0.00±0.00 c C	0.00±0.00 C	0.00±0.00 d C	31.39±0.31 a B	62.53±0.83 b A

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

Şekil 4.45’e göre sadece *D. umbrosa*, *O. palustris* ve *O. straussii* türlerine ait sürgünlerden kök sistemi gelişmiştir. Şekil 4.46 ve Şekil 4.47’de görüldüğü gibi, VWD ortamı içinde gelişen *D. umbrosa* ve *O. straussii* türünde köklü sürgün oluşumu gerçekleşmiştir.



Şekil 4.45. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana subsp. georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin sürgünlerinden kök oluşum oranına etkisi (%).



Şekil 4.46. VWD içindeki *D. umbrosa* türüne ait köklü sürgünler.



Şekil 4.47. VWD içindeki *O. straussii* türüne ait köklü sürgünler.

4.1.2.11. Tüm protokormdan oluşan yumrulu sürgün oranı (%)

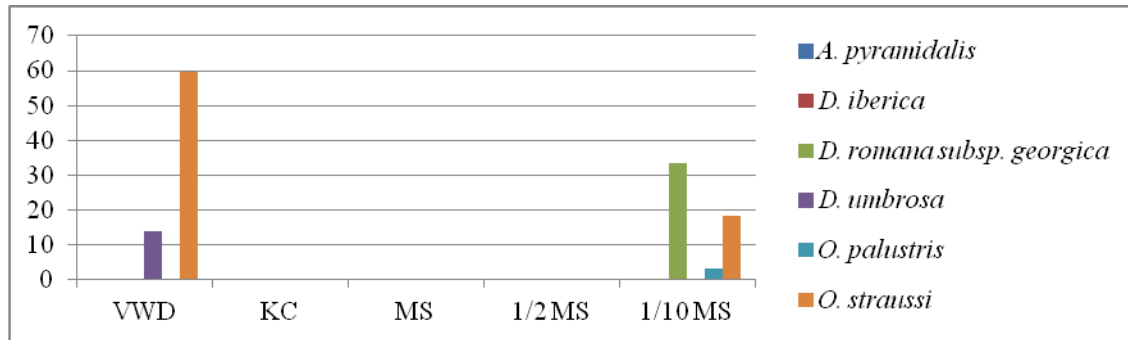
Tohumların ekildikleri ortamda oluşturdukları protokormlardan oluşan yumrulu sürgünlere ait ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 4.19). *A. pyramidalis* ve *D. iberica* türlerinin protokormlarından yumrulu sürgün elde edilememiştir. Buna karşılık *D. romana* subsp. *georgica* (% 33.33) ve *O. palustris* (% 3.15) türleri sadece 1/10 MS ortamında yumrulu sürgün oluşturabilmiştir. *D. umbrosa* türüne ait toplam protokormlardan VWD ortamında % 13.89 oranında yumrulu sürgün elde edilirken; diğer ortamlarda yumrulu sürgüne ait veri elde edilememiştir. *O. straussii* türünde KC, MS ve ½ MS ortamlarında yumrulu sürgün oluşmamış olup; en yüksek ortalamalar VWD (% 59.79) ve 1/10 MS (% 18.14) besi ortamlarından elde edilmiştir (Şekil 4.48).

Çizelge 4.19. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tüm protokormdan yumrulu sürgün oluşturma oranına etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 C**	0.00±0.00 C	0.00±0.00 C	13.89±0.22 a* B	0.00±0.00 b C	59.79±3.47 a A
KC	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c
MS	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c
½ MS	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c
1/10 MS	0.00±0.00 A	0.00±0.00 A	33.33±33.33 a A	0.00±0.00 b A	3.15±0.23 a A	18.14±0.76 b A

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.48. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin tüm protokormdan yumrulu sürgün oluşturma oranına etkisi (%).

4.1.2.12. Sürgünlerde oluşan yumru oranı (%)

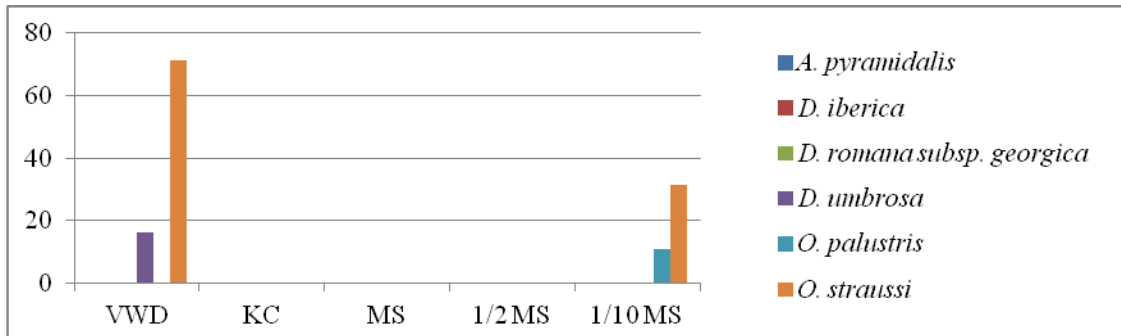
Çizelge 4.20'ye göre protokormlardan oluşan sürgünler, yumru geliştirmelerine göre ayrıca sınıflandırılmış olup; yumrulu sürgün oluşturma oranlarına ait ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). *A. pyramidalis*, *D. iberica* ve *D. romana* subsp. *georgica* türleri hiçbir besi ortamında yumrulu sürgün oluşturmamıştır. *O. straussii* türünden elde edilen en yüksek ortalamalar % 71.03 (VWD) ve % 31.58 (1/10 MS) olarak belirlenmiş olup; diğer besi ortamlarında başarı sağlanamamıştır. *D. umbrosa* türüne ait yumrulu sürgün oluşturma oranı VWD ortamında % 16.31 ve *O. palustris* türünde 1/10 MS ortamında % 10.74 olarak belirlenmiş olup; diğer besi ortamlarında iki türe ait yumrulu sürgün oluşumu gerçekleşmemiştir (Şekil 4.49).

Çizelge 4.20. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin sürgünlerinden yumru oluşturma oranına etkisi (%)

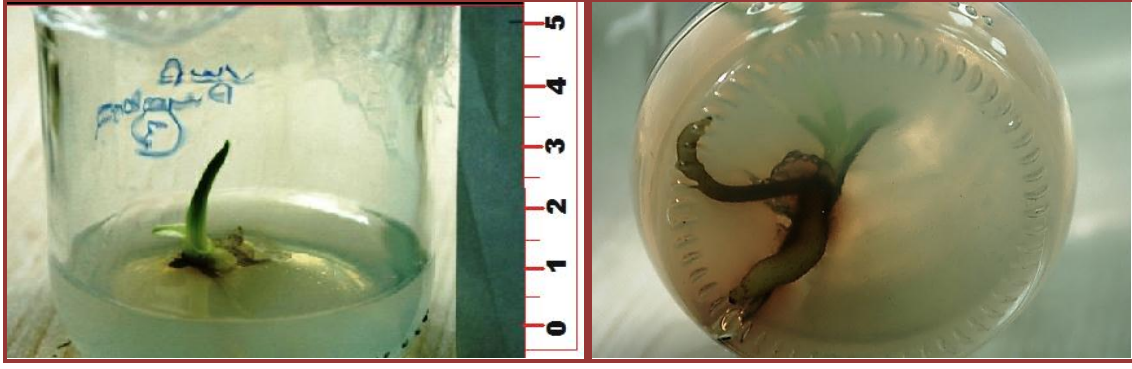
Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 C**	0.00±0.00 C	0.00±0.00 C	16.31±0.18 a* B	0.00±0.00 b C	71.03±2.41 a A
KC	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c
MS	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c
12MS	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 c
10MS	0.00±0.00 C	0.00±0.00 C	0.00±0.00 C	0.00±0.00 b C	10.74±0.74 a B	31.58±2.30 b A

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

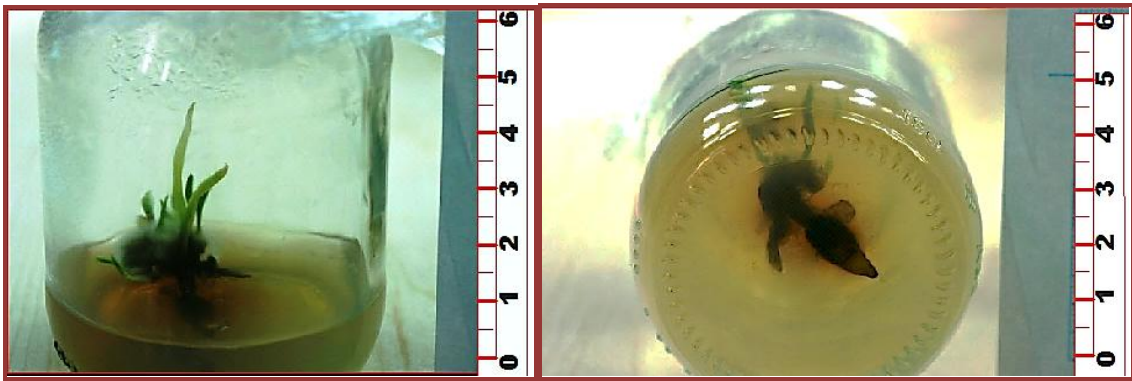
** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.49. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin sürgünlerinden yumru oluşturma oranına etkisi (%).



Şekil 4.50. VWD içindeki *D. umbrosa* türüne ait yumru lu sürgünler.



Şekil 4.51. VWD içindeki *O. straussii* türüne ait yumru lu sürgünler.

Şekil 4.49'a göre *D. umbrosa*, *O. palustris* ve *O. straussii* türlerine ait sürgünler yumru oluşturmuştur. Şekil 4.50'de görüldüğü gibi *D. umbrosa* türüne ait sürgünler yalnızca VWD ortamı içinde yumru oluştururken, *O. straussii* türüne ait sürgünler de en fazla yumru oluşumunu aynı besi ortamında gerçekleştirmiştir (Şekil 4.51).

4.1.2.13. Kallus benzeri oluşumların oranı (%)

A. pyramidalis, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* ve *O. straussii* türlerine ait tohumlar ekilmiş oldukları VWD, KC, MS, ½ MS ve 1/10 MS besi ortamlarında çimlenme ve protokormun yanında kallus ve benzeri yapılar da oluşturmuşlardır. Bu oluşumlar deneme sonuna kadar takip edilmiş olup bir kısmında hacimce bir miktar büyüme gözlenmiştir. Ancak protokorm, sürgün ve bitkicik oluşumuna hiçbir katkısı olmamıştır. Bazı türlerin farklı ortamlarda oluşturdukları bu yapılar bitkicik oluşumunun dışında ayrıca değerlendirilmiş olup istatistik analize tabi tutulmuştur ve ortalamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur (Çizelge 4.21). *A.*

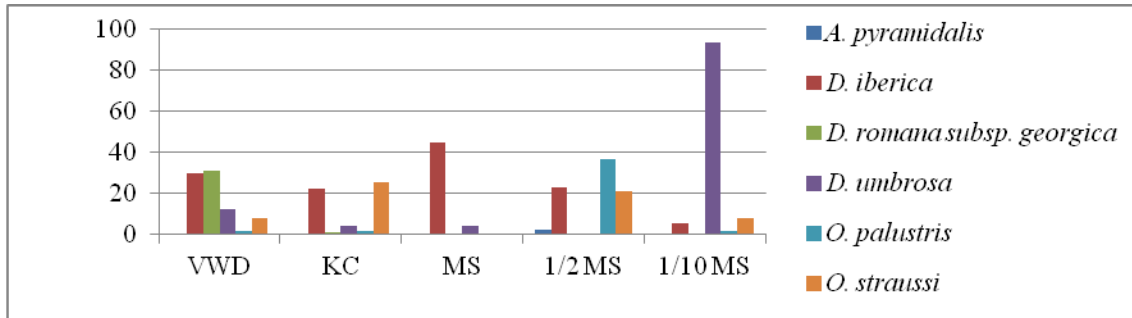
pyramidalis türüne ait tohumlar sadece 1/10 MS ortamında % 2.50 oranında kallus vb. yapılar oluştururken diğer ortamlarda bu türlü oluşumlar gözlenmemiştir. *D. iberica* türünde ise kallus vb. yapıların % 45.00 (MS) ile % 5.83 (1/2 MS) ortalama değerler arasında değişkenlik gösteren oranlar ile ekildikleri tüm besi ortamlarında oluştuğu görülmektedir. *D. romana* subsp. *georgica* türüne ait tohumlarda kallus oluşumuna ait en yüksek ortalama % 31.25 ile VWD ortamından elde edilmiştir. Bu türün ekilmiş olup hiç kallus oluşumu gözlenmeyen ortamların MS, 1/2 MS ve 1/10 MS ortamları olduğu belirlenmiştir. 1/2 MS ortamına ekilen *D. umbrosa* türünde ise en yüksek % 93.33 oranında kallus vb oluşumu gözlenirken, 1/10 MS ortamında bu yapıların oluşmaması dikkat çekmiştir. *O. palustris* türünde kallus oluşum oranına ait en yüksek ortalama % 36.93 olarak 1/10 MS ortamından elde edilirken, MS ortamında oluşum gözlenmemiştir. *O. straussii* tohumları da aynı şekilde MS ortamında hiç kallus vb oluşturmamış olup, en yüksek olarak % 25.67 oranında KC ortamında varlık göstermiştir (Şekil 4.52). Tohumlardan oluşan kallus benzeri yapılar Şekil 4.53'te olduğu gibi gelişme göstermiştir.

Çizelge 4.21. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin kallus benzeri oluşumlar üzerine etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 d* B **	30.00±0.72 b A	31.25±0.72 a A	12.50±1.25 b B	1.67±0.42 b D	7.92±0.42 b C
KC	0.00±0.00 b B	22.50±0.72 c A	1.25±0.00 b B	4.17±0.83 c B	2.08±0.42 b B	25.67±5.28 a A
MS	0.00±0.00 b C	45.00±0.72 a A	0.00±0.00 c C	4.17±0.42 c B	0.00±0.00 c C	0.00±0.00 c C
1/2 MS	0.00±0.00 b E	5.83±0.42 d C	0.00±0.00 c E	93.33±0.42 a A	1.67±0.42 b D	8.33±0.42 b B
1/10 MS	2.50±0.00 a D	23.33±0.42 c B	0.00±0.00 c E	0.00±0.00 d E	36.93±0.07 a A	21.33±0.24 a C

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.52. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin kallus benzeri oluşumlar üzerine etkisi (%).



Şekil 4.53. MS içindeki *D. umbrosa* türüne ait kallus benzeri oluşum.

4.1.2.14. Kararmış kallus benzeri oluşumların oranı (%)

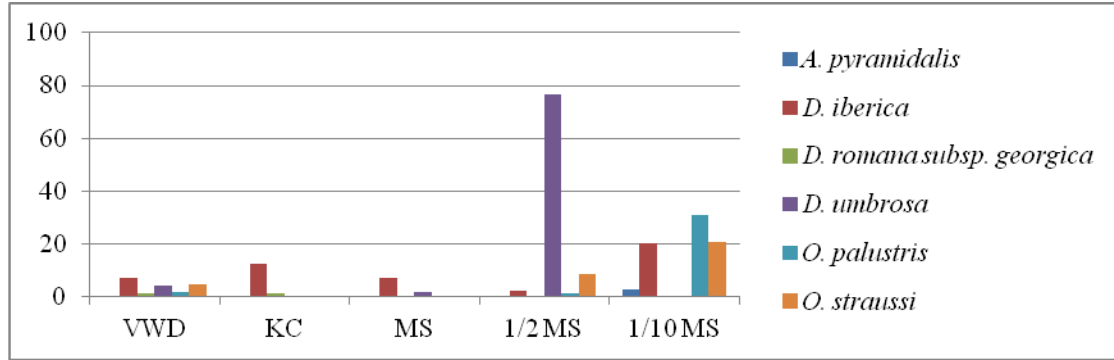
Çizelge 4.22'ye göre farklı besi ortamlarına ekilen orkide türleri tohumlarının kararmış kallus vb. yapıları oluşturma oranlarına ait ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). *A. pyramidalis* türüne ait tohumlarda yalnızca 1/10 MS ortamında % 2.50 oranında kararmış yapıların oluşumu gözlenirken; *D. umbrosa* türünde ise sadece 1/10 MS ortamında oluşum gözlenmemiş olup, en yüksek $\frac{1}{2}$ MS ortamında % 76.67 oranında ortalama elde edilmiştir. *D. iberica* tohumlarının ekildiği tüm besi ortamlarında kararmış yapı oluşumu gözlenmiş olup; elde edilen ortalamalar % 2.08 ($\frac{1}{2}$ MS) ile % 20.00 (1/10 MS) arasında değişkenlik göstermiştir. *D. romana* subsp. *georgica* türünde ise kararmış kallus oluşumuna ait en yüksek ortalama olarak % 1.33'lük oran VWD ortamından elde edilirken, MS, $\frac{1}{2}$ MS ve 1/10 MS ortamlarında kararmış kallus benzeri yapıların oluşmadığı görülmüştür. *O. palustris* ve *O. straussii* türlerinde oluşan kararmış kallus benzeri yapılara ait en yüksek ortalamalar sırasıyla % 30.93 ve % 20.47 olarak 1/10 MS ortamından elde edilmiş olup; VWD ve KC ortamlarında kararan yapıların oluşumu hiç gözlenmemiştir (Şekil 4.54).

