

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter SALEP ORKİDE TOHUMLARININ *IN VITRO* ÇİMLENMESİ**

Duygu AĞAR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

HAZİRAN 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter SALEP ORKİDE TOHUMLARININ *IN VITRO* ÇİMLENMESİ**

Duygu AĞAR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

HAZİRAN 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter SALEP ORKİDE TOHUMLARININ *IN VITRO* ÇİMLENMESİ**

Duygu AĞAR
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS

HAZİRAN 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Barlia robertiana (Loisel.) Greuter SALEP ORKİDE TOHUMLARININ *IN VITRO* ÇİMLENMESİ

Duygu AĞAR
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS

Bu tez 11/06/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kenan TURGUT



Prof. Dr. A. Naci ONUS



Prof. Dr. Hasan BAYDAR



ÖZET

***Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter SALEP ORKİDE TOHUMLARININ *IN VITRO* ÇİMLENMESİ**

Duygu AĞAR

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Haziran 2018; 60 sayfa

Bu tez çalışmasında *Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter salep orkidesinin *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi üzerine araştırmalar yapılmıştır. *Barlia robertiana* bitkileri, nesillerini devam ettirebilmek için mikoriza fungusları ile simbiyotik birlikteliğe ihtiyaç duymaktadırlar. Ayrıca, çimlenen tohumdan yeni bir bitkinin meydana gelmesi de oldukça uzun sürmektedir. *Barlia robertiana*, yumrularından salep elde edildiği için, ticari değeri oldukça yüksek bir orkide türüdür. Doğadan bilinçsizce sökülmeleri, nesillerinin devamlılığını tehlike altına almıştır.

Bu çalışmada tohum sterilizasyonu için sodyum hipoklorit çözeltisinin iki farklı derişimi (%25 ve % 50) uygulanmıştır. MS (Murashige & Skoog), ½ MS ve OAM (Orchimax medium) temel besi ortamlarına, farklı dozlarda Kinetin, BAP (Benzilaminopurin) ve NAA (Naftalin asetik asit) büyüme düzenleyicileri eklenerek oluşturulan 6 farklı yapay besin ortamlarının *Barlia robertiana* tohumlarının çimlenmesine etkisi araştırılmıştır. Farklı ortamlarda kültüre alınan *Barlia robertiana* tohumları, aydınlık ortam, 1 ay karanlık ortam, 2 ay karanlık ortam ve 3 ay karanlık ortam olmak üzere toplam dört farklı fotoperiyottaki uygulamaların, tohum çimlenmesine etkisine ve protokorm oluşturma kabiliyetlerine bakılmıştır.

Çalışmada en yüksek çimlenme ve protokorm oluşumu, ½ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 NAA ortamından elde edilmiştir. Uygulama olarak, %50 sodyum hipoklorit ve tamamen aydınlık ortamda toplamda 19 adet protokorm oluşumu ile çalışmada en iyi sonuç alınmıştır. En iyi çimlenme gösteren ve en çok protokorm oluşturan besin ortamı, uygulamaları farklı da olsa ½ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 NAA besin ortamı olarak bulunmuştur. En yüksek çimlenme oranı 3 ay karanlık ortamda muamele edilen tohumlarda görülmüş, en fazla protokorm oluşumu ise yine 3 ay karanlık kültür ortamında gerçekleşmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: *Barlia robertiana*, *in vitro* çimlenme, protokorm, salep orkidesi

JÜRİ: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Hasan BAYDAR

ABSTRACT

IN VITRO GERMINATION OF *Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter SALEP ORCHID

Duygu AĞAR

MSc Thesis in Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Kenan TURGUT

June 2018; 60 pages

In this thesis, germination research of *Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter salep orchids was carried out on the *in vitro* conditions. *Barlia robertiana* plants need mycorrhizal fungi to maintain their generations. Also, it takes many years to develop new mature plants. *Barlia robertiana* has a very high commercial value because salep is obtained from its tuber. In an attempt to obtain salep, this species are crafted from the nature insensibly and it endangered the continuity of its generation.

In this study, two different concentrations (25% and 50%) of sodium hypochlorite solution were applied for seed sterilization. MS, ½ MS and OAM nutrient media with combination of Kinetin, BAP and NAA growth regulators at different doses in totally 6 medium were used and its effect on germination of *Barlia robertiana* seeds has been investigated. *Barlia robertiana* seeds were incubated four different photoperiod application which is light environment, 1 month dark environment, 2 months dark environment and 3 months dark environment and germination of seeds and their were investigated.