Çizelge 4.22. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin kararan kallus benzeri oluşumların oranı üzerine etkisi (%)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 D**	7.08±0.42 c* A	1.33±0.04 a C	4.17±0.42 b B	1.67±0.42 b C	4.58±0.42 c B
KC	0.00±0.00 C	12.50±0.72 b A	1.25±0.00 b B	0.42±0.42 d BC	0.00±0.00 c C	0.00±0.00 d C
MS	0.00±0.00 C	7.08±0.42 c A	0.00±0.00 c C	1.67±0.42 c B	0.00±0.00 c C	0.00±0.00 d C
½ MS	0.00±0.00 D	2.08±0.42 d C	0.00±0.00 c D	76.67±0.42 a A	1.25±0.72 b CD	8.33±0.42 b B
1/10 MS	2.50±0.00 C	20.00±0.72 a B	0.00±0.00 c D	0.00±0.00 d D	30.93±0.13 a A	20.47±0.07 a B

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.54. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* türlerinin kararan kallus benzeri oluşumların oranı üzerine etkisi (%).



Şekil 4.55. 1/10 MS içindeki *A. pyramidalis* türüne ait kararmış kallus benzeri yapılar.



Şekil 4.56. 1/2 MS içindeki *D. umbrosa* türüne ait kararmış kallus benzeri yapılar.

Çizelge 4.22'ye göre, kullanılan türlerin tamamında değişen oranlarda kararmış kallusa benzer yapılar oluşmuştur. Kararan yapıların *A. pyramidalis* türü örneğine benzer olarak kimi zaman büyümüş olup (Şekil 4.55), kimi zaman da *D. umbrosa* türü örneğinde olduğu gibi başlangıç büyüklüğünü koruyan durumda kaldığı görülmüştür (Şekil 4.56).

4.1.2.15. Çimlenme süresi (gün)

Farklı besi ortamlarına ekilen orkide tohumlarının çimlenme sürelerine ait ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$) (Çizelge 4.23). *A. pyramidalis* türüne ait tohumlar KC, MS ve 1/2 MS ortamlarında çimlenme göstermezken; tohumlarda görülen en erken çimlenme ortalaması 81.00 gün ile VWD ortamından; en geç ise 122.25 gün ile 1/10 MS ortamından elde edilmiştir. *D. iberica* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerine ait tohumlar ise ekildikleri tüm besi ortamlarında çimlenmiştir. *D. iberica* türüne ait tohumlar en erken 1/2 MS (22.00 gün) ortamında, en geç 1/10 MS (84.00 gün) ortamında çimlenirken; *D. romana* subsp. *georgica* türüne ait tohumlar en erken MS (72.00 gün), ortamında en geç 1/10 MS (110.67 gün) ortamında çimlenmiştir. *D. umbrosa* türüne ait çimlenme sürelerine bakıldığında; en erken çimlenmenin 1/2 MS (108.25 gün) ortamında ve en geç çimlenmenin ise KC (170.33 gün) ortamında gerçekleştiği görülmekte olup; MS ve 1/10 MS ortamlarında veri elde edilemediği saptanmıştır. *O. palustris* türüne ait çimlenme yalnızca 1/10 MS ortamına ekilen tohumlarda 191.83 gün olarak belirlenmiş olup; diğer besi ortamlarda çimlenme gerçekleşmemiştir. *O. straussii* türüne ait tohumlar ise sadece MS ortamında çimlenme

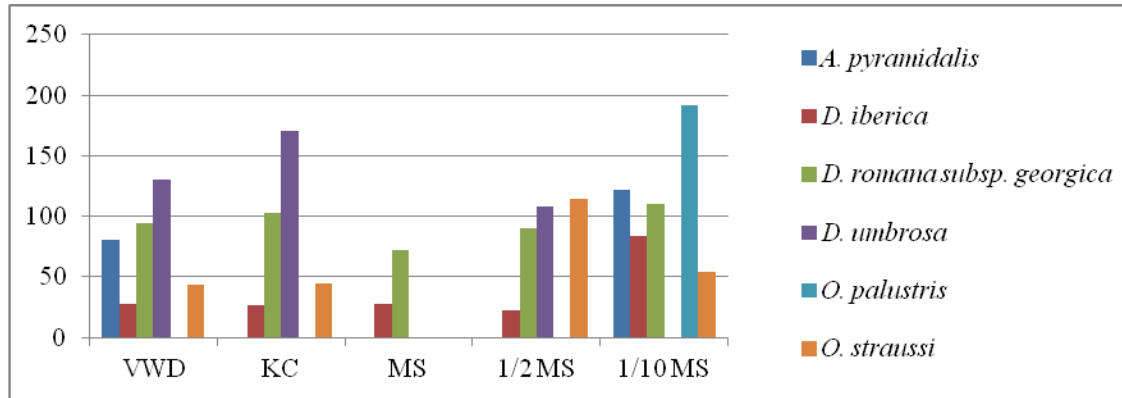
göstermemiştir. Buna karşılık en erken olarak VWD (43.50 gün) ortamında, en geç olarak ise ½ MS (114.00 gün) ortamında tohum çimlenmesi gerçekleşmiştir (Şekil 4.57).

Çizelge 4.23. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* tohumlarının çimlenme süresi üzerine etkisi (gün)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	81.00±5.77 b* C**	27.67±1.86 b E	94.72±4.14 c B	130.53±0.03 b A	0.00±0.00 b F	43.50±3.25 c D
KC	0.00±0.00 c E	26.83±1.59 b D	102.50±0.58 b B	170.33±0.60 a A	0.00±0.00 b E	44.67±2.19 c C
MS	0.00±0.00 c C	27.33±3.84 b B	72.00±1.53 d A	0.00±0.00 d C	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 d C
½ MS	0.00±0.00 c E	22.00±0.58 b D	90.00±1.53 c C	108.25±0.58 c B	0.00±0.00 b E	114.00±0.58 a A
1/10 MS	122.25±1.64 a B	84.00±0.58 a D	110.67±1.67 a C	0.00±0.00 d F	191.83±5.07 a A	54.50±0.50 b E

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.57. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* tohumlarının çimlenme süresi üzerine etkisi (gün).

4.1.2.16. Protokorm oluşum süresi (gün)

Çizelge 4.24'te görüldüğü gibi farklı besli ortamlarında çimlenen tohumların protokorm oluşturma sürelerine ait ortalama değerler arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Tohumların besli ortamlarına ekilmesinden protokorm oluşumuna kadar geçen süreler karşılaştırıldığında; KC, MS ve ½ MS ortamlarına ekilen *A. pyramidalis* tohumlarının çimlenme, dolayısıyla protokorm geliştirmedeği görülmektedir. Buna karşılık protokormların en erken geliştiği ortam VWD (99.00 gün); en geç geliştiği ortam 1/10 MS (152.92 gün) ortamları olarak belirlenmiştir. *D. iberica*

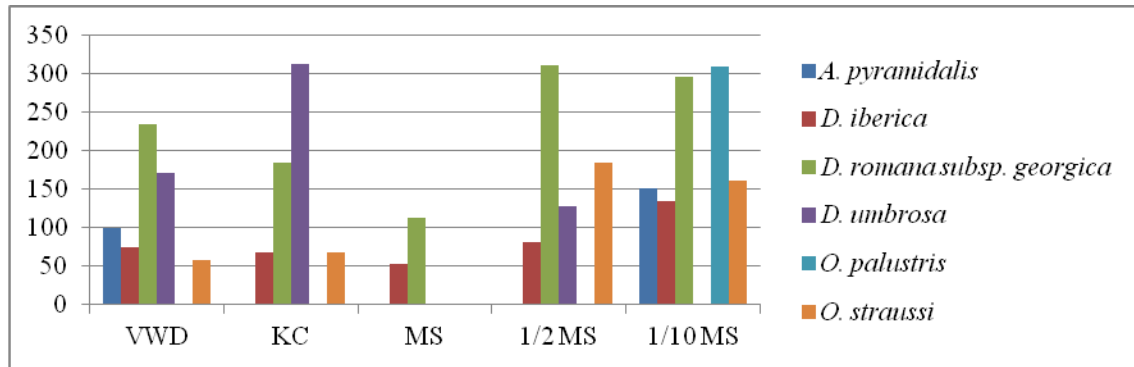
ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerinin en erken protokorm geliştirdikleri ortamların MS (sırasıyla 53.50 gün ve 113.50 gün); en geç protokorm geliştirdikleri ortam ½ MS (sırasıyla 81.00 gün ve 312.33 gün) ortamları oldukları belirlenmiştir. *D. umbrosa* türüne ait protokormlar en erken olarak 1/2 MS ortamında 128.00 günde ve en geç olarak ise KC ortamında 313.67 günde gelişmesine rağmen, sadece MS ortamında gelişme gösterememiştir. *O. palustris* türüne ait tohumlardan protokorm oluşumu sadece 1/10 MS ortamında 309.94 günde belirirken; diğer besi ortamlarında gelişme gözlenmemiştir. *O. straussii* türüne ait protokorm gelişimi sadece MS ortamında gerçekleşmemiş olup, diğer ortamlar içinde en erken VWD (58.50 gün) ve en geç ½ MS (185.00 gün) ortamlarında elde edilmiştir (Şekil 4.58).

Çizelge 4.24. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* tohumlarının protokorm oluşturma süreleri üzerine etkisi (gün)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	99.00±3.46 b* C**	74.17±1.92 bc D	235.00±0.58 c A	171.89±2.12 b B	0.00±0.00 a F	58.50±0.76 d E
KC	0.00±0.00 c D	67.67±1.42 c C	184.00±1.76 d B	313.67±1.20 a A	0.00±0.00 a D	67.67±2.85 c C
MS	0.00±0.00 c C	53.50±1.61 d B	113.50±3.75 e A	0.00±0.00 d C	0.00±0.00 a C	0.00±0.00 e C
½ MS	0.00±0.00 c E	81.00±6.35 b D	312.33±3.67 a A	128.00±0.58 c C	0.00±0.00 a E	185.00±2.60 a B
1/10 MS	150.92±2.46 a D	134.43±0.65 a E	296.56±3.49 b B	0.00±0.00 d F	309.94±1.60 b A	161.17±3.66 b C

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



Şekil 4.58. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* tohumlarının protokorm oluşturma süreleri üzerine etkisi (gün).

4.1.2.17. Sürgün oluşum süresi (gün)

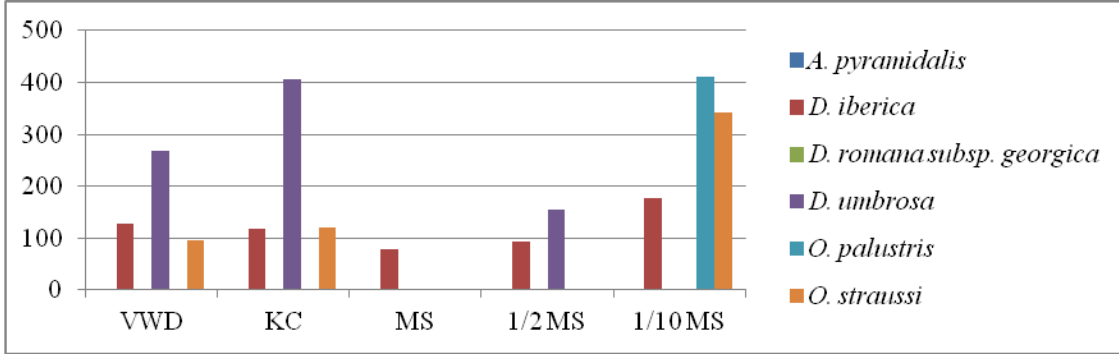
Çizelge 4.25'te görüldüğü gibi orkide türlerine ait tohumların farklı besi ortamlarına ekilmesiyle elde edilen sürgünlerin ortalama değerleri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). *A. pyramidalis* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerine ait tohumlardan sürgün oluşumu gerçekleşmemiş olup; *O. palustris* türünde sadece 1/10 MS (411.44 gün) ortamında belirlenmiştir. *D. iberica* türüne ait tohumların tamamı sürgün oluşturmuş olup; ekimden sürgün oluşumuna kadar geçen süre en az MS (79.00 gün) ortamında, en fazla 1/10 MS (175.83 gün) ortamında elde edilmiştir. *D. umbrosa* türünde MS ve 1/10 MS ortamlarında sürgün gelişimi gerçekleşmediği için kayıt alınamamıştır. Diğer besi ortamları içinde en erken sürgün gelişimine ait ortalama ½ MS (155.00 gün) ortamından elde edilirken; en geç sürgün gelişimine ait ortalama KC (406.83 gün) ortamından elde edilmiştir. *O. straussii* türüne ait tohumlarda MS ve ½ MS ortamlarında sürgün gelişimi gerçekleşmemiştir. Tohumların ekildikleri VWD besin ortamında en erken sürgün gelişimi 95.33 gün; en geç sürgün gelişimi ise 1/10 MS ortamında 342.50 gün olarak kayıt altına alınmıştır (Şekil 4.59).

Çizelge 4.25. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* tohumlarının sürgün oluşturma süreleri üzerine etkisi (gün)

Ortamlar	<i>A. pyramidalis</i>	<i>D. iberica</i>	<i>D. romana</i> subsp. <i>georgica</i>	<i>D. umbrosa</i>	<i>O. palustris</i>	<i>O. straussii</i>
VWD	0.00±0.00 D**	127.17±2.13 b* B	0.00±0.00 D	267.78±5.28 b A	0.00±0.00 b D	95.33±2.33 c C
KC	0.00±0.00 C	118.67±8.17 b B	0.00±0.00 C	406.83±9.18 a A	0.00±0.00 b C	120.50±10.10 b B
MS	0.00±0.00 B	79.00±0.58 d A	0.00±0.00 B	0.00±0.00 d B	0.00±0.00 b B	0.00±0.00 d B
½ MS	0.00±0.00 C	94.25±0.58 c B	0.00±0.00 C	155.00±0.58 c A	0.00±0.00 b C	0.00±0.00 d C
1/10 MS	0.00±0.00 D	175.83±1.18 a C	0.00±0.00 D	0.00±0.00 d D	411.44±1.44 a A	342.50±5.01 a B

* Aynı sütunda, aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir

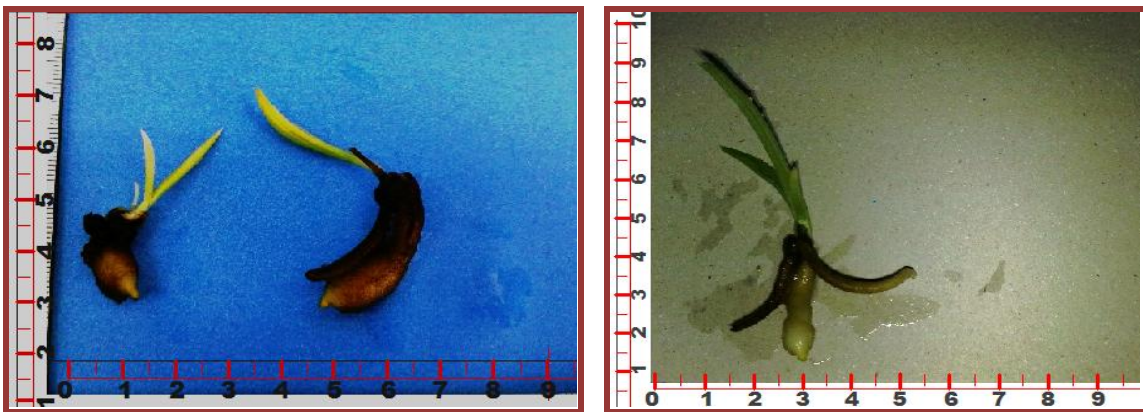
** Aynı satırda, aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir



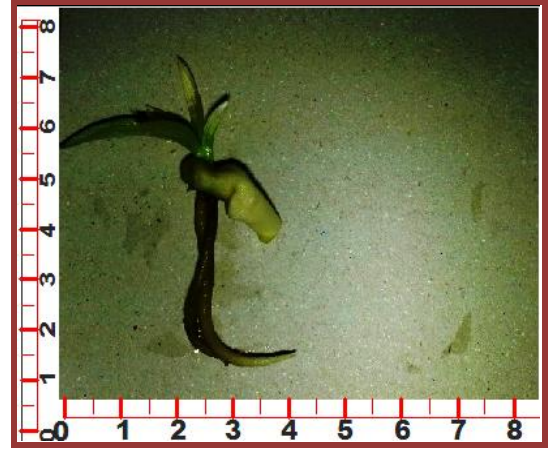
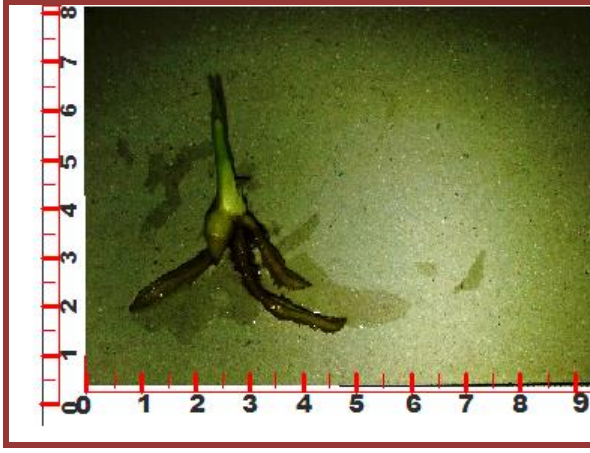
Şekil 4.59. Besi ortamının *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* tohumlarının sürgün oluşturma süreleri üzerine etkisi (gün).