In the study, the highest number of seed germination and protocorm formation were obtained from ½ MS + 4 mg / l Kin + 0.5 NAA medium. The best result was obtained from 50% sodium hypochlorite and fully lighted environment with 19 protocorms. The most germinated and most nutrient media were found to be ½ MS + 4 mg / l Kin + 0.5 mg/l NAA but applied applications are different. The highest germination and ability to form protocorms was observed in the seeds treated in the dark for 3 months.

KEYWORDS: *Barlia robertiana*, *in vitro* germination, protocorm, salep orchid

COMMITTEE: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. A. Naci ONUS

Prof. Dr. Hasan BAYDAR

ÖNSÖZ

Orchidaceae familyası 20 binden fazla tür sayısı ile en zengin familyalardan biridir. Genellikle tropik bölgelerde geniş ve doğal bir yayılım göstermektedirler. Ülkemizde 24 cins ve 187 taksonla temsil edilen bu familyanın üyelerinden 125 adet tür ise yumrulu orkideler grubuna girmektedir. Yumrulu orkidelerin tamamına yakını toprak altında iki yumru bulundurup, biri bitkiyi oluşturan eski yumru, diğeri ise gelecek yıl bitkiyi oluşturacak olan yeni yumrudur ve bu yumrular kurutulup toz haline getirilerek milli içeceğimiz olan salep elde edilmektedir. Salep orkidelerinin yumruları, salep elde etmek amacıyla her yıl doğadan bilinçsiz ve aşırı olarak sökülmemekte, bu durum doğanın dengesini bozarak nadide bulunan değerli orkide türlerinin nesillerinin tükenmesine neden olmaktadır.

Salep çok eski yıllardan beri bilinen, şifa ve kuvvet verdiği inanan, süt ile kaynatılıp hazırlanan ve sıcak içilen bir içecektir. Soğuk algınlığına, bronşite, sindirim problemlerine iyi gelen salep, aynı zamanda iştah açıcı özelliğe de sahiptir. Mide hazımsızlıklarına yararlı olduğu bilinen salep tozunun içerisinde yer alan glikomannoz bileşiminin, kötü kolesterol ve kandaki trigliserit düzeylerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Geleneksel Maraş dondurmasına katılık, esneklik ve kıvam veren salep, ülkemiz ekonomisi için de önemli bir yere sahiptir.

Bu çalışmada yumrularından salep elde edilen, nadir bulunan ve koruma altında olan değerli salep orkidelerinden *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirilmesi araştırılmıştır. Yumrularından salep elde edilmesi nedeniyle, bilinçsizce toplanan ve tohumlarında endosperm bulundurmamaları sebebiyle doğada üremeleri için mikoriza fungusları ile simbiyotik bir birlikteliğe ihtiyaç duyan *Barlia robertiana* koruma altına alınmış ve nesli tükenmekte olan değerli bir salep orkidesidir. Bu çalışmada mikorizal funguslara gerek kalmadan *in vitro* kültür koşullarında *Barlia robertiana*'nın çimlendirilmesi, üretiminin artırılması amaçlanmıştır. Doğadaki dengenin bozulmaması ve ülke ekonomisine sağlayacağı yararlar bakımından nesli tükenmekte olan *Barlia robertiana*'nın üretiminin artırılıp, doğaya kazandırılması gerekmektedir.

Başta tez konumun belirlenmesi olmak üzere, yapılan bütün çalışmalarda yolumu açan, sonsuz desteği ile yanımda olan, değerli fikirleri ile bana yol gösteren, çok kıymetli danışman hocam Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kenan TURGUT' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bölüm laboratuvarını kullanımımıza açan, çok değerli desteğini üzerimde her zaman hissettiğim Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. A. Naci ONUS' a destekleri için çok teşekkür ederim.

Bitkilerin arazide teşhis edilerek kapsüllerin toplanması aşamasında öncülük eden ve yardımlarını esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. R. Süleyman GÖKTÜRK' e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm Güney Agripark şirketinde benden desteklerini esirgemeyen başta Ziraat Mühendisi Selda Durakoğlu olmak üzere, değerli şirket çalışanlarına çok teşekkür ederim. Bölüm laboratuvarlarını beraber kullandığım ve

çok değerli yardımlarını benden esirgemeyen, her konuda fikir alışverişı yaptığım Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Bahçe Bitkileri Bölümü Arş. Gör. F. Burcu ÇELİKLİ ve Arş. Gör. Tuęçe ÖZSAN’a katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Yalnızca tez dönemimde değil, hayatım boyunca desteğini hep yanımda hissettiğim, beni her konuda cesaretlendiren, fikirleriyle bakış açımı genişleten, çalışmalarımın en başından sonuna kadar üzerimden desteğini esirgemeyen çok kıymetli nişanlım Bozok Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Tarla Bitkileri Bölümü Arş. Gör. Tansu USKUTOĞLU’na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yaşadığım bu günlerin mimarı olan canım aileme, desteklerini her zaman hissettirdikleri, her koşulda yanımda oldukları için, sonsuz ilgi ve anlayışları ile hayatıma kattıkları tüm güzellikler için sevgilerimi, saygılarımı ve en içten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	7
2.1. <i>Barlia robertiana</i> (Loisel.) Greuter Salep Orkidesinin Genel Özellikleri	7
2.2. Orkide Tohumlarının <i>In Vitro</i> Koşullarda Çimlendirme Çalışmaları	8
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Materyal.....	16
3.1.1. Bitkisel Materyal	16
3.1.2. Besin Ortamlarının Bileşimi	19
3.1.2.1. MS Temel Besin Ortamının İçeriği.....	21
3.1.2.2. Orchimax Temel Besin Ortamının İçeriği	23
3.2. METOT	25
3.2.1. Genel Sterilizasyon İşlemleri.....	25
3.2.2. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	26
3.2.3. Tohumların Kültüre Alınması.....	30
3.2.4. Yapılan Ön Uygulamalar	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. Besin Ortamlarına Göre Tohum Çimlenme ve Protokorm Oluşturma Yüzdesi...38	
4.2. Işığın Tohum Çimlenmesi ve Protokorm Oluşumuna Etkisi	43
4.3. Sodyum Hipoklorit Çözelti Değişiminin Sterilizasyon, Çimlenme ve Protokorm Oluşumuna Etkisi.....	44
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR	52
7. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek lisans Tezi olarak sunduğum “*Barlia robertiana* salep orkidesinin *in vitro* çimlendirilmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

11/06/2018

İmza

Duygu AĞAR



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

⁰C : Santigrad Derece

cm : Santimetre

g : Gram

l : Litre

mg : Miligram

mm : Milimetre

mM : Milimolar

% : Yüzde

Kısaltmalar

BAP : 6-Benzil Amino Pürin

CD : Koruma önlemi

EN : Tehlikede

IBA : İndol-3-Bütirik Asit

KC : Knudson C

LC : Düşük Riskli

LR : Az Tehdit Altında

MES : Morfolin Etan Sülfonik Asit

MS : Murashige Skoog

NAA : Naftalin Asetik Asit

NaOCl: Sodyum Hipoklorit

OAM : Orchimax aktif kömürlü besi ortamı

TTC : Trifenil Tetrazolium Kloridin

VU : Zarar Görebilir

VW : Vacin ve Went

VWB : VanWaes ve DeBergh



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Doğal alanda kapsül oluşturmuş <i>Barlia robertiana</i> (Loisel) Greuter bitkisi.....	16
Şekil 3.2. Toplanıp depo edilen <i>Barlia robertiana</i> (Loisel.) Greuter kapsülleri.....	17
Şekil 3.3. <i>Barlia robertiana</i> tohumları (a) Kapsül yapısı, (b) Kapsül içindeki tohumlar.....	18
Şekil 3.4. <i>Barlia robertiana</i> kapsüllerinin boyutları (a) Kapsül eni; (b) Kapsül boyu.....	19
Şekil 3.5. Temel besi ortamlarının hazırlanması.....	20
Şekil 3.6. <i>Barlia robertiana</i> 'nın <i>in vitro</i> çimlendirilmesinde kullanılan ortamlar.....	21
Şekil 3.7. MS temel besi ortamının hazırlanışı.....	22
Şekil 3.8. OAM (Orchimax aktif kömürlü besin ortamı).....	23
Şekil 3.9. Temel besi ortamlarının petri kaplarına aktarılması.....	25
Şekil 3.10. Steril kabinde petrilere dökülen besin ortamları.....	26
Şekil 3.11. 1. sterilizasyon denemesi <i>Barlia robertiana</i> tohumlarının yüzey sterilizasyonu.....	27
Şekil 3.12. 2. sterilizasyon denemesi <i>Barlia robertiana</i> tohumlarının yüzey sterilizasyonu a) % 30'luk sodyum hipoklorit + Tween-20 uygulaması b) Steril edilen kapsüllerin kurutulması	28
Şekil 3.13. <i>Barlia robertiana</i> tohumlarının yüzey sterilizasyonu a) 3x3cm çapındaki kurutma kâğıdına 1 gram tohum eklenmesi; b) Kurutma kâğıtlarının bohça şeklinde kapatılması; c) Tohumların etil alkol ile sterilizasyonu; d) Tohumların sodyum hipoklorit + Tween-20 ile sterilizasyonu	29
Şekil 3.14. <i>Barlia robertiana</i> 'nın steril edilen tohumlarının kurutulması	30
Şekil 3.15. Tohumların petrilere ekimi.....	30
Şekil 3.16. Farklı ortamlarda ve uygulamalarda ekimi yapılan tohumlar.....	31
Şekil 3.17. İklimlendirme odasında kültüre alınan <i>Barlia robertiana</i> tohumları.....	31
Şekil 4.1. <i>Barlia robertiana</i> 'nın 33 günlük çimlenen tohumlarının mikroskop altındaki görüntüsü	34
Şekil 4.2. İlk çimlenme gösteren ortam 28 günlük ($\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA).....	34