4.1.3. Gelişen bitkiciklerin toprağa aktarılması

In vitroda asimbiyotik kültür ortamlarında kök ve yumru oluşturmuş olan *O. straussii* (Şekil 4.60) ve *D. umbrosa* (Şekil 4.61) türlerine ait sürgünler, steril edilmiş % 50 oranlarında ince dişli kumdan ve topraktan oluşan dikim harcı içine dikilmiştir. Şekil 4.62’de görüldüğü gibi, önce sterilizasyon işleminden geçirilen sürgünler, viyoller içine dikilmiş olup (Şekil 4.63, 4.64, 4.65) üzeri polietilen örtü ile kapatılmıştır. Örtü yaklaşık 15 gün sonra kaldırılmış olup, viyoller laboratuvar ortamında alıştırmaya bırakılmıştır. Ancak yaklaşık 3 ay sonra bitkiciklerin yapraklarında önce solma, ardından kuruma başlamıştır; sonuç olarak bitkiciklerin tamamı dış ortama alıştırmaya geçmeden ne yazık ki ölmüştür.



Şekil 4.60. *O. straussii* türüne ait bitkicikler.



Şekil 4.61. *D. umbrosa* türüne ait bitkicikler.



Şekil 4.62. Bitkiciğin dikim öncesi sterilizasyonu.

Şekil 4.63. Bitkiciğin viyole dikilmesi.



Şekil 4.64. Bitkiciklerin viyolde isimlendirilmesi.



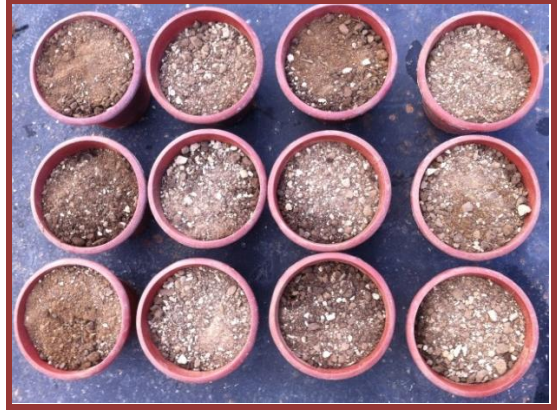
Şekil 4.65. Bitkiciklerin genel görünümü.

4.2. Orkide Tohumlarının In Vivo Koşullarda Çimlendirilmesi

In vivo koşullarda asimbiyotik ve simbiyotik kültür ortamlarına ekilen tohumlar, in vitro koşullarda olduğu gibi aynı sterilizasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Ekim harçlarına ekildikten sonra, deneme sonlanıncaya kadar bekletilmiştir. Ancak in vivo koşullarda ekilen türlere ait hiçbir tohumdan çimlenme, protokorm ve sürgün gelişimi elde edilememiştir.



Şekil 4.66. In vivoda simbiyotik kültürler.



Şekil 4.67. In vivoda asimbiyotik kültürler.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Simbiyotik Kültür Çalışmaları

Simbiyotik kültür ortamında kullanılan *Rhizoctonia solani* AG-3 ve binükleik *Rhizoctonia* fungusları yumrulardan izole edilmiştir. *Rhizoctonia* fungusu ilk kez 1815 yılında De Candolle (Ogoshi, 1975); *Rhizoctonia* cinsinin en önemli türü olan *Rhizoctonia solani* Kühn. ise 1858 yılında Julius Kühn tarafından tanımlanmıştır (Sneh ve ark., 1996). *Rhizoctonia* sp., bölmeli, düzgün, dik dallanan miselli, eşeyli devresinde basidiospor oluşturan, toprakta yaşayan ve tohumla da taşınabilen bir fungustur. Birbiriyle dik açı yapacak şekilde düzgün dallanan hifler fungusun tanınmasında önem taşımaktadır. Hiflerde dallanmanın başlangıç noktasının yakınında bir septum oluşmakta ve dallanmanın olduğu yerde hif boğumlanmaktadır (Karaca, 1974).

Rhizoctonia cinsi hif hücrelerinin içerdiği çekirdek sayısına göre, multinükleik (MN, çok çekirdekli) (teleomorphs: *Thanatephorus* ve *Waitea*), binükleik (BN, iki çekirdekli) (teleomorphs: *Ceratobasidium* ve *Tulasnella*) ve uninükleik (UN, tek çekirdekli) (teleomorph: *Ceratobasidium*) olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır. MN *R. solani* fungusunun eşeyli dönemi olan *Thanatephorus cucumeris* (Frank Donk), 13 anastomosis gruba (AG-1, AG-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-7, AG-8, AG-9, AG-10, AG-11, AG-12 ve AG-13) ayrılmış olan bir alt gruptur (Sneh ve ark., 1991). Denemenin simbiyotik çimlendirme safhasında kullanılan AG-3 fungusu buraya dahil olmaktadır. Genç hiflerinde ikiden fazla nükleus bulunan *R. solani* izolatlarının ana hiflerinin genişliği 7 µm'dan daha kalın olmaktadır. Genç hiflerinde genellikle iki nükleus (nadiren 1-3) bulunan ve ana hiflerinin genişliği 7 µm'dan daha ince olan binükleik *Rhizoctonia* izolatları önceki çalışmalara göre 21 anastomosis gruba (AG-A-U) ayrılmıştır (Kronland ve Stanghellini, 1988; Sneh ve ark., 1991; Hyakumachi ve ark., 2005).

Farklı yıllarda toplanan *A. pyramidalis*, *D. iberica*, *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa* ve *O. palustris* türlerine ait rizosfer toprakları ile yumrulardan izole edilen fungal izolatlar arasında benzerlikler bulunmasına rağmen *O. straussii* türüne ait tanımlanabilen herhangi bir fungus izole edilememiştir. Kullanılan dört farklı yöntem

bakıldığında ve türler baz alındığında; ağırlıklı olarak *Aspergillus* ve *Fusarium* cinslerine ait fungusların izole edildiği görülmektedir. *A. pyramidalis* türüne ait rizosfer toprağında *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Macrophomina*; yumruda ise *Fusarium* cinsine ait funguslar izole edilmiştir. *D. iberica* türüne ait rizosfer toprağında *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Macrophomina*; yumruda ise *Alternaria*, *Aspergillus* ve *Fusarium* cinsine ait funguslar izole edilmiştir. *D. romana* subsp. *georgica* türüne ait rizosfer toprağından izole edilen fungusların *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Trichoderma*; yumrudan izole edilenlerin ise *Alternaria*, *Aspergillus* ve *Fusarium* cinslerine ait oldukları bulunmuştur. *D. umbrosa* türlerinin rizosfer toprağından *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Verticillium* fungusları izole edilirken; yumrularından *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Rhizoctonia* cinslerine ait fungal izolatlar elde edilmiştir. *O. palustris* türünün rizosfer toprağından ise *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Macrophomina* cinslerine ait funguslar; yumrularında ise *Aspergillus*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma* ve *Verticillium* fungusları izole edilmiştir. Kullanılan yöntemler tür bazında birbirlerini doğrulamakta olup, içlerinde izole edilemeyen fungusun diğer bir yöntemle bulunduğu da görülmektedir. Chesters (1949), dilusyon plate yönteminin *Rhizoctonia*'nın topraktan izolasyonu için uygun olmadığına dikkat çekmiştir. Çalışmamızda denenen dökme plaka yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile araştırmacının söylemleri birbirini desteklemiştir. İzole edilen bu fungusların yanında her yöntemde *Penicillium* ve *Rhizopus* fungusları da görülmüştür. Fakat *Fusarium* cinsine ait fungal izolatların çok miktarda çıkması dikkat çekmiştir.

Doğu Akdeniz Bölgesi'nden mart-mayıs ayları arasında toplanan farklı orkide türlerinde yapılan izolasyon sonucu elde edilen 19 adet fungal izolattan 8 adet *Fusarium* sp., 2 adet *R. solani*, 2 adet *Macrophomina* sp., 2 adet *Trichoderma* sp., 2 adet *Pythiaceae* sp. ve 2 adet *Absidia* sp. fungusları tespit edilmiştir (Vakkasoğlu, 1995). Harvais ve Hadley (1967a), İngiltere'de birçok orkide türü köklerinde yaptığı fungus izolasyonu sonucunda elde ettiği 420 izolatın büyük çoğunluğunun *R. repens* fungusu olduğuna; *R. solani* izolatlarını beklenenin tersine sadece *Orchis purpurella* ve bazı durumlarda *Coeloglossum viride*'den elde ettiklerine ve bu fungusun yaygın olmadığına dikkat çekmişlerdir.

Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde nisan ayında toplanan çeşitli salep türlerinin kök ve yumrularından, mikoriza oluşturan fungusların izole edilip tanımlandığı bir çalışmada

izole edilen toplam 47 fungal izolatın 44 adetinin *Fusarium*, 2 adetinin *Rhizoctonia* ve 1 adetinin *Papulaspora* cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Gezgin, 2004). *Fusarium* sp.'nin diğerlerine göre daha büyük oranda izole edildiği bir başka çalışma, *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* bitkisinin kökleri ile yapılmış olup, bunların kontaminant olduğuna karar verilmiştir (Özkoç, 1991). *Fusarium* sp., toprak kökenli olup, topraktan bitki köklerine geçen ve kozmopolit yayılım gösteren bir fungustur. Birçok bitkide bulunduğu halde hastalığa yol açması kesin olmamakla birlikte, sağlam bitkilerde de bulunabileceği; hastalık etmeni olup olmadığının belirlenmesi için patojenite testinin gerekli olacağı bildirilmektedir (Karaca, 1974). Araştırmacı, *Fusarium*'un patojen olarak bulunduğu fide dönemlerinde *Alternaria*, *Phytium*, *Rhizoctonia* ve *Sclerotinia* ile birlikte bulunduğunu; bunların arasında en hızlı ve kolay gelişen türlerden birinin *Fusarium* olduğu için diğerlerinin varlığı ya da yokluğu konusunda bizi yanıltabileceği kanısındadır.

Sezik (1984), orkidelerin mikorizaya bağlılığının cinslere göre değiştiğini, yumrulu cinslerin fungustan ayrılıp bağımsız yaşadığını bildirmiştir. Araştırmacı *Orchis*, *Ophrys* ve *Dactylorhiza* cinslerine ait bitkilerde ilk yaprakların en az 2-4 yılda meydana geldiğine dikkat çekmiştir. Bu da çalışmamıza konu olan orkide türlerinde mikorizal fungusların genç dönemlerinde aktif rol aldığını, tohum toplama esnasında alınan rizosfer toprağı ve yumrulardan neden *Rhizoctonia* fungusunun izole edilemediğini desteklemektedir. Andersen ve Rasmussen (1996), bitkilerin fotototrofik aşamada endofitlere bağımlılığının uzun sürmediğini, bu yüzden yetişkin bitki materyallerinden örnek almanın çok yararlı olamayacağını belirtmiştir.

Çalışmamızda simbiyont olarak kullanılmak üzere *Rhizoctania solani* AG-3 (R) ile binükleuslu *Rhizoctania* (2R) fungusları izole edilmiştir. İzolatlar tohumlarla birlikte yulafortamı (YO), modifiye yulafortamı (MYO) ve potato dekstroze agar (PDA) kültür ortamlarına ekilmiştir. Ancak PDA ortamında funguslar çok hızlı olarak geliştikleri için tohumun üzerini kapatarak tüm besi ortamına yayılmış ve kaplamıştır. Bu nedenle tohum çimlenmesi ve gelişimi sağlanamamıştır. YO ve MYO içine ekilmiş tohumların çimlenip gelişmesinde R'nin olumlu etkisi belirlenememiştir. Sarı ve ark. (2011), *R. solani* izolatını simbiyont olarak kullanmış olup, bulgumuza benzer olarak fungusun tüm petri yüzeyini kapladığına, patojenik etki yaptığına ve embriyo ile simbiyotik ilişki oluşturamadığına değinmiştir. Araştırmada YO ve MYO içine bulaştırılan 2R'nin

protokorm oluşumuna etkisi belirlenmiştir. Elde edilen ortalamalarda en yüksek protokorm oranı % 60.74 olup YO'da ekili olan *D. umbrosa* türünde gözlenirken; en düşük değer % 9.45 olup MYO'da ekili olan *D. iberica* türünde ortaya çıkmıştır. Protokorm oluşumu yönünden ortamların türlere etkisi düşünüldüğünde en yüksek ortalama YO'dan elde edilmiştir. Türlerin ortamlara etkisi incelendiğinde ise en yüksek ortalama, her iki ortamda da *D. umbrosa* türünden; en düşük oranlar ise *D. iberica* türünden elde edilmiştir. *D. romana* subsp. *georgica* ve *A. pyramidalis* türleri simbiyotik çimlendirmede başarı gösterememişlerdir. Özkoç ve Dalcı (1993), farklı ülkelerden getirilmiş 11 adet fungal izolat eşliğinde YO ve MYO'da ekimi yapılan *Orchis laxiflora* tohumlarında her izolatın aynı etkiyi sağlamadığını bildirmiş olup, iki Türk izolatını çimlenmede etkisiz bulmuşlardır. Doğu Akdeniz Bölgesi'nden toplanan ve *R. solani* ile YO içinde çimlendirilmeye bırakılan *Orchis coriophora*, *Ophrys apifera*, *Ophrys umbilicata* ve *Anacamptis pyramidalis* türleri arasında sadece *Orchis coriophora* türünde protokorm oluşmuştur (Vakkasoğlu, 1995). Özdener (1994), *D. iberica* türüne ait tohumların 9 adet mikorizal fungus izolatı ile bulaştırıldığı YO'da en yüksek protokorm oranını % 2.35; MYO'da ise en yüksek % 4.72 olarak bulmuştur. Araştırmacı MYO'ya kıyasla YO'da daha yüksek oranda protokorm elde etmiştir.

Aytaş (1994), bazı *Ophrys* türlerine ait köklerden fungal izolat elde etmesinin yanında yurtdışından da bazı izolatlar getirtmiştir. MYO içine ekilmiş *Ophrys apifera* türünün 12 ay boyunca yapılan takibi sonucunda çimlenme gerçekleşmemiş olup yurt dışı izolatlar eşliğinde sadece bazı şişkinlikler belirmiş; ancak hiçbir protokorm oluşumuyla sonuçlanmamıştır. Kendi elde ettikleri izolatlar ile yapılan çimlendirme çalışmasında hiçbir gelişme elde edilememiştir. Kalsiyum miktarının farklı miktarda kullanılmasıyla değişikliğe uğratılmış 5 adet MYO ile yapılan çimlendirme çalışmasında da bazı embriyo şişkinlikleri gerçekleşmiş olup, çimlenme ve dolayısıyla protokorm gelişimi gözlenmemiştir. Farklı yerlerden toplanan *Dactylorhiza aristata* bitkisiyle yapılan simbiyotik kültür çalışmasında YO içine, köklerden ve protokormlardan ayrı ayrı izole edilen AG-G, AG-C, AG-H ve *Tulasnella deliques* (R.r.) funguslarının 7 günlük izolatları bulaştırılmış olup; en yüksek protokorm oluşumu sırasıyla AG-C (% 45.10), R.r. (% 40.60), AG-G (% 5.2) ve AG-H (% 2.8) olarak bulunmuştur (Hayakawa ve ark., 1999). Çalışmadan binükleik *Rhizoctonia* izolatının *Dactylorhiza* cinsinin bu türüne ait protokorm oluşumunda daha etkin olduğu

görülmektedir. *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* ve *Orchis laxiflora* türlerinde 11 fungal izolatla yapılan çimlendirme çalışmasında her izolatın aynı etkiyi sağlamadığı görülmüştür (Özkoç, 1991). Araştırmacı YO'da gelişen *S. vomeracea* subsp. *laxiflora* türünün protokormlarında en yüksek ortalamaı % 22.1, MYO'da en yüksek ortalamaı ise % 3.3 olarak bulmuştur. *O. laxiflora* türünde ise en yüksek protokorm oranı YO'da % 4.8 ve MYO'da % 5.2 olarak bulunmuştur. Yukarıda bahsedildiği gibi daha önce benzer çalışmalar yapan araştırmacıların elde ettiği en yüksek ve olumlu sonuçların, büyük ölçüde YO'dan elde edildiği görülmektedir. Yapılan bu çalışmanın sonuçları ile araştırmacıların bulguları uyum içerisinde.

Çalışmamızda YO ile MYO'da türler arasında protokorm oluşumu ile ortaya çıkan farkın; ortamlar içine ilave edilen maddelerin bileşimiyle ilgili olduğu düşünülmektedir. Türlerin YO'da daha yüksek oranda protokorm geliştirmesi, 2R'nin bu besi yerinde optimum gelişip simbiyotik olarak türlerle daha iyi uyum sağladığı düşüncesini doğurmaktadır. Besi ortamlarında farkın ortaya çıkması ise herhangi bir fungal izolatın farklı orkide türlerini değişik yönlerde etkilemesi ile açıklanabilir (Tomita ve Tsutsui, 1988). Ayrıca *D. umbrosa* türünün yumrusundan elde edilen R izolatının çimlenme ve dolayısıyla bitki gelişimini teşvik etmemesi, elde edildiği bitki türü de dâhil olmak üzere hiçbir türün tohumlarını çimlendirememesi ve bunun yanında *O. palustris* yumrusundan izole edilen 2R izolatının elde edildiği kendi türünün tohumlarından daha yüksek oranda *D. umbrosa* tohumlarını çimlendirmesi ve protokorm oluşturmaları bazı araştırmacıların, fungal izolatların etkililik derecelerinin türden türe değişebileceği yönündeki ifadelerini destekler niteliktedir.

Ancak her iki ortamda oluşan protokormlardan bazıları çıkıştan kısa bir süre sonra kahverengine dönerek yumuşama ve pörsüme durumunu almıştır. Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi en yüksek kararmış protokorm oranı % 37.38 ile *O. palustris* türünde ve MYO'da bulunurken, en düşük değer aynı ortamda % 2.99 ve *D. umbrosa* türünde elde edilmiştir. Orkide türleri ve fungal izolatlar arasındaki ilişkinin simbiyozmden parazitizme kadar değişebileceği, kültür ortamındaki besin maddelerinin tükenmesiyle fungusun parazitik özelliğinin artarak orkide ile fungus arasındaki dengeyi bozduğu, fungusun yüksek besin içeriği olan simbiyotik ortamlarda parazitik etki yapabileceği bazı araştırmacılar tarafından da ortaya koyulmuştur (Tomita ve Tsutsui, 1988; Özkoç, 1991). *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* ve *Orchis laxiflora* türlerinde bitkilerin hem

kendi köklerinden izole edilen hem de yurtdışından getirilen toplam 11 fungal izolatla YO ve MYO'da yapılan çimlendirme çalışmasında; köklerden elde edilen izolatların tamamı ve diğer 2 fungal izolatın çimlenmeye katkısı olmadığı hatta kültürden 1 ay sonra MYO'da gelişen *S. vomeracea* subsp. *laxiflora* türünün bazı protokormlarında % 5.1 oranında kararma olduğu bildirilmiştir (Özkoç, 1991). Shimura ve Koda (2005), 20°C sıcaklıkta 16 haftadan daha uzun süren ve mantar içeren kültür çalışmalarında kademeli bir kahverengileşmenin ve protokorm çürümesinin olabileceğine değinmiştir. *R. solani* ile birlikte YO içine ekilen *D. osmanica* var. *osmanica* türüne ait tohumlar çimlendikten sonra benzer şekilde kahverengine dönüşüp çürüklük gözlenmiştir (Sazak ve Ozdener, 2006). Yukarıda benzer şekilde kararmış protokorm tespit eden araştırmacıların bulguları çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

2R izolatının protokorm oluşumunu teşvik ettiği kadar, önemsenir derecede kararmış protokorm oluşumuna da neden olduğu açıkça görülmektedir. Kararan protokormların canlılıklarını kaybettiği için sürgün oluşumunun başlayamayacağı düşünülrse bu durumun sürgün ve dolayısıyla bitkicik kaybı olarak yorumlanması olağandır. 2R izolatının MYO'da en fazla *O. palustris* türünü etkilemesi dikkat çekmektedir. Kendi yumrusundan elde edilen fungal izolatın uygun ortamı bulduğunda elde edildiği türün tohumlarına parazitik etki yapabileceği düşünülmektedir.

Çalışmanın sonuçlarına göre Çizelge 4.4'de sağlıklı protokormdan oluşan sürgünlere ait en yüksek ortalamanın YO' da gelişen *O. palustris* türünden % 41.09, en düşük ortalamanın ise MYO'dan ve yine aynı türden % 7.79 olarak bulunduğu görülmektedir. YO'da en yüksek değer *O. palustris* türünde, en düşük değer ise *D. umbrosa*'da ortaya çıkmıştır. MYO'da ise en yüksek oran *D. umbrosa*'da, en düşük oran *O. palustris*'te meydana gelmiştir. Yukarıdaki değerlendirmelerden de anlaşılacağı gibi ortamların türler üzerine yaptığı etki açıkça görülmektedir.

Sürgün oluşum oranında, tüm protokormlar dikkate alındığında genel olarak en yüksek ortalama YO'da gelişen *D. iberica* türünden % 35.04; en düşük ortalama ise MYO'da gelişen *O. palustris* türünden % 7.77 elde edilmiştir. Ortamlar baz alındığında YO'da en yüksek ortalama % 35.04 ile *D. iberica*, en düşük ortalama % 15.56 ile *O. palustris* türünden elde edilirken; MYO'da en yüksek oran % 32.59 olup *D. umbrosa*, en düşük oran ise % 7.77 ile *O. palustris* türünden elde edilmiştir. Çizelge 4.5'te

görüldüğü gibi her iki besi ortamında da tüm protokormlardan oluşan sürgünlere ait en düşük ortalama *O. palustris* türünden elde edilirken, en yüksek ortalamalar *D. iberica* ve *D. umbrosa* türleri arasında değişkenlik göstermiştir.

Çizelge 4.6'da tohumdan sürgün oluşturma oranına bakıldığında en yüksek ortalama % 18.71 ile MYO'da gelişen *D. umbrosa*'dan, en düşük ortalama ise % 0.79 ile yine aynı ortamda gelişen *D. iberica* türünden elde edilmiştir. YO'da en yüksek ortalama % 11.57 ile *D. umbrosa*'da, en düşük ortalama ise % 2.53 ile *D. iberica*'da ortaya çıkmıştır. Ortaya çıkan sonuçlara göre en yüksek tohumdan sürgün oluşturma oranları farklı ortamlarda belirlemekle birlikte, aynı tür olan *D. umbrosa* türünden elde edilmiştir. En düşük oranlar ise *D. iberica* türünden elde edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında türlerin tohumdan sürgün oluşturmaya olan etkisinin ortamlardan daha fazla olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda oluşan protokormlardan ortalama en az % 7 ile en fazla % 35 oranlarında sürgün elde edilmiştir. Simbiyotik olarak çimlenen tohumların protokormdan sonra, sürgün aşamasına gelememesi rastlanan bir durumdur (Hayakawa ve ark., 1999). Ordu ve Çorum illerinin çok nemli meralarından elde edilen tohumlar ve 9 fungal izolatla yapılan bir çalışmada *Dactylorhiza urvilleana* türünde en yüksek ortalama YO'da % 55.80, MYO'da % 60.60; *D. iberica* türünde ise YO'da % 3.10; MYO'da % 4.80 değerleri bulunmuştur (Özdener, 1994). MYO üzerinde başka değişiklikler yapılarak hazırlanan 6 farklı besi ortamı da aynı şekilde denenmiş olup, protokormlardan hiç sürgün oluşmayan durumdan en çok % 1.20 değerine kadar ulaşabilen sonuçlar da alınmıştır. Araştırmacının bulgularına dikkat edildiğinde *D. iberica* türünün her iki besi ortamında diğer türe göre çok düşük oranda sürgün geliştirdiği görülmektedir. Özkoç (1991), karasal orkideleri çimlendirmenin kısmen başarılı olduğu ve bir çimlendirme yönteminin bir tür için olumlu etki gösterirken başka bir türün tohumlarını çimlendirmede aynı etkiyi gösteremediği; hatta bir bölgeden toplanan orkide türü tohumlarının çimlendirilmesine ilişkin metodların aynı türün farklı bölgelerden toplanan tohumlarında uygulanamadığını belirtmiştir. Araştırmacı *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* ve *Orchis laxiflora* ile YO ve MYO ile yaptığı simbiyotik çimlendirme çalışmasında; *S. vomeracea* subsp. *laxiflora* türünde en yüksek sürgün ortalamasını YO'da % 14.3; MYO'da % 2.8 olarak elde ederken; *O. laxiflora* türünde YO'da en yüksek % 6.9, MYO'da % 4.1 olarak belirlemiştir. *Dactylorhiza hatagirea*

bitkisiyle (YEA ilaveli) YO'da *Ceratobasidium* sp. ile yapılan simbiyotik çimlendirme çalışmasında tüm çimlenen tohumların % 61'inden sürgün oluşumu başlamıştır (Aggarwal ve Zettler, 2010).

Çalışmamızda her iki besi ortamındaki *D. umbrosa* türüne ait sürgün gelişiminin, *D. iberica* türünden daha fazla olmasının sebebinin tür özelliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sürgün oluşumun toplam protokormdan gelişmesi dikkate alındığında ise *D. iberica* türünün YO'da % 35.04 değeri ile, *D. umbrosa* (% 18.00) ve *O. palustris* (% 15.56) türlerinden daha çok başarı gösterdiği görülmektedir. Bunun nedeni oluşan protokormların, kullanılan besi ortamlarına bağlı olarak farklı derecede sürgün oluşturma yeteneklerinin olması ile açıklanabilir. Her durumda *O. palustris* türüne ait toplam protokorm oransal değerine dikkat edildiğinde *Dactylorhiza* cinsine ait türlerin sürgün oluşturmada daha üstün oldukları göze çarpmaktadır. MYO içindeki *D. umbrosa* türüne ait protokormlardan, YO'daki protokormlara göre daha çok sürgün oluşumu gerçekleşmiştir. Tam tersi bir durum *D. iberica* türünde olmuş ve YO'da daha çok sürgün elde edilmiştir.

Toplam protokormdan elde edilen sürgünler için değerlendirme yapılırken içinde kararmış protokormların da var olduğu unutulmamalıdır. Sağlıklı protokormlar üzerinden değerlendirme yapıldığında en fazla sürgün oluşumu YO'da *O. palustris* türünden elde edilmiş olup, en düşük sürgün oluşma değeri MYO'da bulunmuştur. *O. palustris* türünün sağlıklı protokormlarından sürgün oluşumu için 2R'nin YO içinde daha etkili olduğu (% 41.09); MYO içinde ise % 7.79'luk oran ile olumsuz etki yaptığı görülmektedir. Bu durumda YO'ya göre MYO'nun yulaf ve şekerden daha başka besin elementleri içermesinden dolayı, fungusun bir adım ileri çıkarak sürgün gelişimini baskıladığı düşünülmektedir. Sonuç olarak yapılan bu çalışmada elde edilen bulgulara diğer çalışmalara benzer olarak MYO'da daha yüksek başarı elde edilmiştir. Fakat ekilen tohumlardan sürgün oluşturma başarısı diğer çalışmalara nazaran daha düşük olmuştur.

Sonuçlara genel olarak bakıldığında, protokorm safhasına gelmede en erken sürenin 42.67 gün ile YO'daki *D. umbrosa* türünden; en geç sürenin 55.33 gün ile YO'daki *O. palustris* türünden elde edildiği görülmektedir (Çizelge 4.7). MYO'da ise en erken sürenin 49.67 gün ile *O. palustris* türünde olduğu görülürken, en geç protokorm oluşturma süresi 53 gün ile *D. iberica* türünde olduğu belirlenmiştir. Açıkça

görülyor ki farklı türlere ait tohumlar ekildikleri besi ortamlarına göre farklı gelişim gösterebilmekte ve buna göre de protokorm oluşturma sürelerinde farklılıklar olabilmektedir. Tüm bitki türlerinde çimlenen tohumların protokorm safhasına ulaşması için geçen süre yaklaşık olarak 2 ay olarak belirlenmiştir. *O. palustris* türünde protokorm oluşumu ise durum diğer iki türün aksine YO'da biraz daha fazla zaman almış olup (55.33 gün), MYO'da daha önce başlamıştır (49.67 gün). Başka bir çalışmada *Ceratobasidium* cinsine ait fungal izolatlarla birlikte YO içine ekilmiş olan *D. hatagirea* türünün çimlenmiş olan tohumları 40 günlük bir sürede protokorm oluşturmuştur (Aggarwal ve Zettler, 2010). *Rhizoctonia stahlia* izolatı ile birlikte çimlendirilen *Dactylorhiza maculata* tohumları, iki haftada protokorm oluşturmuştur (Beyrle ve ark., 1985). Ancak araştırmacı bu kadar hızlı protokorm oluşumunu, soğuk uygulamasının teşvik ettiği yönünde görüşlerini bildirmiştir. *R. solani* varlığında YO içine ekilen *Orchis coriophora* tohumlarının protokorm oluşturma süresi 1.5-2 ayı bulmuştur (Vakkasoğlu, 1995). Görüldüğü gibi *Dactylorhiza* ve *Orchis* cinsine ait türlerle yapılan çimlendirme çalışmalarında, YO ya da MYO fark etmeden simbiyotik funguslarla birlikte 40-60 gün aralığında protokorma ulaşılmıştır. Çalışmamızda protokorma ulaşma süresi aynı aralıkta yer almış olup, büyük farklılıklar kaydedilmemiştir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular genelde diğer araştırmacıların bulguları ile uyum göstermekle birlikte, meydana gelen farklılıkların diğer araştırmacıların materyallerini elde ettiği bölgelerden ve yaptığı uygulamalardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Soğuk bölgelerdeki tohum kabuklarının sıcak ve nemli ortamlardaki tohumlara göre daha kalın olduğu, buna paralel olarak çimlenme ve protokorm oluşturma başarısının bu nedenle daha düşük olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.8'e bakıldığında tohum ekiminden itibaren en kısa sürede sürgün oluşumunun başladığı uygulamanın *O. palustris* türüne ait tohumların MYO'ya ekilmesiyle (63.67 gün); en uzun sürede cevap alınan uygulamanın *D. iberica* türüne ait tohumların yine MYO'ya ekilmesiyle bulunduğu (78.67 gün) görülmektedir. Çıkan sonuçtan anlaşıldığı gibi türlere bağlı olarak sürgünde hem en kısa hem de en uzun oluşum süreleri MYO'dan elde edilmiştir. Protokormun ardından sürgün oluşumunun başlaması tür ve ortamlara göre değişse de, yeşil sürgün başlangıcı için çok fazla zaman geçmemiştir. Yani bir anlamda sağlıklı protokormların fungus yardımıyla çok hızlı gelişip sürgün oluşturduğu söylenebilir. *O. palustris* türünde protokormdan sürgün

aşamasına geçişte en az süre; *D. umbrosa* türünde ise en fazla süre harcanımı gerçekleşmiştir. Bütün türler ele alınırsa 14-27 gün arasında protokormdan itibaren sürgün gelişimi olmuştur (Çizelge 4.7). Mitchell (1989), *Dactylorhiza* cinsine ait türlerin gelişmesi zor olan orkideler grubunda yer aldığını bildirmiştir. Çalışmamızda *Dactylorhiza* cinsine ait türlerin, *Orchis* cinsine göre daha uzun sürede sürgün geliştirmesi araştırmacının söylemiyle paralellik göstermektedir.

YO ve çeşitli *Rhizoctonia* izolatlarının oluşturduğu simbiyotik kültürde *Spiranthes sinensis* var. *amoena* türüne ait tohumların yeşil yaprak oluşturmaları için geçen süre bir çalışmada 90 gün olarak belirlenmiştir (Masuhara ve Katsuya, 1994). Araştırmacıların çalışmamızdan farklı bir orkide türü kullandığında ortaya çıkan sonucun farklı bitki türü kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Kullanılan besi ortamı ile fungal izolatların benzerliği dikkate alındığında türlere özgü sürgün oluşturma yeteneğinden ortaya çıkabilecek bir fark akla gelmektedir.

5.2. Asimbiyotik Kültür Çalışmaları

Protokormların bazıları simbiyotik kültür ortamında olduğu gibi asimbiyotik kültür ortamında da kararmıştır. Çizelge 4.9 genel olarak incelendiğinde *A. pyramidalis*, *D. iberica* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerinin bazı ortamlarda gelişen protokormlarında kararma gözlenmemiştir. En çok kararma ½ MS ortamında gelişen *D. romana* subsp. *georgica* ile KC ortamında gelişen *D. umbrosa* türlerinde ortaya çıkmıştır. Açıkça görülüyor ki bazı orkide türlerinin protokormlarının kararma oranları geliştikleri besi ortamlarına göre değişebilmekte ve kararma tohumların ekildiği her besi ortamında gerçekleşmemektedir. Özellikle KC ve 1/10 MS ortamlarında en az kararma gözlenmiştir. Bir çalışmada *Cypripedium formosanum* türünün tohumları, 2,4-D ilaveli ½ ve ¼ MS ortamlarına ekilmiş olup protokorm oluşumu için öncelikle kallus gelişimi teşvik edilmiştir. Oluşan kallusların, hormon dozları aynı kalacak şekilde ¼ MS ortamına aktarılmaları sonucunda, oluşan protokormların pek çoğu kararmıştır (Lee ve Lee, 2003). Van Waes (1987) özellikle *A. pyramidalis* gibi polifenol salgısının yoğun olduğu türlerde aktif karbon (% 0.02-0.3) ilave edilen besin ortamlarında kararma sorununun olmadığını bildirmiş olup, çalışmalarda kullanılan bir çok türde pembe-

kahverengine dönüşen besin ortamlarına dikkat ederek aktif karbon ilavesi yapılmasını öngörmüştür. Aydınlatma, yüksek sıcaklık ve Fe^{+3} gibi bazı maddelerin oksidasyona uğraması sonucu çimlenmenin gelişim süresince bu türlü kararmaların ve fenolik bileşiklerin exudasyonunun olabildiği açıklanmıştır (Haas, 1977). Çalışmamızda genel olarak tüm tür ve ortamlarda kararırma görülürken, en az kararıran protokorm oranı KC ve 1/10 MS ortamlarında gözlenmiş, türler arasında ise özellikle *A. pyramidalis* türünde meydana gelmiştir. Özkoç (1991), VWD ve MS ortamlarında gelişen protokorm uçlarının karardığını bildirmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgular yukarıdaki daha önce yapılan çalışmalar ile genel olarak örtüşmektedir. Meydana gelen farklılıkların ise, çalışmada kullanılan farklı ortamlar ve türlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mead ve Bulard (1975), *Orchis laxiflora* ve *Ophrys sphegodes* türlerinde yaptığı çalışmada bitkide kararırma ve ölümlere rastlamıştır. Her iki türde, tohum ekiminden sekiz ay kadar sonra bazı beyaz protokormların kararırıp bitki ölümü ile sonlandığı bildirilmiştir.

Asimbiyotik kültür ortamında ekilen tohumlardan oluşan toplam protokorm oranı genel olarak incelendiğinde en fazla değerin % 62.92 ile VWD ve KC ortamlarına ekilen *D. iberica* türünden elde edildiği görülmektedir. En düşük toplam protokorm oranı ise % 1.67 ile VWD ve 1/10 MS ortamlarında gelişen *A. pyramidalis* ve *D. iberica* türlerinde ortaya çıkmıştır.