Şekil 4.3. İlk protokorm (14 günlük) oluşumu ($\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA- %25 sodyum hipoklorit-3 ay karanlık)	35
Şekil 4.4. <i>Barlia robertiana</i> 'nın ortamlara göre çimlenme performansları.....	39
Şekil 4.5. <i>Barlia robertiana</i> 'nın farklı ortamlarda çimlenen tohumları a) MS + 2 Mg/L Kin. (%25 NaClO - 2 ay karanlık) ortamında çimlenen tohumlar (22 günlük) b) MS + 1 mg/l Kin. (Aydınlık-%50) ortamda tohum çimlenmesi (16 günlük) c) $\frac{1}{2}$ MS + 2mg/l BAP + 0.5 NAA (%50-Aydınlık) çimlenen tohumlar (14 günlük) d) $\frac{1}{2}$ MS + 4 mg/l Kin + 0.5 NAA (%25- 3 Ay karanlık) ortamında çimlenen tohumlar (33 günlük) e) $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 NAA (% 25- 3 ay karanlık) ortamında çimlenen tohumlar (28 günlük) f) Orchimax + Aktif karbon (%25- 1 ay karanlık) ortamında tohum çimlenmesi (17 günlük).....	40
Şekil 4.6. Çimlenen <i>Barlia robertiana</i> tohumlarının oluşturduğu protokormlar a) Orchimax + Aktif karbon (% 50-3 ay karanlık) uygulamasından elde edilen protokorm (14 günlük) b) $\frac{1}{2}$ MS + 0.5 NAA (% 25- 2 ay karanlık) uygulamasından elde edilen protokorm (14 günlük) c) $\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/l BAP + 0.5 NAA (% 25- 3 ay karanlık) uygulamasından elde edilen protokorm (28 günlük) d) MS + 1 mg/l Kin (% 50- 3 ay karanlık) uygulamasından elde edilen protokorm (14 günlük) e) MS + 2 mg/l Kin (% 25-Aydınlık) ortamdan elde edilen protokorm (28 günlük) f) $\frac{1}{2}$ MS + 4 mg/l Kin + 0.5 NAA (% 25- Aydınlık) uygulamadan elde edilen protokorm (28 günlük).....	42
Şekil 4.7. <i>Barlia robertiana</i> 'nın ışıklanma sürelerine göre çimlenme oranı.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye’de Tehlike Altında Olan Endemik Orkideler.....	3
Çizelge 1.2. Endemik Olmayan Nadir Orkideler.....	4
Çizelge 3.1. <i>Barlia robertiana</i> ’nın in vitro çimlendirilmesinde kullanılan ortamlar.....	21
Çizelge 3.2 MS temel besi ortamının içeriği.....	22
Çizelge 3.3. OAM (Orchimax aktif kömürlü besin ortamı) İçeriği.....	24
Çizelge 4.1. In vitro koşullarda <i>Barlia robertiana</i> ’nın çimlenen tohum sayısı.....	36
Çizelge 4.2. <i>Barlia robertiana</i> in vitro çimlendirme çalışması varyans analiz tablosu.....	37
Çizelge 4.3. <i>Barlia robertiana</i> tohumlarının in vitro uygulamalarından oluşan protokorm sayısı.....	38
Çizelge 4.4. Besin ortamlarına göre çimlenen tohum sayısı ve çimlenme yüzdesi.....	39
Çizelge 4.5. Ortamlara göre protokorm sayısı ve protokorm oluşturma %’si.....	41
Çizelge 4.6. Işıklanma süresine göre çimlenme yüzdesi.....	43
Çizelge 4.7. Işıklanma süresine göre protokorm oluşturma yüzdesi.....	44
Çizelge 4.8. Sodyum hipoklorit derişiminin tohum çimlenmesine etkisi.....	45