Özkoç (1991), *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* ve *Orchis laxiflora* türleri ile yaptığı asimbiyotik çalışmada VWD, VWD-N, VWD+N, VWD+PE, MS, MS-N, MS+N, MS+PE, KC-N, KC+N, KC+PE ortamlarını kullanmıştır. *S. vomeracea* subsp. *laxiflora* türünde en yüksek protokorm oluşum oranı MS-N ortamında % 53.8 olarak bulunurken; VWD ve MS ortamlarında sırasıyla % 15.2 ve % 4.4 elde edilmiştir. *O. laxiflora* türünde ise en yüksek protokorm ortalaması KC-N ortamında % 25.1 olarak bulunmuş olup, VWD ve MS ortamlarında sırasıyla % 5.2 ve % 0.9 ortalamaları elde edilmiştir.

Orchis apifera ile VWD, VWD-N ve VWD-N+Ca besi ortamlarında yapılan kültür çalışmasında protokorm oluşumu sırasıyla % 10.7, % 24.7 ve % 20.8 olarak bulunmuştur (Aytaş, 1994). VWD temel besi ortamının en düşük, VWD ortamından inorganik azotun çıkarılıp kalsiyumun eklenmesiyle oluşan ortamın en yüksek protokorm oluşumuna neden olduğu görülmüştür. Özdenler (1994), *Dactylorhiza urvilleana* türüne ait tohumların VWD, VWD+PE, VWD+PE-şeker, VWD-N ve VWD-

makroelement ortamlarına ekilmesiyle sırasıyla % 0, 28.65, % 46.3, % 74.8 ve % 41 oranında; *D. iberica* türüne ait tohumların aynı ortamlardan sırasıyla % 3.4, % 1, % 0.46, % 16.76, % 0.50 ortalamalarını elde etmiştir.

Gümüş (2009)' a göre *A. pyramidalis*, *Dactylorhiza. nieschalkiorum* ve *Orchis pinetorum* türlerinin VWD, KC, MS ve ½ MS ortamları ile oluşturdukları interaksiyonlar sonucunda *Dactylorhiza* cinsi açısından benzer sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin kullanılan bu 4 ortam arasında *D. nieschalkiorum* türünde en çok protokorm oluşumu oranı VWD ortamından % 19.21 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda *D. romana* subsp. *georgica* türü benzer oranla, diğer *Dactylorhiza* türleri de daha yüksek miktarlarda VWD ortamında en yüksek performanslarını göstermiştir. Araştırmacı *O. pinetorum* türünde en yüksek protokorm oranı olarak % 4.36 değerini MS ortamından elde etmiştir. Çalışmamızda MS ortamında *O. palustris* türünde hiç protokorm elde edilememişken, 1/10 MS ortamında % 27.47 ortalaması bulunmuştur. Araştırmacı *A. pyramidalis* türünde ise en yüksek protokorm oranı olan % 4.61 değerini KC ortamından bulurken, ½ MS ortamında % 3.30, MS ortamında % 1.04 ve VWD ortamında % 2.47 oranlarında veriler elde etmiştir. Oysa çalışmamızdaki bu türe ait en yüksek değer olan % 2.92 oranı 1/10 MS ortamından elde edilmiştir. *Orchis laxiflora* türüne ait protokorm oluşumu ½ MS ortamında % 11.34, KC ortamında % 14.57 olarak bulunurken; *Ophrys apifera* türünde ise ½ MS ortamında % 15.09, KC ortamında % 8.77 olarak elde edilmiştir. Çalışmalar karşılaştırıldığında *Dactylorhiza* cinsi türlerinin oluşan en yüksek protokorm oranı açısından VWD ortamındaki performansları benzer bulunmuştur. Kahramanmaraş'ta doğal yayılış gösteren 6 salep orkidesinin 22 farklı besli ortamındaki gelişimlerinin incelendiği bir çalışmada; *Ophrys bornmuelleri* türünde VWD+Doğal Bitki Ekstraktı+Aktif Karbon (VWD+DBE+AC) ortamında % 0.01 oranında ve VWD+Domates Ekstraktı (DE)+AC ortamında % 0.080 oranında protokorm oluşumu gözlenirken protokormun ötesinde bir gelişmeye rastlanamamıştır. *Ophrys phrygia* türü VWD, VWD+Patates Ekstraktı (PE), VWD+PE+AC, VWD+DBE, VWD+Salep Ekstraktı (SE)+AC, KC, KC+AC, KC+SE, KC+SE+AC ve PYX+DE+AC ortamlarında sadece protokorm oluşturmuştur. *Orchis anatolica* türünde VWD+DBE, VWD+DE, KC, KC+AC, KC+DBE, KC+DBE+AC, KC+DE, PYX, PYX+AC ve PYX+DE+AC ortamlarında sadece protokorm oluşmuştur. *Orchis coriophora* türünde ise KC, KC+DBE, KC+SE+AC, PYX ve PYX+AC ortamlarında sadece protokorm

gelişimi gözlenmiştir (Özavcı, 1995). Çalışmadan da açıkça görülüyor ki protokorm elde edilen tohumların türleri aynı cinslere ait olsa da farklı besi ortamlarında performans göstermişlerdir. Temel besi ortamları ve bu ortamlara eklenen katkı maddelerindeki farklılıklar türlerin protokorm oluşumu üzerine de etki etmiştir. Örneğin *Orchis anatolica* ve *Orchis coriophora* türleri karşılaştırıldığında farklı katkı maddesi ilavelerinin aynı besi ortamlarında başarı sağlamadığı, özellikle de VWD ortamının *O. anatolica* türünde etkili olduğu, *O. coriophora* türünde ise protokorm gelişimine olanak sağlamadığı görülmektedir. Aynı durum *O. bornmuelleri* ve *O. phrigra* türlerinde hem ilave edilen katkı maddelerinde, hem de temel besi ortamlarında görülmektedir. *O. bornmuelleri* türü sadece katkı maddeli VWD ortamlarında ve en çok % 0.08 oranında protokorm oluştururken *O. phrigra* türü farklı bileşenlerdeki ortamlarda performans göstermiştir. Çalışmamızdaki *Dactylorhiza* cinsine ait türler karşılaştırıldığında benzer bir durumun ortaya çıktığı görülmektedir. Türlerin protokorm oluşturmada farklı performans gösterdikleri açıkça ortadadır ancak 3 türün de en yüksek protokorm oluşum oranları VWD ortamında; en düşük oranlar ise 1/10 MS ortamında elde edilmiştir. Bu durum protokorm oluşumunda, besi ortamlarının aynı cinse (*Dactylorhiza*) ait türlerin üzerinde benzer, farklı cinslere ait türler üzerinde ise farklı etkiler yarattığını düşündürebilir. Ancak *O. bornmuelleri* türünün katkı maddesi ilaveli VWD ortamında gösterdiği % 0.08'lik değer ile çalışmamızdaki *O. straussii* türünün temel VWD ortamında gösterdiği % 10.42'lik değer karşılaştırıldığında hem ilave maddeler hem de bitki türünden kaynaklanabilecek bir fark görülmektedir. Tür özelliğinden doğan bir diğer fark KC ortamında görülmektedir. Çalışmamızda *O. straussii* türüne ait en yüksek protokorm oluşma oranı olan % 50.00 değeri, KC ortamından elde edilirken; araştırmacının çalışmasında bu ortamdan *O. bornmuelleri* türünde başarı elde edilememiştir. Aynı durum tür ve ortamlar açısından *Orchis* cinsine ait türler için de söylenebilir. Bahsedilen çalışmada *Orchis* cinsine ait türlerde farklı ortamlarda (özellikle VWD ve KC temel ve ilaveli besi ortamlarında) protokorm oluşumu gözlenirken, çalışmamızda sadece 1/10 MS ortamında başarı elde edilmiştir. Verilerin tamamı incelendiğinde ise *A. pyramidalis* türünün kullanılan tüm besi ortamlarında en az performansı gösterdiği görülmektedir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışma ile daha önce yapılan çalışmalar genel olarak benzeşmekle birlikte, değişen tür ve ortamlardan doğan farklılıkların da meydana

geldiği görülmektedir. Ortaya çıkan bu farklılıkların türlerin protokorm oluşturduğu ortamlara göre gösterdiği farklı reaksiyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Araştırmamız sonucu elde ettiğimiz değerlere göre sağlıklı protokormdan elde edilen sürgünler tüm ortamlarda başarı sağlarken, türler arasında önemli farklılıklar meydana gelmiştir. En düşük değerler ise tüm ortamlarda *A. pyramidalis* türünden elde edilirken, en yüksek değerler (sağlıklı protokormların tamamı) *D. iberica* türünden elde edilmiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında genel olarak sağlıklı protokormdan elde edilen sürgün oranı bakımından ortamlar önemsiz, türler önemli görülmektedir.

Protokormların gelişmesiyle elde edilen sürgünlerin oranları, sağlıklı veya toplam protokormlardan gelişmelerine göre ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bunun sebebi protokormların içinde kararan ve sağlıklı kalan protokormların birarada bulunması, ve dolayısıyla kararan protokormların genel ortalama değerini düşürerek oluşan sürgün ortalamasını azaltmasıdır. Örneğin 1/10 MS ortamında bulunan *A. pyramidalis* türüne ait toplam protokormlardan % 0.83'lük sürgün gelişimi gözlenmiş olup, içlerinden kararan protokormlar çıkarılarak sadece sağlıklı protokormlar bazında değerlendirildiğinde ise sağlıklı hiçbir sürgünün elde edilmediği görülmektedir. Bunun anlamı kararan protokormların ve bir miktar da olsa kararmış sürgün gelişiminin olduğudur. Çağlayan ve ark. (1998), 14 farklı besi ortamı içine ekilen 6 salep orkidesi türüne ait tohumların çimlenme, bitkicik ve yumru oluşumlarını incelemiştir. VWD ve KC ortamlarına DE, SE, PE ve AK eklenmesiyle pek çok besi ortamı denenmiştir. *Ophrys bornmuelleri* ve *Himantoglossum affine* türlerinde bitkicik oluşumu gerçekleşmezken; türlerin en yüksek bitkicik oluşturma oranları karşılaştırıldığında *Orchis anatolica* türünün VWD'de % 1.57, *Orchis coriophora* türünün VWD+DE+AK ortamında % 8.72, *Ophrys phrygia* türünün VWD+DE+AK ortamında % 0.21 ve *Serapias vomeracea* türünün VWD+AK ortamında % 0.02 oranında performans gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda *O. straussii* türünün VWD ve KC ortamındaki tüm sağlıklı protokormları sürgün oluşturmuş olup yüksek performans göstermiştir. Önce bahsedilen çalışmada *Ophrys* cinsine ait türlerin hiç sürgün oluşturmaması ya da çok az performans göstermesinin nedeni olarak tür farklılığının olduğu düşünülmektedir. Fakat özellikle temel ya da ilaveli VWD ortamının *Ophrys* cinsi bitkilerde olumlu etki yaptığı söylenebilir. Ancak *Orchis palustris* türü ile ilgili olarak, çalışmamızda sadece 1/10 MS ortamında protokorm, dolayısıyla sürgün elde edilmiş

olup; önceki çalışmada VWD ve katkı maddeli VWD ortamında farklı *Orchis* türlerinin sürgün oluşturmada başarı gösterdikleri görülmektedir. Hem tür hem de besi ortamı farklılığının böyle bir sonucu getirdiği düşünülmektedir.

Toplam protokorm sayısı bakımından araştırma sonuçlarımıza göre en yüksek değerler *D. iberica* türünden ve KC ve 1/10 MS ortamlarından elde edilirken, en düşük değerler 1/10 MS ortamı içinde gelişen *D. romana* subsp. *georgica*, *O. palustris* ve *A. pyramidalis* türleri hariç, bu üç türe ait tüm ortamlarda elde edilmiştir (Çizelge 4.12).

Özavcı (1995), Kahramanmaraş'tan toplanan 6 salep orkidesine ait tohumları farklı 22 besi ortamında çimlendirmeye çalışmış ve çoğunda sürgün aşamasına gelmiştir. *Ophrys bornmuelleri* türünde protokormdan daha ileriye gidilememiştir. *Ophrys phrygia* türünde en yüksek sürgün oluşum oranı VWD+DE+AC ortamında % 2.08, en düşük sürgün oluşum oranı ise VWD+AC ortamında % 0.57 bulunmuştur. *Orchis anatolica* türünde en yüksek ortalama VWD ortamında % 1.57, en düşük ortalama ise KC+DE+AC ortamında % 0.023 elde edilmiştir. *Serapias vomeracea* türünde sadece VWD+AC ortamında % 0.023 oranında sürgün elde edilirken; *Orchis coriophora* türünde en yüksek ve en düşük sürgün ortalamaları sırasıyla VWD+DE+AC ve PYX+DE ortamlarında % 8.71 ve % 0.10 olarak bulunmuştur.

Başka bir çalışmada patates ekstraktı ilave edilmiş VWD ortamında çimlenen *Dactylorhiza urvilleana* tohumlarından % 28.65 protokorm, bu protokormlardan % 1.73 kadarının sürgün haline geldiği bildirilmiştir. VWD, VWD+PE, VWD-N ve VWD-makroelementler ortamlarında çimlenen tohumlar ise daha sonraki aşamalara ulaşamamıştır. İnorganik azotlu bileşiklerin VWD ortamından çıkarılması ile oluşan ortamda *D. iberica* türünde % 16.76 oranında protokorm, bu protokormlardan % 0.64 oranında sürgüne gidilmiştir. *D. urvilleana* türünde olduğu gibi farklı maddelerin VWD ortamına eklenmesi ya da çıkarılması ile yapılan kültür çalışmalarında protokormdan sonra sürgün aşamasına ulaşılamamıştır (Özdener, 1994). Özkoç (1991), yaptığı çalışmada, inorganik azotun eklenmesi ya da çıkarılması ile patates ekstraktının eklenmesiyle oluşan VWD, MS ve KC besi ortamlarında *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* ve *Orchis laxiflora* türlerinde protokorm oluşmasına rağmen, hiçbirinin sürgün aşamasına gelemediğini bildirmiştir. Gümüş (2009), yaptığı çalışmada, *Ophrys apifera* türünde ve ½ MS ve KC ortamlarında sırasıyla % 0.86 ve % 0.88 oranında sürgün oluşumu gerçekleşirken, *O. laxiflora* türünde ise sırasıyla % 6.91 ve % 8.39 oranında

başarı sağlandığını bildirmiştir. Araştırmacı bunun yanı sıra *Dactylorhiza nieschalkiorum* türünde ½ MS, MS, KC ve VWD ortamlarını kullandığı çalışmada sırasıyla % 6.28, % 3.79, % 6.25 ve % 8.11 oranında sürgün elde etmiştir.

Toplam protokormların oranı dikkate alınarak elde edilen sürgün ortalama değerleri, genel olarak bu sonuçlara paralel değişim göstermiştir. Örneğin *D. romana* subsp. *georgica*, *D. umbrosa*, *O. palustris* ve *O. straussii* türleri; tıpkı sağlam protokormlardan elde edilen sürgünlerin ortalama değerlerinin 1/10 MS ortamında en yüksek ve en düşük sürgün oluşum oranlarının bulunması gibi, 1/10 MS besi ortamında performans göstermiştir. *A. pyramidalis* türünde 1/10 MS ortamında toplam protokormlardan elde edilen sürgün oranı % 0.83 iken (Çizelge 4.13), sağlıklı protokormlardan elde edilen sürgün oranı % 0.00 olarak bulunmuştur. Bunun anlamı toplam protokormlardan elde edilen sürgünlerin arasında, kararan ya da çürümüş olan protokormlarda gelişen kararmış ya da çürümüş olan sürgünlerin de yer aldığı ve bu oranın % 0.83'lük bir yere sahip olduğudur. Bunun yanında sağlıklı protokormlar göz önüne alındığında ise, hiçbir sağlıklı sürgünün gelişmediği görülmektedir. *D. iberica* türünde ise durum biraz farklıdır. Çünkü bu türe ait toplam protokormdan gelişen sürgünler en yüksek ortalama değer olan % 62.92 ile KC ortamında, en düşük ortalama değer ise 1/10 MS besi ortamında sağlanmıştır. Bu sonuçlara bakarak toplam protokormlardan elde edilen sürgünler en çok KC ortamında % 62.92 oranı ile *D. iberica* türünden elde edilmiştir. Hiç sürgün elde edilemeyen ya da en az sürgün ortalama değerine sahip olan tür ise *D. romana* subsp. *georgica* olarak kayıta geçmiştir. Sonuç olarak toplam protokormdan ve sağlıklı protokormdan elde edilen sürgünlerin besi ortamlarına göre oransal değişimleri nispeten paralel bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlara göre tohumdan oluşan sürgün bakımından en yüksek değer *D. iberica* türünden ve KC ortamından % 62.92 oranında elde edilirken, en düşük değerler ise, *A. pyramidalis* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerinde ve VWD ortamında ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.13). Sonuç olarak daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen bulgularda, yaptığımız çalışmaya benzer olarak sürgün elde edilmiş ancak elde edilen oranlar çalışmamızla paralellik göstermemektedir. Örneğin çalışmamızda *O. straussii* hem protokorm hem de tohum genelinde düşünüldüğünde VWD, KC ve 1/10 MS ortamlarında iyi bir performans sergilemiştir. Benzer durum *Dactylorhiza* cinsine ait türler için de konuşulabilir. Çalışmamızda kullanılan tüm *Dactylorhiza* türleri önceki

alışmalara göre benzer ortamlarda sürgün oluşturmada daha yüksek başarı göstermiştir. Besi ortamları benzer olmasına rağmen göz önüne alınırsa sonuçların farklı çıkması tohumların aynı cins olsa da farklı türlere ait olmalarından olabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

Sağlıklı protokormdan oluşan kararmış sürgün oranı bakımından en yüksek ortalama 1/10 MS ortamından ve *D. iberica* türünden elde edilirken en düşük değerler, *A. pyramidalis*, *O. palustris*, *D. romana* subsp. *georgica* türlerinde ve tüm besi ortamlarında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sağlıklı protokormdan oluşan kararmış sürgün oranı ortamlardan bağımsız olarak türlere göre değişmektedir (izelge 4.14).