1. GİRİŞ

Türkiye tıbbi ve aromatik bitkiler bakımından dünyadaki en zengin ve en önemli ülkeler arasında yer almaktadır. Bu zenginliğin içerisinde salep orkidelerinin yeri oldukça büyüktür. Tür sayısı bakımından çiçekli bitkilerin en büyük familyalarından biri sayılan *Orchidaceae* familyasının dünya üzerinde ortalama 600-800 cins ve 30.000-35.000 kadar türü mevcuttur (Özkoç 1991, Aytaş 1994). Son yapılan araştırmalara göre *Orchidaceae* familyasına 9 cinse ait 46 türün daha katıldığı bildirilmiştir (Kreutz 2000). Ülkemizde 150 adet orkide türü bulunmaktadır ve bunların %13'ü endemik olup, yumrularından salep elde edilen orkide sayısı 117 tür olarak belirlenmiştir (Sezik 2002). Genellikle tropik bölgelerde bulunan, ılıman ve sıcak bölgelerde çokça yetişen *Orchidaceae* familyası dünyada geniş bir alanda yayılış göstermekte olup, çiçekli bitkiler familyasında oldukça önemli bir yere sahiptir (Arslankaya 2012).

Orkideler toprak altında yumru, kök veya rizom bulundurlar. Yumrulu olan orkide cinslerinde, yumrular yuvarlak, parçalanmış ya da elips şeklinde farklı formlar gösterebilmektedir. Yumruların büyüklükleri ve şekil yapısı orkide cinslerinin ayırımında en önemli belirleyicidir (Sezik 1984). Çok yıllık otsu bitkiler grubuna giren *Orchidaceae* familyasının, yumru veya rizom taşıyan üyeleri daha çok ılıman bölgelerde bulunur ve toprakta yaşar. Bir kısmı ise tropik bölgelerde epifit olarak ağaçların üzerinde varlığını devam ettirmektedir (Arslankaya 2014).

Orkideler pahalı ve nadide bitkilerdir. Bu sebeple ticari değerleri oldukça yüksektir. Göz alıcı renklerdeki çiçekleri ve dış görünüşünün güzelliği ile çok talep edilen orkideler eşsiz güzelliğe sahip bir süs bitkisidir. Bunun yanı sıra orkide yumrularından meydana gelen ve sıcak olarak içilen ve milli içeceğimiz olan salep, orkidelerin yumrularından elde edilmektedir. Salep elde edebilmek için, bitki çiçeklendikten sonra toprak altında bulunan yumruları toplanmaktadır. Bu amaçla gövdeyi taşıyan ana yumrunun alınması pek önerilmemekle birlikte onun yerine genellikle yan yumrular alınmaktadır. Yumrular toplandıktan sonra su ile yıkanarak temizlenmektedir. Temizlenen yumrular ipe dizildikten sonra su ya da süt ile kaynatılarak açık havada kurutulmaktadır. Yumrular kuruduktan sonra ise toz haline getirilmektedir. Sonuç olarak elde ettiğimiz bu toz, soğuk kış günlerinde sıcak olarak tükettiğimiz içecek durumundaki saleptir. Salep elde edilen orkideler, toprak altında iki adet olmakla birlikte, biri diğerine oranla biraz daha büyük yapıda olan yumrular bulundurmaktadır. Bu yumrulardan küçük olan büzüşmüş yapıda ve kahverengimsi renktedir. Büyük olan yumru ise, parlak görünümlü ve şişkindir. Salep üretimi için kullanılan yumrular daha çok; büyük, şeffaf ve parlak görünümlü yumrulardır. Bu yumrular, 5-30 mm genişliğinde ve 10-40 mm uzunluğunda olup, oval bir şekle sahiptir (Sezik 1984, Arslan 2012).

Salep antik zamanlardan beri ilaç olarak, besin kaynağı olarak ve keyif verici madde olarak kullanılmaktadır (Karaman 2009). *Materia Medica* isimli eserin sahibi ünlü hekim Dioscorides, salebin kuvvet verici etkilerinin olduğunu eserinde vurgulamıştır. Türkler ise, İslamiyet'in kabulü ile İslam dininin yasakladığı alkollü içecekleri terk ederek, salep ile tanışmıştır. Salep tıp dünyasının önde gelen hekimlerinden İbn'i Sina tarafından da kullanılmış olup ilk tıp kodeksi olarak kabul edilen *Düsturu'l Edviye'de* kayıt altına alınmış önemli bir drogdur (Arslan 2012). Bu gelişmelere ek olarak salep, 1940 tarihli Türk kodeksinde ve Alman Farmakopesinde de kayıt altına alınmıştır. Salep yumrusu üzerinde ilk çalışmayı Dragendorf 1865 yılında yapmıştır. Dragendorf salep

yumrusu kimyasal içeriğini incelemiş ve bu çalışmasıyla salebin kimyasal içeriğini %48 oranında müsilaj, %24 oranında nişasta, %5 oranında protein, %2 oranında mineral madde ve %1 oranında şeker olarak belirlemiştir. Piyasada bulunan ticari saleplerin yapısında %11-44 oranında glikomannan, %8-19 oranında nişasta, %2-3 oranında şekerler ve %1 oranında protein yapıdaki maddelerin bulunduğu tespit edilmiştir. Salebin kullanımının temel sebebi salebin etken maddesi olan glikomannandır. Bu maddelerin su ile (ayran ve süt ile de) şişerek viskoz bir çözelti meydana getirdiği yapılan araştırmalarla belirlenmiştir. Kalitesi iyi olan bir salep örneği %40 civarında glikomannan taşımaktadır. Glikomannan 3 molekül mannozun 1 molekül glukoz ile β (1-4) bağıyla bağlanıp, polimerleşmesi sonucu oluşan heterojen yapıda bir poliholozit olarak ifade edilmektedir. İçtiğimiz salebe kıvam veren, yediğimiz Maraş dondurmasına geç erime ve sertlik sağlayan, salebin etken maddesi olan glikomannanlardır. Salebin yapısında bulunan az miktardaki nişasta da, şişme özelliği nedeniyle, glikomannanlara yardımcı olmaktadır (Sezik 1984).

Son yıllarda doğal salep üzerine yapılan çalışmalarda, doğal salep tozunun içeriğinde glikomannoz adı verilen bir bileşim tespit edilmiştir. Bu bileşimin kandaki trigliserid düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiş, kötü kolesterolü engellediği yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Salep, iştah açıcı ve zihin güçlendirici etkilere sahip olmasının yanında, geçmişten günümüze kadar gelen bu süreçte daha çok afrodizyak etkisi ile de bilinmektedir. Ülkemizde salep tıbbi amaçlı olarak üst solunum yolları rahatsızlığı tedavisinde, ülser tedavisinde ve ishal önleyici olarak da kullanılmaktadır. Soğuk algınlıkları, öksürük, bronşit ve mide hazımsızlıklarına da iyi geldiği belirtilen salep içeceğinin, sıcak içecek olarak tüketilmesinin yanında dondurma üretiminde de kullanıldığı bilinmektedir. Salep, geleneksel Maraş dondurmasına katılık ve esneklik veren, dondurmanın erime noktasını yükselten, çok önemli bir katkı maddesidir (Kreutz 2002; Oğuz vd. 2005). Genellikle kış aylarında tüketilen salebin, bağırsak rahatsızlıklarına, öksürük ve soğuk algınlığına iyi geldiği de eski zamanlardan beri kabul görmüş bir düşüncedir. ‘Çayırotu’ ya da ‘çemçiçeği’ olarak da adlandırılan salep, dilimize Arapça’dan geçmiş olup tilki anlamına gelmektedir. Osmanlı imparatorluğu döneminde padişah için hazırlanan macunların içerisine, diğer şifalı bitkilerle birlikte konulduğu da kayıtlara geçmiştir. Yine aynı dönemlerde şifa vermesi için sokaklarda güğümlerle birlikte satılan salep günümüze kadar varlığını sürdürmeyi başarmıştır (Anonim 2011).

Her yıl 100’den fazla türe ait orkide yumrusu doğadan toplanarak bu yumrulardan 40 tona yakın salep elde edilmektedir. Yapılan araştırmalara göre, ortalama iki salep yumrusunun kuru ağırlığı yaklaşık 1 gram olarak ölçülmüş ve her yıl yaklaşık 80 milyon orkidenin, doğadan salep elde etmek amacıyla söküldüğü bilinmektedir (Koyuncu 2011). Dünya genelinde orkideler korunması gereken ve nesilleri tehlike altında olan bitkiler olarak kabul edilmektedir. Yumrularından salep elde edilen orkidelerin durumları ise çok daha ciddi bir öneme sahiptir. Salep orkidelerinin yumruları sürekli toplandığı için, bitki bir türlü tohum oluşturmamakta, tohum oluştursa bile, oluşan tohumun çimlenmesi oldukça güç gerçekleşmektedir. Orkide tohumlarının en belirgin özelliği tohumlarının oldukça küçük olması, tohumlarında endospermin bulunmaması ve embriyonun gelişmemiş durumda bulunmasıdır. Bu tohumların uzunluğu 0.25-1.2 mm’dir ve genişlikleri 0.09-0.27 mm olup; ağırlıkları 0.3-1.4 mg’dır (Arditti 1967).