Elde edilen veriler ışığında tüm protokormlarda oluşan kararmış sürgün oranı bakımından en yüksek değerler 1/10 MS ve KC ortamında ve *D. iberica* türünde ortaya çıkmıştır. En düşük değerler ise *A. pyramidalis* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerinin tüm ortamlarında meydana gelmiştir (izelge 4.15).

Tohumdan oluşan kararmış sürgün oranı bakımından en yüksek değerler % 62.92 ile KC ortamından ve *D. iberica* türünde elde edilirken, en düşük değerler *A. pyramidalis*, *O. palustris*, *D. romana* subsp. *georgica* türlerinde ve tüm ortamlarda meydana gelmiştir (izelge 4.16). Bu veriler ışığı altında farklı besi ortamlarında gelişen protokormların karararı sürgünleri oluşturma oranlarının karşılaştırılmasının anlamlı olacağı dşnlmştir. Tıpkı sağlıklı sürgün oranlarının elde edildikleri sağlıklı protokorm, toplam protokorm ve tohumdan itibaren gelişen protokormlarda olduğu gibi; bu protokormlardan ve tohumlardan gelişen kararmış sürgünler de değerlendirilmeye alınmalıdır. Çünkü bu tip kararmış sürgünler istenilen değerde sağlıklı gelişim gösteremedikleri ve kök ile yumru oluşturamadıkları için hayatlarına devam edememekte ve kayıp olarak nitelendirilmektedir. Günüşen ve ark. (1996), in vitroda sürgün ucu kültürü ile *Orchis anatolica* ve *Himantoglossum affine* türlerinin çoğaltılmasında başarı elde edildiğini ancak aşırı kararma nedeniyle bitki elde edemediklerini ifade etmiştir. Çalışmamızda *D. iberica* türünün KC, MS ve 1/10 MS ortamlarındaki sağlıklı protokormlarından gelişen sürgünlerin tamamının; VWD ve 1/2 MS ortamlarında gelişen sürgünlerin ise sırasıyla % 82.00 ve % 94.33'lk kısmının karardığı görülmektedir. Bu değerlerin, diğer türlerle karşılaştırıldığında çok yüksek oranda oldukları açıkça anlaşılmaktadır. *D. iberica* türünün önce her besi ortamında

sağlıkla gelişen protokormlarından neredeyse tamamına yakın oranlarda kararmış sürgünlerin oluşması önemli bir kayıttır. *D. iberica* türünü takiben, *O. straussii* türünün KC ortamında % 50.00 ve VWD ortamında % 37.90 oranlarında yine önemli sayılabilecek kadar kararmış sürgün gelişimi gözlenmiştir. *D. umbrosa* türünde yalnızca VWD ve ½ MS ortamlarında sırasıyla % 3.98 ve % 13.33 oranlarında sürgünlerinde kararma oluşurken; *O. palustris* türünde 1/10 MS ortamında % 5.26 oranında kararma belirlenmiştir. *A. pyramidalis* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerinde toplam ve sağlıklı protokormlara ait kararmış sürgüne dair herhangi bir gelişme gözlenmemiştir.

Toplam protokormlar açısından bakıldığında kararmış sürgün oluşumlarının *D. umbrosa*, *O. palustris*, *O. straussii* ve *D. iberica* türlerinin sağlıklı protokormlardan elde edilen kararmış sürgünlerin geliştiği besi ortamlarıyla paralellik gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16). Ortalama değerlere dikkat edilirse türlere ait en yüksek kararan sürgün oranının (% 100.00) yine *D. iberica* türünün KC ve 1/10 MS ortamında gelişen toplam protokormlardan elde edildiği anlaşılmaktadır. Aynı türe ait olan diğer besi ortamlarındaki ortalama değerler arasındaki en düşük değer % 71.70 olarak tespit edilmiştir. *O. palustris* türünde sadece 1/10 MS ortamında ve % 2.83 oranında; *D. umbrosa* türünde en yüksek % 3.15 (VWD) ve en düşük % 1.11 (1/2 MS) oranında toplam protokormdan oluşan kararmış sürgün elde edilmiştir. *O. straussii* türünde en yüksek ve en düşük kararan sürgün oluşumu % 50.00 ile % 37.90 arasında sırasıyla KC ve VWD ortamlarında belirlenmiştir. Genel olarak kararmış sürgünler en çok KC, MS ve 1/10 MS ortamındaki *D. iberica* türüne ait toplam protokormlardan elde edilmiştir. Hiçbir ortamda kararan sürgün oluşturmayan türler ise *A. pyramidalis* ve *D. romana* subsp. *georgica* türleridir. Bu iki tür, protokormlarda olduğu gibi tohum bazında düşünüldüğünde de aynı performansı göstererek hiçbir ortamda kararan sürgün oluşturmamış olup; tam tersi durumda *D. iberica* tüm besi ortamlarında kararan sürgün geliştirmiştir. Bu tür ve genel ortalamalar dikkate alındığında en yüksek oran KC ortamından % 62.92 ve en düşük ortalama 1/10 MS ortamından % 1.67 oranında bulunmuştur.

Tüm protokormlardan oluşan köklü sürgün oranı bakımından ortaya çıkan en yüksek değerler *O. straussii* türünden ve VWD besi ortamından elde edilirken en düşük değerler, *A. pyramidalis*, *O. palustris*, *D. romana* subsp. *georgica* türlerinde ve tüm besi ortamlarında elde edilmiştir (Çizelge 4.17).

Çalışmada elde ettiğimiz bulgular ışığında en yüksek sürgünlerden kök oluşum oranları *O. straussii* türünden ve VWD besi ortamından elde edilmiştir. En düşük değerler ise *A. pyramidalis* ve *D. romana* subsp. *georgica* türünde ve uygulanan tüm besi ortamlarında elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre bazı türler üzerine sürgünlerden kök oluşum oranında ortamların etkisi görülmezken, bazı türlerde etkili olmuştur. Bu durumun sürgünlerden kök oluşum oranı dikkate alındığında türlere göre ortamları seçmede dikkat edilmesi fikrini uyandırmaktadır (Çizelge 4.18).

Protokormlardan gelişen sürgünler kök ya da yumru oluşturmalarına göre ayrıca sınıflandırılmıştır. Fakat oluşan her sürgün kök ya da yumru geliştirememiştir. Bu değerler hem meydana geldikleri toplam protokorm; hem de üzerinde geliştikleri sürgün oranları üzerinden ayrı ayrı değerlendirilmiştir. *A. pyramidalis* türü her iki kriter için de sayısal bir performans gösterememiş olup tür ve besi ortamı interaksiyonları içinde köklü sürgün bazında protokorm oluşturmadığından dolayı, cevap alınmayan tek tür olmuştur. Toplam protokormdan oluşan köklü sürgün oranı en yüksek VWD ortamında gelişen *O. straussii* türüne ait olup % 59.79 değerini taşımaktadır. Bu konuda hiç sonuç alınamayan besi ortamı ise MS olarak belirlenmiştir. Protokormlardan sonra oluşan sürgünlerin içinde bulundukları ortama göre gelişip kök oluşturmaları her sürgünde görülmediği için ayrıca sürgünler üzerinden değerlendirilmiştir. Örneğin ½ MS ortamında bulunan *D. umbrosa* türüne ait sürgünler bu ortamda % 100.00 başarı göstermiş olup; oluşan sürgünlerin tamamında köklenme elde edilmiştir. Bu türe ait oluşan sürgünlerin tamamından köklenme elde edilen ortam olan ½ MS ortamı diğer türlerde hiçbir performans gösterememiştir. Tür ve besin ortamı birlikte ele alındığında her iki faktörün de köklenme üzerindeki etkisi açıkça görülmektedir.

Tüm protokormlardan oluşan yumrulu sürgün oranı dikkate alındığında en yüksek değer % 59.79 ile *O. straussii* türünde ve VWD ortamında görülürken, en düşük değerler *A. pyramidalis* ve *D. iberica* türlerinin tüm ortamlarında meydana gelmiştir. Ortaya çıkan bu durumun yanı sıra *D. romana* subsp. *georgica* ve *O. palustris* türlerinde sadece 1/10 MS ortamı etkili olurken, *D. umbrosa* türünde sadece VWD ortamında başarı sağlanmıştır. Bu durum incelenen diğer parametrelerde de görüleceği gibi farklı türlerde farklı ortamların etkili olduğu düşüncesini uyandırmaktadır (Çizelge 4.19).

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre sürgünlerde oluşan en yüksek yumru oranı % 71.03 ile *O. straussii* türünden ve VWD besi ortamından elde edilirken, en

düşük veriler *A. pyramidalis*, *D. iberica* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerinde ve tüm ortamlarda ortaya çıkmıştır. *D. umbrosa* türünde sadece VWD ortamı etkili olurken, *O. palustris* türünde ise sadece 1/10 MS ortamı etkili olmuştur (Çizelge 4.20).

Köklerin farklılaşmasıyla meydana gelen yumruların da aynı şekilde toplam protokorm ve sürgünden oluşma oranları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Oluşan sürgünler üzerindeki kök gelişiminin en fazla görüldüğü ve ½ MS ortamında % 100.00 başarı elde edildiği *D. umbrosa* türü; yumru gelişiminde aynı performansı gösterememiş olup, VWD besi ortamında başarı göstermiştir. Yumruların geliştiği toplam protokorm ve sürgünler ele alındığında her iki kriter için en yüksek yumru oluşum oranı VWD ortamında gelişen *O. straussii* türünden elde edilmiştir. Bu oranlar toplam protokormlar bazında % 59.79; sürgünler bazında ise % 71.03 olarak kayıt edilmiştir. Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20'ye dikkat edildiğinde yumrulu sürgün oluşumlarının VWD ile 1/10 MS ortamlarında, ve türlere göre değişen oranlarda gerçekleştiği açıkça görülmektedir.

Özavcı (1995), pek çok besi ortamı ve salep orkide türlerinin yumru oluşturmaya etkilerini araştırdığı çalışmada *Orchis anatolica* türüne ait oluşan yumruların % 0.43 ortalama ile VWD ortamından; *Orchis coriophora* türünde en fazla % 4.91 ortalama ile VWD+DE+AC ortamından ve en düşük % 0.022 ortalama ile VWD+PE+AC ortamından elde edildiğini bildirmiştir.

VWD ve KC ortamlarına DE, SE, PE ve AK eklenmesiyle pek çok besi ortamının *Orchis anatolica* ve *Orchis coriophora* türlerinin yumru oluşturmalarına etkisi incelendiğinde *O. anatolica* türünün sadece VWD ortamında % 0.433 oranında; *O. coriophora* türünün ise VWD+DE+AK ortamında % 4.91 oranında başarı gösterdiği bildirilmiştir (Çağlayan ve ark., 1998).

Önal (1999), in vitro çalışmasında *Orchis sancta* ve *Orchis laxiflora* türlerinde yumru oluşum safhasına kadar gelmiş olup, yumru oluşumunda sıcaklık ve ışık rejimleri uygulamıştır. *O. sancta* türünde en yüksek yumru oluşumu % 71.4; en düşük oluşum ise % 0.7 olarak belirlenmiştir. *O. laxiflora* türünde ise en yüksek yumru oluşumu % 65.5 iken en düşük oluşum % 6.4 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda *Dactylorhiza* cinsine ait 2 tür ile *Orchis* ve *Ophrys* cinslerine ait diğer türlerimiz yumru ve kök oluşumunda gelişme kaydetmiştir. Önceki çalışmalarda genelde VWD ve katkı maddeli VWD ortamlarında başarı elde edilmiştir. Çalışmamızdaki başarı da VWD ortamı yönünde elde edilmiştir.

Mead ve Bulard (1975), *Orchis laxiflora* ve *Ophrys sphegodes* türleri ile yaptığı çalışmada *Ophrys sphegodes* türünde pek çok kök ve % 50 oranında 1 cm civarında yumru, *O. laxiflora* türünde köklü ve güçlü bitkiler elde etmiştir.

Çalışmamızda kök oranları genel olarak ele alındığında, oransal olarak tür bazında en yüksek ortalama *D. umbrosa*, ortam çokluğuna göre *D. iberica* türleri başarılı olmuştur. Ortam olarak bakıldığında ise VWD ortamı başarılı olmuştur. Yumru oranları incelendiğinde ise yine VWD ortamının performans gösterdiği, türler arasında da *O. straussii* türünün başarılı olduğu görülmüştür.

Araştırmada ortaya çıkan kallus benzeri oluşumların oranı dikkate alındığında en yüksek değer % 93.33 ile *D. umbrosa* türünde ve ½ MS ortamında meydana gelirken, en düşük değerler *A. pyramidalis* türünde ve 1/10 MS hariç tüm ortamlarında, *D. romana* subsp. *georgica* türünün MS, ½ MS ve 1/10 MS ortamında *O. palustris* ve *O. straussii* türlerinin MS ortamlarında meydana gelmiştir. Bununla birlikte kallus benzeri oluşumların oranı dikkate alındığında tüm ortamlarda en yüksek oranı *D. iberica*, en düşük oranı ise *A. pyramidalis* türünün sağladığı söylenebilir (Çizelge 4.21).

Sonuçlar incelendiğinde kararmış kallus benzeri oluşumların oranı bakımından en yüksek değer % 76.67 ile ½ MS ortamında alınırken, en düşük değerler *A. pyramidalis* türünün 1/10 MS hariç tüm ortamlarda, *D. romana* subsp. *georgica* türünün MS, ½MS ve 1/10 MS ortamlarında, *D. umbrosa* türünün 1/10 MS ortamında, *O. palustris* ve *O. straussii* türünün KC ve MS ortamlarında ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.22).

Tohumlar besi ortamlarına ekildikten sonra ya çimlenip protokorm geliştirmiş ve ardından sürgün oluşumu başlatmıştır ya da kallus ve kallus benzeri yapılar oluşturarak daha fazla gelişme gösterememiştir. Oluşan kallus ve benzeri yapıların bir kısmı da sonradan kararma gösterip canlılıklarını yitirmişlerdir. Çizelge 4.21 ve Çizelge 4.22'de görüldüğü gibi türlerin kararmış ya da kararmamış olarak oluşturdukları kallus benzeri yapılar hemen hemen aynı besi ortamlarında belirmiştir. Bu da söz konusu besi ortamlarının kallus vb. yapıların oluşmasında etkili olduğu şeklinde yorumlanabilir. Örneğin VWD besi ortamı *A. pyramidalis* türü hariç diğer tüm türlerde hem kararmış hem de kararmamış kallus vb. yapıların oluşumuna zemin olmuştur. Genel olarak bakıldığında kallus benzeri yapıların oluşmadığı hiçbir bitki türünün olmadığı tespit edilmiştir. En çok kararmış ve kararmamış kallus benzeri yapılar, ½ MS ortamına ekilen

D. umbrosa türüne ait tohumlardan sırasıyla % 76.67 ve % 93.33 oranlarında elde edilmiştir. *D. umbrosa* türü her ne kadar protokorm ve sürgün oluşturmada performans göstermiş olsa da, türün kallus benzeri yapıların oluşmasına da uygun olduğu açıkça görülmektedir. Çizelge 4.21 ve Çizelge 4.22'den anlaşıldığı gibi aynı türe ait tohumların ekildiği aynı besi ortamlarında genellikle kararmamış kallus benzeri yapılar, kararmış yapılardan sayıca fazladır. Buradan anlaşılan, besi ortamları içine ekilen tohumlardan oran olarak kararmamış olan kallus benzeri yapıların, kararmamışlara göre daha fazla olduğu; ve her türün bu yapılardan oluşturmuş olmasıdır. *Ophrys sphegodes* tohumlarında oluşan bir protokorm hem yeni bir protokorm hem de bir bitkiciğin oluşumuna neden olmuş bazen de kallus benzeri oluşumları geliştirmiştir (Mead ve Bulard, 1975). Tür farklı olsa da çalışmamızda kullanılan *O. starussii* tohumlarının benzer şekilde kallus oluşturma araştırıcıların söylemlerini desteklemektedir.

Sonuç olarak farklı türlerin ortamlara göre farklı reaksiyon oluşturdıkları açık olarak görülmektedir. Bu veriler ışığında kararmış kallus benzeri oluşumların gözlemlendiği ortamlar her türde farklı seviyede etki gösterdiği ve buna sebep olan etkenlerin ortamlar değiştirilerek giderebileceği düşünülmektedir.

Çimlenme süresi sonuçlarına göre en geç çimlenen tür 170.33 gün ile KC ortamında bulunan *D. umbrosa* olurken, en erken çimlenenin ise 22 gün ile ½ MS ortamındaki *D. iberica* türü olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar çimlenme süresine hem türün, hem de ortamın farklı etkilerde bulunduğunu göstermiştir. Örneğin KC ortamında *A. pyramidalis* ve *O. palustris* hiç çimlenemezken, *D. umbrosa* 170.33 günde çimlenmiş, bununla birlikte *D. iberica* türü ise 26.83 gün gibi en erken çimlenenler arasında yerini almıştır (Çizelge 4.23). Bu sonuçlar farklı türlerin, farklı besi ortamlarına değişik yanıtlar verdiği kanısını oluşturmaktadır.

Çalışmamızda protokorm süresi bakımından en geç protokorm oluşumu 313.67 gün ile KC ortamındaki *D. umbrosa* türünde olmuştur. En erken protokorm oluşumu ise 53.50 gün ile MS ortamındaki *D. iberica* türünde gerçekleşmiştir. Protokorm süresi de çimlenme süresine benzer olarak aynı ortamda türe bağlı olmak üzere oldukça farklı değerler ortaya çıkarmıştır (Çizelge 4.24). Burada ortaya çıkan değerler farklı türlerin besi ortamına göre değişik reaksiyon göstermesi ile açıklanabilir.