Mitchell’e (1989) göre tüm çiçekli bitkiler içerisinde en küçük tohuma sahip türler orkidelerdir. Smreciu ve Currah (1989) orkide tohumlarının embriyolarının çok küçük

olduğunu ve bu tohumların testalarının ince olduğunu belirterek orkideyi meydana getiren tohumların şeffaf ve gevşek yapılı bir hücre tabakasından meydana geldiğini vurgulamıştır. Orkide tohumlarının çimlenebilmesi için bulundukları habitatın iklimi büyük bir öneme sahiptir. Oldukça küçük boyuttaki tohumları ve tohum yapısında endosperm bulundurmaması gibi nedenlerle çimlenebilmesi için uygun ısı, ışık, nem, oksijen ve toprak şartlarına sahip olması gerekmektedir. Bu şartlara sahip olmasının yanı sıra, son derece sınırlı olan çoğalma kapasiteleri nedeniyle bulundukları ortamda uygun bir mikorizal fungus ile simbiyotik bir ilişki kurma ihtiyacı içerisindedirler (Sezik 1984). Orkide tohumlarının yapısında besin rezervleri bulunmadığı için dışarıdan bir karbonhidrat kaynağı sağlanmadıkça başarılı bir çimlenme gerçekleşmediği belirtilmektedir (Ingold ve Hudson 1993). Andersen ve Rasmussen (1996), tüm orkidelerin zorunlu mikorizal bitki olduğunu vurgulayarak, simbiyotik birlikteliklerinin yüksek bir oranla *Rhizoctonia* sp. ile gerçekleştiğini belirtmiştir. 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.

Orkideler ticari değerinin yüksek olması, nadide bulunmaları ve yumrularından salep elde edilmesi gibi nedenlerle insanlar tarafından doğadan bilinçsizce sökülmemektedir. Bu durum orkide türlerinin soylarının tükenmesine neden olmaktadır. Türkiye’de yalnızca endemik olan orkideler değil, aynı zamanda endemik olmayan orkideler de nesillerinin tükenme tehlikesi ile karşı karşıyadır. Ülkemizde yayılış gösteren 146 tür, 32 alttür, 10 varyete ve 170 takson orkide bulunup, bunlardan azımsanmayacak çoğunlukta orkide türü tehlike altında bulunmaktadır (Sezik 2007).

Çizelge 1.1. Türkiye’de Tehlike Altında Olan Endemik Orkideler (Sezik, 2007)

Türler	Kategori
<i>Cephalanthera kotschyana</i> Renz&Taub.	LR (lc)
<i>Dactylorhiza chuhensis</i> Renz&Taub.	LR (cd)
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i> H.Bauman & Künkele	LR (lc)
<i>Dactylorhiza osmanica</i> (KL.) Soó var <i>anatolica</i> (Nelson) Renz&Taub.	LR (nt)
<i>Dactylorhiza osmanica</i> (KL.) Soó var <i>osmanica</i> (Nelson) Renz&Taub.	LR (lc)
<i>Epipactis pontuca</i> Taub.	LR (lc)
<i>Ophrys bornmuelleri</i> M. Schulze ex Bornm.	LR (nt)
<i>Ophrys 3ycia3a</i> Fleischm & Bornm.	LR (lc)
<i>Orchis reinholdii</i> Supruner ex Flischm. Subsp. <i>leucotaenia</i> Renz&Taub.	VU
<i>Ophrys transhyrcana</i> Czernjak Subsp. <i>amanensis</i> Nel. Ex Renz&Taub.	LR (cd)
<i>Ophrys cilicica</i> Schlechter	LR (lc)
<i>Ophrys holoserica</i> (Burnm. Fil) Greuter subsp. <i>heterochila</i> Renz&Taub.	VU
<i>Ophrys isaura</i> Renz&Taub.	EN
<i>Ophrys lycia</i> Renz&Taub.	EN

EN: Tehlikede **VU:** Zarar Görebilir **LR:** Az Tehdit Altında **CD:** Koruma Önlemi **NT:** Tehdit Altına Girebilir **LC:** Düşük Riskli