Sürgün oluşum süresi bakımından elde edilen verilere göre en geç sürgün oluşumu 411.44 gün ile 1/10 MS besi ortamındaki *O. palustris* türünde gerçekleşirken,

en erken sürgün oluşumu 79 gün ile MS ortamındaki *D.iberica* türünde görülmüştür. MS ortamında diğer türlerde hiç sürgün elde edilemez iken, *D. iberica*'da en erken sürgün oluşum süresi elde edilmesi diğer gelişim sürelerinde olduğu gibi, türler ile besi ortamları arasındaki farklı etkileşimle açıklanabilir.

Tohum ekiminden itibaren izlenen çimlenme, protokorm ve sürgün oluşumları iki yıla yakın uzun bir süreçte takip edilmiştir. Gözlemlerin sonucunda türlerin farklı uygulamalarında tam homojenlik bulunmamıştır. Bunun anlamı bir türün farklı besin ortamlarında çimlenme, ardından protokorm ve sürgün oluşturma sürelerinin farklılık göstermiş olmasıdır. *D. iberica* ve *D. romana* subsp. *georgica* türlerine ait tohumlar her ortamda çimlenme ve ilerisinde protokorm oluşturmuş ancak *D. romana* subsp. *georgica* türünde sürgün oluşum safhasına kadar gidilememiştir. Aynı durum 1/10 MS ortamında protokorm geliştiren *A. pyramidalis* türünde ve ½ MS ortamında protokormları oluşan *O. straussii* türünde de görülmüştür. Bu ortamlarda bulunan türlere ait protokormlar sürgün geliştirememiş ve dolayısıyla bitkiciğe dönüşememiştir. Çimlenme ile ilgili olarak tohum ekiminden itibaren geçen süre incelendiğinde genel olarak en erken ½ MS ortamına ekilen *D. iberica* tohumlarının 22 günde çimlendiği görülmektedir. En uzun çimlenme süresi ise (191.83 gün) 1/10 MS ortamına ekilmiş olan *O. palustris* türünden elde edilmiştir.

Yararbaş (2008), 4 dakika ultrason uygulanan *Orchis italica* tohumlarının 90 gün sonra çimlendiğini bildirmiştir. Çalışmamızda *O. palustris* türünün 191 gün gibi uzun bir zamanda çimlendiği belirlenmiştir. Araştırmacının yaptığı çalışmada ultrason ve ses dalgalarının tohum kabuğunu kırmada etkili olduğu ve çalışmamızda *D. romana* subsp. *georgica* tohumlarının çimlenme sürelerine yakın sonuçlar elde ettiği söylenebilir.

Hiç çimlenme göstermeyen türlerin dışında; genel olarak tüm türler bazında incelendiğinde *D. iberica* türünün her besi ortamında en erken sürede protokorm oluşumu başlattığı görülmektedir.

Doku kültürü ortamında besi ortamlarına ekilen tohumların ulaşabildikleri son aşama olan sürgün aşamasıyla birlikte bitkicik safhasına gelinmiş olmaktadır. Çalışmanın sonunda her çimlenen ve protokorm oluşturan tohumların sürgün aşamasına kadar gelemediği; gelenlerin ise ekildikleri ortama göre farklı sürelerde geliştikleri anlaşılmıştır.

Süberoğlu (1987), bazı salep orkidelerinde yaptığı çalışmada tohumları kültüre aldıktan 3 ay sonra, Bürobet ve Knudson C ortamına 2 mg/lt IAA katılmasıyla elde edilen Knudson 6 ortamına aktarmayla protokorm oluşumunun başladığını görmüş ve bu tarihten 15 gün sonra da yeşil sürgün gelişimi gözlemlemiştir. Araştırmacı kullandığı iki farklı besi ortamının içine IAA hormonu karıştırmış ve kısa zamanda protokorm sürgün oluşumunu başlattırıştır. Çalışmamızda KC ile yapılan çimlendirmelerde *D. iberica* ve *O. straussii* türlerinin protokorm oluşumlarında yaklaşık süreler kaydedilmiştir, ancak *D. romana* subsp. *georgica* ve *D. umbrosa* türlerinde daha uzun süre gerekmiştir. Bu sonuç ortama katılan IAA hormonunun protokorm gelişimine önemli etkide bulunduğunu göstermektedir. Barroso ve ark. (1990), Curtis ortamına ekilen *Ophrys lutea* ve *Ophrys fusca* türlerine ait tohumların ekildikten 2 ay sonra protokorm oluştuğunu; 6 ay sonra orkide ortamlarına alınınca 5 cm yüksekliğinde köklü bitkicikler elde edildiğini bildirmiştir. Çalışmamızda *O. straussii* türü VWD ve KC ortamlarında 2 ay civarında protokorm oluşturmuş olup diğer ortamlarda daha yüksek süreye ihtiyaç duyulmuştur. Ancak sürgün oluşturmada araştırmacıların bulgusundan çok daha kısa zamanda başarı sağlanmıştır. Burada ortamın ve türün protokorm oluşum süresi üzerinde etkili olduğu fikrine varılmıştır. Valletta (2008) ise *Orchis mascula* türünün ekimden 4-5 ay sonra ilk sürgün ucunun görüldüğüne ancak 5-6. aylarda ilk yaprakçığın belirdiğine değinmiştir. Oysa çalışmamızdaki *O. palustris* türü sürgün oluşturmada çok daha düşük performans göstererek çalıştığımız türler arasında en geç sürgüne giden tür olmuştur. *Orchis italica* türüne ait bitkiciklerin 7 aylık olunca dış ortama aktarılmaya hazır hale geldiği bildirilmiştir (Yararbaş, 2008). Sarı ve ark. (2011), Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü çerçevesinde 1999-2000 yılları arasında yaptıkları çalışmada, *Orchis sancta* türünde 316 günde % 71.4; *Orchis laxiflora* türünde 330 günde % 65.5 oranında yumrulu bitkicik elde etmiştir. 9 orkide türünün farklı oranlarda patates ekstraktı, muz ekstraktı ve hindistan cevizi sütü ile GA₃ ve BAP hormonlarının ilave edildiği KC ve VWD besin ortamlarında in vitroda embriyo kültürü yapılmıştır. Bitkicikler genellikle patates ekstraktı eklenen KC ortamından elde edilmiştir. Çalışmada hormonların bitki gelişimine önemsenir derecede etki etmediği belirlenmiştir.

Hadley (1983), Avrupa orkide türlerine ait tohumların simbiyotik kültürlerde 3-6 ayda ulaştığı gelişmeye, asimbiyotik kültürlerde 2 yılda ulaşabileceğini bildirmiştir. Bu

bilgiler ışığı altında, çalışmamızın sonunda kullandığımız türlere de bağlı olarak simbiyotik çimlenme sonucunda gelineen sürgün aşamasına, asimbiyotik kültürden daha hızlı gelindiği söylenebilir. Burada kullanılan fungusun çimlenmeyi hızlandırıp, protokorm ve sürgün aşamasına daha çabuk gelindiği; ancak ne kadar hızlı bitkicik oluşumu gerçekleşse de sürgünlerin simbiyotik kültürde kök ve yumru oluşturamadığı ortaya çıkmıştır. Buradan belki sürgün aşamasından sonra kök ve yumru oluşumu için farklı besi ortamlarının kullanılması gerekebileceği düşünülmektedir.

In vitroda elde edilen bitkiciklerin 3 ay kadar bir süreden sonra canlılıklarını kaybetmiş olup, maalesef yapılan başka çalışmaların çoğunda görülen durumla karşı karşıya kalınmıştır. Bir çalışmada doku kültürü ortamında elde edilen bitkicikler *R. repens* fungusunun bulaştırıldığı torf+perlite karışımından oluşan dikim harcı içine dikilmiştir (Kısakürek, 2011). Ancak bir süre sonra mantarlaşmaların görüldüğü, daha sonra bu mantarların bitkiye bulaşarak ölüme neden olduğu bildirilmiştir. Mantarlaşmanın olmadığı bitkilerde ise hiçbir şekilde gelişme görülmemiştir. Doku kültürü yoluyla çoğaltma yapılan çalışmaların çoğunda yaşanan olumsuzluklar araştırmacıyla benzer olarak, çalışmamız da dahil olmak üzere sık rastlanan bir durumdur. Çalışmamızın sonunda elde edilen köklü ve yumrulu bitkicikler içlerinde kendi rizosfer topraklarının da bulunduğu dikim harcına aktarıldıktan bir süre sonra canlılıklarını kaybetmiştir.

5.3. Sonuç

Çalışmanın tamamı dikkate alındığında ortaya çıkan en önemli sonuçlardan birisi, Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki sert ekolojik ve iklimsel koşullarının salep orkidesi tohumlarında kalın tohum kabuğuna sebep olduğu ve dolayısı ile de kabuğun doku kültürü ortamında çatlama ve çimlenmesini engellediği düşünülmektedir. Daha önce Akdeniz, Karadeniz ve Ege Bölgeleri gibi nemli ve iklim olarak mutedil yerlerde yapılan çalışmalarda oldukça yüksek çimlenme değerleri elde edilmiştir. Çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlar benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında daha düşük değerler göstermesinin başlıca nedeni olarak tohumların toplandığı bölge ekolojilerinin ağır koşullara maruz kalması olarak düşünülebilir. Bununla birlikte güç de olsa başarı elde

edilmesi çalışmamızda değişik yöntemlerin (in vitro, in vivo, simbiyotik kültür (*Rhizoctonia solani*, binükleuslu *Rhizoctonia* sp. izolatları ve yulaf ortamı, modifiye yulaf ortamı, potato dekstroze agar ortamı), asimbiyotik kültür (Van Waes Debergh, Knudson-C, Murashige&Skoog, ½ MS, 1/10 MS ortamları) uygulamasının bir sonucudur. Kullanılan bitki türlerinin yumru ve rizosfer topraklarıyla yapılan fungus izolasyonlarında *Rhizoctonia* fungusu çok sınırlı olarak izole edilmiştir. Bunun nedeni fungus izolasyonu için toplanan materyallerin mevsimsel uygunluğu ve daha önemlisi elde edildiği bitkilerin yetişkinlik durumudur. İzolasyonlar sonucu pek çok fungus elde edilmiş ancak mikorizal olarak simbiyotik ilişki sağlayacak potansiyelleri olmadığı düşünülerek, sadece literatürlerde ağırlık verilen *Rhizoctonia* cinsi funguslara ait *R. solani* ile binükleik *Rhizoctonia* kullanılmıştır. Fakat *R. solani* ile yapılan kültürlerde hiçbir gelişmenin olmaması bitki türleri ile kullanılan mikorizanın uygunluğuna dikkat çekmiştir. Gelişen sürgünler belki besi ortamının bitki gelişimi için yetersiz kalmasından belki de fungusun parazitik etki yapmasından dolayı daha fazla gelişmemiştir. Kök ve yumru oluşturup dış ortama aktarılabilecek duruma gelen bitkicikler sadece in vitroda asimbiyotik kültürlerden elde edilmiştir. Kullanılan tüm besi ortamları ve türler bunun için yeterli olmamıştır. In vitro ortamında gelişen bu bitkicikler steril edilmiş dikim harcına aktarıldıktan sonra bir süre laboratuvar koşullarında bekletilip izlemeye alınmıştır. Yaklaşık 3 ay kadar diriliklerini koruyan bitkiler giderek canlılıklarını kaybetmiştir.

In vivoda ise simbiyotik ve asimbiyotik kültürlerin her ikisinde de, çimlenme ve takiben olabilecek gelişmeler elde edilememiştir. Bu da orkidelerin doğada kendiliğinden ne kadar zor çimlendiğini göstermektedir. Doğada milyonlarca tohumu sahip bitkilerin ancak uygun sıcaklık, ışık, toprak ve mikoriza gibi ekolojik koşullarda zorlukla çimlenebilmesi, bizi kısa sürede cevap alınabildiği için doku kültürü yöntemi ile çimlendirme yoluna sevk etmiştir. Ancak pek çok çalışmada olduğu gibi laboratuvar ortamında gelişen bitkilerin dış ortama aktarıldıktan sonra adaptasyon sağlayamaması durumu ortaya çıkmış olup bitkicikler hayatlarının devam ettirememiştir. Tohum olarak bu kadar çok materyal varken, elde edildikten sonra adaptasyon sorunu yüzünden bitkilerin kaybedilmesi bir anlamda çabaları boşa çıkarmaktadır. Bu tip çalışmalar ancak, kullandığımız nesilleri tehdit altında ve zarar görebilecek bitki türleri gibi genetik olarak devamlılık sağlamak ve bitkiyi tanımakla sınırlı kalacaktır.

Çalışma sonuçlarımızın bundan sonraki çalışmalarda, tohumların özellikle Van ilinden toplanmasıyla bölgeyi karakterize etmek adına farklı ekolojik alanlarda yetişen bitki türleri ve tohumların çimlendirilip bitkicik elde edildiği besi ortamları hakkında fikir verebileceği düşünülmektedir. Bu tip çalışmaların gerçekten üretime ve çoğaltmaya yönelik başarı ile sonuçlanması için sadece laboratuvar ortamında sınırlı kalmayıp, özellikle dışarıya adaptasyon sorunun çözülmesi konusunda durulmalı ve bu tip çalışmaların arttırılması yönünde ivme alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- Aggarwal, S., Zettler L.W., 2010. Reintroduction of an endangered terrestrial orchid, *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo, assisted by symbiotic seed germination: First report from the Indian subcontinent. *Nature and Science*, **8**(10): 139-145.
- 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., Ivasenko, Zh., V., 2007. Viability of different plant offsprings of *Dactylorhiza maculata* (Orchidaceae) after transfer from in vitro culture to nature. *Botanicheskii Zhurnal*, **92**(10):1544-1554.
- Anonim, 2007a. <http://www.sorgun.org/phpBB2/viewtopic.php?t=1179> 13.08.2007.
- Anonim, 2007b. http://www.reference.com/browse/wiki/Orchid_mycorrhiza 11.04.2007
- Anonim, 2010a. <http://www.google.com/earth/index.html> 14.03.2010.
- Anonim, 2010b. Van Meteoroloji Bölge Müdürlüğü Kayıtları.
- Anonim, 2011. <http://www.orchis.de/orchis/docs/e002a.htm> 20.10.2011.
- Arditti, J., 1967. Factor affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* **33**:1-97
- Arditti, J., 1979. Aspects of orchid physiology. *Bot. Rev.*, **7**:421-655.
- Arditti, J., Harrison, C.R., 1977. Vitamin requirement and metabolism in orchids. 6. *Orchid Biology: Review and Respectives*. Cornell University Pres, I, Ithaca, NY. 160-175.
- Aytaş, T., 1994. *Bazı Ophrys L. (Orchidaceae) Türlerinden Simbiyotik Fungusların İzolasyonu ve Ophrys apifera Hudson Tohumlarının Asimbiyotik ve Simbiyotik Ortamlarda Çimlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma* (yüksek lisans tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Barroso, J., Fevreiro, P., Oliviera, M.M., Pais, M.S.S., 1990. In vitro seed germination, differentiation and production of minitubers from *Ophrys lutea* Cav., *Ophrys fusca* Link and *Ophrys speculum* Link. *Scientia Horticulturae*, **42**(4):329-337.
- Bernard, N., 1909. L'évolution dans la symbiote. *Annis. Sci. Nat. (Bot.)* Ser 9.9.1.
- Beyrle, H., Pennigfeld, F., Hock, B., 1985. Orchid mycorrhiza: Symbiotic propagation of the some *Dactylorhiza* species. *Zeitschrift-fur-Mykologie*, **51**(2):185-198.

- Bouyoucous, G. D., 1951. A Recalibration of the Hydrometer method for making mechanical analysis of the soil. *Agronomy J.*, 43:434-438.
- Burgeff, H., 1936. *Die Samenkeimung der Orchideen*. G. Fischer, Jea. 312.
- Chang, C., Chen, Y.C., Yen, H.S., 2005. Protocorm or rhizome? The Morphology of seed germination in *Cymbidium dayanum* Reichb. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 46:71-74.
- Chesters, C.G.C., 1949. Concerning fungi inhabiting soil. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 32, 197-216.
- Clements, M.A., Ellyard, R.K., 1979. The symbiotic germination of Australian terrestrial orchids. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, 48: 810-816.
- Clements, M.A., Muir, H., Cribb, P.J., 1986. A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew. Bull.*, 41(2): 437-445.
- Curtis, J.T., 1939. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. *Amer. J. Bot.*, 26:390-399.
- Çağlayan, K., Özavcı, A., Eskalen, A., 1998. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaygın olarak yetişen bazı salep orkidelerinin embriyo kültürü kullanılarak in vitro koşullarda çoğaltılması. *Turkish J. Agriculture and Forestry*, 22:187-195.
- Das, A., Ghoshall, K.K., 1989. In vitro germination behaviour of some orchids seeds developed in plains of West Bengal. *IndianAgriculturist*, 33(2):103-109.
- Davis, P.H., 1984. *Flora of Turkey and the East Aegan Islands*. Volume: 8, Edinburg University Press, Great Britain.
- Dijk, 1990. Effects of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen response of juvenile orchids. *Scientia Horticulturae*, 29(1-4):91-97.
- Erdem, H.E., 2004. *Biyolojik Çeşitliliğinin Ekonomik Değerinin Belirlenmesi: Yabani Orkide Örneği* (yüksek lisans tezi). E.Ü., Fen Bilimleri Ens., İzmir.
- Ernst, R., Arditti, J., 1990. Carbohydrate physiology of orchid seedlings, III. Hydrolysis of maltooligo saccharides by *Phalaenopsis* (Orchidaceae) seedlings. *Amer. J. Bot.*, 77(2):188-195.
- Esitken, A., Ercisli, S., Eken, C., 2005. Effects of mycorrhiza isolates on symbiotic germination of terrestrial orchids (*Orchis palustris* Jacq. and *Serapias vomeracea* subsp. *vomeracea* (Burm.f.) Briq.) in Turkey. *Symbiosis*, 38(1):59-68.

- Esitken, A., Ercisli, S., Eken, C., Tay, D., 2004. Seed priming effect on symbiotic germination and seedling development of *Orchis palustris* Jacq. ISSN: 0018-5345. **Hort Science**, 39(7):1700-1701.
- Garrett, S.D., 1981. **Soil Fungi and Soil Fertility**. 2nd. Edition, Pergamon. Oxford, 150.
- Gezgin, Y., 2004. **Çeşitli Salep (Orkide) Türlerinde Mikoriza Oluşturan Fungusların İzolasyonu ve Tanımlanması ile İnokulant Olarak Kullanım Olanaklarının İncelenmesi** (yüksek lisans tezi). E.Ü., Fen Bilimleri Ens., İzmir.
- Gönülşen, N., Önal, K., Ercan, N., Yıldızgördü, K., Şekeroğlu, E., Biçici, M., Eskalen, A., 1996. Ege ve Doğu Akdeniz Bölgeleri'nde doğal yayılış gösteren *Orchidaceae* familyasına ait bazı türlerin in vitro ve in vivo koşullarda üretimleri üzerine araştırmalar. TÜBİTAK Proje Sonuç Raporu, Proje No: TBGAG-52.
- Güler, N., 1997. **Edirne Bölgesi'nde Yetişen Orchis L. Türleri Üzerinde Korolojik, Morfolojik, Sistemik, Karyolojik ve Palinolojik Araştırmalar** (yüksek lisans tezi). Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
- Gümüş, C., 2009. **Batı Karadeniz Bölgesi'nde Salep Elde Edilmesinde Kullanılan Bazı Orkide Türlerinin (Orchidaceae) Çoğaltım Yöntemleri Üzerinde Araştırmalar** (doktora tezi). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Gümüş, C., Sezik, E., Ellialtıoğlu, Ş., 2008. Batı Karadeniz Bölgesi'nde yetişen ve salep elde edilen bazı orkide (*Orchidaceae* sp.) türlerinin doku kültürü ile çoğaltılması üzerinde bir araştırma. **III. Ulusal Süs Bitkileri Kongresi**. 8-10 Kasım, İzmir, 179-187.
- Haas, NF., 1977. Asymbiotische vermehrung europäischer Erdorchideen I. *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó. **Die Orchidee**, 28: 27-31.
- Hadley, G., 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. **New Phytologist**, 69:1015-1023.
- Hadley, G., 1983. **Symbiotic germination of orchid seed**. The orchid review. February. 44-47.
- Hadley, G., Harvais, G., 1968. The effects of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. **New Phytol.**, 67:441-445.
- Harvais, G., 1973. Growth requirements and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture. **Can. J. Bot.**, 51:327-332.

- Harvais, G., 1982. An improved culture medium for growing the orchid *Cypripedium reginae* axenically. *Can. J. Bot.*, **60**(12):2547-2555.
- Harvais, G., Hadley, G., 1967a. The relation between host and endophyte in orchid mycorrhiza. *New Phytol.*, **66**:205-215.
- Harvais, G., Hadley, G., 1967b. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytol.*, **66**:217-230.
- Hasenekoğlu, İ., 1991. Toprak Mikrofungusları. Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 689, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Yayınları No: 11, Cilt: IV-VI. Erzurum.
- Hatipoğlu, A., 1981. Soğanlı, yumrulu ve rizomlu süs bitkileri, yetiştiriciliği ve sorunları. *Akdeniz Bölgesi Bahçe Bitkileri Yetiştiriciliğinde Sorunlar, Çözüm Yolları ve Yapılması Gereken Araştırma Simpozyumu*. 9-13 Nisan, İncekum, Alanya. 942-976.
- Hayakawa, S., Uetake, Y., Ogoshi, A., 1999. Identification of symbiotic *Rhizoctonias* from naturally occurring protocorms and roots of *Dactylorhiza aristata* (Orchidaceae). *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **69**(2):129-141.
- Hızalan, E., Ünal, E., 1966. *Topraklarda Önemli Analizler*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın no: 278.
- Hudson, H.J., 1986. *Fungal Biology*. Edward Arnold, London, 198.
- Hyakumachi, M., Priyatmojo, A., Kubota, M., Fukui, H., 2005. New anastomosis groups, AG-T and AG-U of binucleate *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of cut-flower and miniature roses. *Phytopathology*, **95**:784-792.
- 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.
- Jackson, M., 1958. *Soil Chemical Analysis*. Prentice Hall, Inc. New Jersey, USA.
- Jorgensen, B.I., 1998. Hardy and half hardy terrestrial orchids as potential new potplants. *Proceedings of the Third International Symposium on New Floricultural Crops*. 1-4 October. Perth, Western Australia. 195-205.
- Kacar, B., 1994. *Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizleri: III. Toprak Analizleri*, A.Ü.Z.F. Eğt. Araşt. ve Gel. Vakfı Yayın No: 3, Ankara.

- Karaca, İ., 1974. *Sistemik Bitki Hastalıkları, Deuteromycetes (Fungi Imperfecti)*. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 217, Cilt: IV, 243-255.
- Kısakürek, Ş., 2011. Kahramanmaraş florasında bulunan salep orkidelerinin kültüre alınabilme olanakları. *I. Salep Orkidesi Çalıştayı*. 24-25 Mayıs, Kahramanmaraş, 23-38.
- King, S.A., Buckney, R.T., 2002. Invasion of exotic plants in nutrient-enriched urban bushland. *Austral. Ecology*, 27(5):573-583.
- Knudson, L., 1929. Physiological investigations on orchid germination. *Proc. Int. Congr. Plant. Sci.*, 2:1183-1189.
- Knudson, L., 1950. Germination of seeds of Vanilla. *Amer J. Bot.*, 37:241-247.
- Koyuncu, M., Demirkuş, N., Kaya, A., Aziret, A., 1999. Van ve çevresi geofitler üzerinde floristik bir araştırma. *Y.Y.Ü. Araştırma Fonu Başkanlığı* Proje No:97 EF 030 Van, 133.
- Kreutz, C.A.J., 2000. *Flora of Turkey and East Aegan Islands. Vol:11*, University Press, Edinburgh, 656.
- Kronland, W.C., Stanghellini, M.E., 1988. Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condotion of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 78:820-822.
- Lauzer, D., St-Arnaud, M., Barabe, D., 1994. Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 32(6):408-412.
- Lee, Y., Lee, N., 2003. Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 39:475-479.
- Madigan, M.T., Martinko J.M., Parker, J., 2003. *Brock-Biology of Microorganisms*. 10th ed., Prentice Hall Inc., ISBN 0-13-085264-3.
- Masuhara, G., Katsuya, K., 1994. In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* sp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytol.* 127:711-728.
- Masuhara, G., Kimura, S., Katsuya, K., 1988. Seasonal changes in the myccorrhizae of *Bletilla striata* (Orchidaceae). *Trans. Mycol. Soc. Japan*. 29:25-31.

- Mead, J.W., Bulard, C., 1975. Effects of vitamins and nitrogen sources on asymbiotic germination and development of *Orchis laxiflora* and *Ophrys sphegodes*. **New Phytologist**, 74(1):33-40.
- Mitchell, R.B., 1989. Growing hardy orchids from seeds at Kew. **The Plantsman**, 2(3):152-169.
- Miyoshi, K., Mii, M., 1998. Stimulatory effects of sodium and calciumhypochlorit, prechilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed in vitro. **Physiologia Plantarum**, 102(4):481-486.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiol. Plant** 15:473-497.
- Ogoshi, A., 1975. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn and their perfect stages. **Review Plant Protection Research**, 8:93-103.
- Oliva, A.P., Arditti, J., 1984. Seed germination of North American orchids. II. Native California and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium* and *Spiranthes*. **Bot. Gaz.**, 145 (4):495-501.
- Olsen, S.R., Cole, V., Watanabe, F.S., Dean, L.A., 1954. **Estimations of Available Phosphorus in Soils by Extractions with Sodium Bicarbonate**. U.S. Dept. Of Agric. Cric. 939-941.
- Önal, K., 1999. Ege Bölgesi'nde doğal yayılış gösteren *Orchidaceae* familyasına ait bazı türlerin in vitro koşullarda üretimleri üzerinde araştırmalar. **Turkish J. Agriculture and Forestry**, 23(5):1057-1064.
- Özavcı, A.,1995. **Kahramanmaraş Bölgesi'nde Doğal Yayılış Gösteren Bazı Salep Orkidelerinin In Vitroda Yumru Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması** (yüksek lisans tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Özdener, Y., 1994. ***Dactylorhiza urvilleana* (Steudel) Bauman ve *Künkele* ve *D. iberica* (Bieb. Ex Willd) Soo (Orchidaceae) Türlerinin Köklerinden Fungusların İzole Edilmesi, Bu Türlerle Ait Tohumların Simbiyotik ve Asimbiyotik Kültür Ortamlarında Çimlenme ve Gelişmesi Üzerinde Bir Araştırma** (doktora tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

- Özkoç, İ., 1991. *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Briq. subsp. *laxiflora* (Soo) Gözl et. Reinhard ve *Orchis laxiflora* Lam. (Orchidaceae) Tohumlarının Simbiyotik ve Asimbiyotik Kültürlerde Çimlenme ve Gelişmesi Üzerinde Araştırılması (doktora tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Özkoç, İ., Dalcı, M., 1993. *Orchis laxiflora* tohumlarının iki farklı ortamda çimlenmesi ve gelişmesi üzerine bazı fungusların etkisi. *Doğa Türk Biyoloji Dergisi*, 17(1):23-28.
- Özkoç, İ., Dalcı, M., 1991. Bazı orkide türlerine ait tohumların çimlenmesi üzerine yüzeysel sterilizasyonda kullanılan sodyum hipokloritin etkisi. *Ondokuz Mayıs Üniv. Fen Dergisi*, 3(1):116-122.
- Papavizas, G.C., Adams, P.B., Lumsden, R.D., Lewis, J.A., Dow, R.L., Ayers, W.A., Kantzes, J.G., 1975. Ecology and epidermiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. *Phytopathology*, 65:871-877.
- Parlak, S., Tutar, M., 2011. Karaburun Yarımadası'nda yayılış gösteren salep orkideleri ve bazı toprak özellikleri. *Ziraat Mühendisliği*, 357:24-29.
- Pedroso, M.C., Pais, M.S., 1992. Minituber production from immature seed suspension culture of *Orchis papilionaceae*. *In vitro Cellular Developmental Biology*, 28:183-186.
- Rasmussen, H., Andersen, T.F., Johansen, B., 1990. Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant Cell and Environment*, 13:171-177.
- Rasmussen, H.N., Johansen, B., Andersen, T.F., 1991. Symbiotic in vitro culture of immature embryos and seeds from *Listera ovata*. *Lindleyana*, 6(3):134-139.
- Roberts, D.L., Herr, L.S., 1979. Superiority of a soil debris isolation method over a beet seed colonization method for assay of *Rhizoctonia solani* at high soil inoculum densities. *Can. J. Microbial*, 25:1110-1113.
- Ruglup, A., Chavez, V., Martinez, A., 1989. In vitro seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat. *Lindleyana*, 4(2): 68-73.
- Sarı, A.O., Tutar, M., Çiçek, F., 2011. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü salep üretim çalışmaları. *I. Salep Orkidesi Çalıştayı*. 24-25 Mayıs, Kahramanmaraş, 65-86.

- Sazak, A., 2004. *Bazı Orkide Türlerine Ait Tohumların Simbiyotik ve Asimbiyotik Olarak Çimlendirilmesi ve Fide Gelişimi* (yüksek lisans tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Sazak, A., Ozdener, Y., 2006. Symbiotic and asymbiotic germination of endangered *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. and *Dactylorhiza osmanica* (Kl.) Soó var. *osmanica* (endemic). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(12): 2222-2228.
- Sezik, E., 1984. *Orkidelerimiz, Türkiye'nin Orkideleri*. Sandoz Kültür Yayınları, No: 6, 166.
- Sezik, E., 2002. *Acta Pharmaceutica Turcica*. 44:151-157.
- Sharma, J., Zettler, L.W., Van Sambeek, J.W., Ellersieck, M.R., Starbuck, C.J., 2003. Symbiotic seed germination and mycorrhiza of federally threatened *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). *Am. Midl. Nat*, 149:104-120.
- Shimura, H., Koda, Y., 2005. Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* following inoculation after cold treatment. *Physiologia Plantarum*, 123(3):281.
- Smreciu, E.A., Currah, R.S., 1989. Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana*, (1)4:6-16.
- Sneh, B., Burpee, L., Ogoshi, A., 1991. *Identification of Rhizoctonia Species*. APSpres. St. Paul, Minnesota, 133.
- Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., Dijst, G., 1996. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Kluwer Academic Publishers, London, 577.
- Snow, R., 1985. Improvements in methods for the germination of orchid seeds. *Amer. Orch. Soc. Bull.*, 54(2):178-181.
- Süberoğlu, N., 1987. *Saleplerin Tohumla Üretilmeleri* (yüksek lisans tezi). Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Tekinşen, K.K., 2006. Salep. *Bilim ve Teknik*. (453):76-77.
- Thomas, G.W., 1982. *Exchangeable Cations*. Chemical and Microbiological Properties. Agronomy Monography. No:9, A.S.A.-S.S.S.A., Madison, Wisconsin. USA. 159-165.

- Tomita, M., Tsutsui, K., 1988. The effects of the concentration of powdered oats in the medium on the growth of symbiotic seedlings of *Spiranthes sinensis* Ames and *Liparis nervosa* Lindl. **J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.**, 63(4):354-362.
- Topçuoğlu, B., Kasap, Y., Alpaslan, M., Yalçın, R., 1996. Kahramanmaraş yöresinde doğal florada yetişen salep bitkisinin bazı bitki besin maddesi içerikleri ile salep bitkisinin yetiştiği toprakların bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri. **Ankara Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi** 2(3):7-10.
- Tsutsui, K., Tomita, M., 1986. Symbiotic germination of *Spiranthes sinensis* Ames associated with some orchid endophytes. **J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.**, 62(4):440-451.
- Tsutsui, K., Tomita, M., 1988. Differences in the symbiotic capacity among isolates of mycorrhizal fungi on some terrestrial orchids. **J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.**, 63(4):345-353.
- Vakkasoğlu, F., 1995. **Orkidelerde Mikorizal Fungusların Orkide Tohumlarının Çimlenmesi ve Büyümeleri Üzerine Etkisi** (yüksek lisans tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Valletta, A., Attore, F., Bruno, F., Pasqua, G., 2008. In vitro asymbiotic germination of *Orchis mascula* L. **Plant Biosystems**, 142(3):653-655.
- Van Waes, J.M., Debergh, P.C., 1986. In vitro germination of some Western European orchids. **Physiol Plant.**, 67(2):253-261.
- Van Waes, J., 1987. Effect of activated charcoal on in vitro propagation of Western European orchids. **Acta Hort.**, 212(1):131-138.
- Verdugo, G., Mesa, C., Cisternas, M., Calderón, X., 2007. Preliminar evaluation of acclimatization systems in *Chloraea crispa* Lind. (Orchidaceae) from inoculated seeds. **ISHS Acta Horticulturae 748. II International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants**. Volume 1, Cancun, Mexico.
- Walkley, A., 1947. A Critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils: effect of variations in digestion conditions and inorganic soil constituents. **Soil Science**, 63:251-263.
- Warcup, J.H., 1971. Specificity of mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids. **New Phytol.**, 70:41-46.

- Warren, R., 1981. Sowing the seed, Part II. ***Orchids from seed***. The Orchid Review, **Vol. 89**, No. 1051:149-151.
- Wilkinson, K.G., Dixon, K.W., Sivasithamparam, K., 1989. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi, and orchid seeds in relation to germination of Australian orchids. ***New Phytology***, 112:429-435.
- Wotavová-Novotná, K., Vejsadová, H., Kindlmann, P., 2007. Effect of sugars and growth regulators on in vitro growth of *Dactylorhiza* species. ***Biologia Plantarum***, 51(1):198-200.
- Yararbaş, R.T., 2008. ***Bazı Orkide Türlerinin In Vitro Koşullarda Çoğaltılması, Çiçeklenmesi*** (doktora tezi). E.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir.
- Zettler, L.W., 1997. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. ***Selbyana***, 18(2):188-194.
- Zettler, L.W., Steward, S.L., Bowles, M.L., Jacobs, K.A., 2001. Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. ***Am. Midl. Nat.***, 145:168-175.

ÖZ GEÇMİŞ

Denizli ili Güney ilçesinde 1973 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmir’de tamamladı. 1992 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Peyzaj Mimarlığı Bölümü’nü kazandı ve 1996 yılında mezun oldu. 2002 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nde araştırma görevlisi olana kadar İzmir’de özel sektörde çalıştı. 2002 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2002-2005 yılları arasında yüksek lisansını tamamladı. 2006 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda doktora öğrenimine başladı. Halen doktora öğrenimine devam etmektedir. Aynı zamanda 2002 yılından bu yana Y.Y.Ü. Yeşil Alan Müdürlüğü’nde görev yapmaktadır. Evli ve Nadire Gülce ÇIĞ adında bir kızı vardır.