Çizelge 1. 2. Endemik Olmayan Nadir Orkideler (Sezik, 2007)

Türler	Kategori
<i>Serapias parviflora</i> Parl.	EN
<i>Barlia robertiana</i> (Loise) Greuter	VU
<i>Listera cordata</i> (L.) R. Br	VU
<i>Oprys attica</i> (Boiss & Orph.) Soo	VU
<i>Oprys holoserica</i> (Burn. Fil.) Greuter subsp.candica (Nelson ex Soo) Renz & Taub.	VU
<i>Oprys omegaiifera</i> Fleischm	VU
<i>Orchis lactea</i> Poirer	VU
<i>Orchis quadripunctata</i> Cry. ex Ten	VU
<i>Orchis stevenii</i> Rchb.Fil	VU
<i>Dactylorhiza incarnata</i> (L.) Soo	VU
<i>Oprys oestriifera</i> Bieb. subsp. <i>heldreichii</i> (Schlechter) Soo	VU

EN: Tehlike Altında **VU:** Zarar Görebilir

Barlia robertiana (Loisel.) Greuter salep orkidesi, yukarıdaki tabloda da gösterildiği gibi, zarar görebilir (VU) orkide türü olarak bildirilmiştir. Endemik olmayan fakat nadir bulunan ve çok değerli bir tür olan *Barlia robertiana* salep orkidesinin koruma altına alınıp, neslinin devam etmesi büyük önem arz etmektedir.

Akdeniz bitkisi olan *Barlia robertiana* salep orkidesi çok geniş bir alana yayılmasına rağmen oldukça nadide bir tür olmakla birlikte, 20-60 cm boylanabilen, mor renkli, hoş kokulu ve yumru bir orkide türüdür (Altundağ vd. 2012). Senede, biri diğerine göre daha iri olan, iki adet yumru vermektedir. Yumrularından milli içeceğimiz olan salep elde edilmektedir. Tohumları oldukça küçük olan *Barlia robertiana*, tohumlarında endosperm bulundurmadığı için doğal olarak çimlenememektedir. Tohumların doğal olarak çimlenebilmesi için, mikorizal birliktelik şarttır. Endospermsiz orkide tohumlarında embriyo canlılığını kaybetmekte ve doğal ortamda bulunan tohumların % 5'ten azı çimlenebilmektedir. *Barlia robertiana* tohumlarının doğal ortamında çimlenebilmesi için mikorizal mantarlarla simbiyotik ilişki gerektirmesi, gelişiminin yavaş olması ve düşük çimlenme oranı gibi nedenlerle nesilleri tükenme tehlikesi altındadır. Bu nedenlere ek olarak, yumrularından salep elde edilmesi sebebiyle, gelir sağlamak amaçlı doğadan bilinçsizce sökülmeleri *Barlia robertiana*'nın soyunun devamlılığını ciddi tehlike altına almıştır (Sezik 1984).

Yumrularından salep elde edilen orkideler, ülkemizde tıbbi ve aromatik bitkilerin ticareti bakımından büyük bir önem arz etmektedir. Ne yazık ki, doğadan bilinçsizce sökülüp yumruları toplanan ya da yetiştikleri alanların aşırı tahribi gibi nedenlere bağlı olarak, salep orkidelerinin nesli tehlike altına girmiştir. Ülkemizde bir yılda üretilen salep miktarı tahmini olarak 45 ton olarak belirtilmekte ve üretilen 45 ton salebin 15 tonu ise ihraç edilmektedir. Buradan yola çıkarak bir kilogram salep üretmek için ihtiyaç duyulan yumru sayısı 1000-4000 civarında olmaktadır (Kreutz 2002). Ülkemizde yılda yaklaşık olarak 40 farklı orkide türünün yumrusunun toplandığı tahmin edilmektedir. Bu durum salep orkidelerinin nesillerinin devamlılığı bakımından büyük bir tehdit olup, gerekli önlemler alınmadığı takdirde bazı salep türlerinin nesilleri yok olma tehlikesi ile karşı

karşıya kalacağı bildirilmektedir (Tutar vd. 2011). Doğada tükenme tehlikesi altında olması nedeniyle 1974 yılında Tarım Bakanlığı tarafından yumru halinde salep ihracatı yasaklanmıştır. İşlenmiş şekliyle, salep unu olarak ihraç edilmesine izin verilmiştir (Sezik 1984; Keçeli 2003).

Ülkemiz The Convention on International Trade In Endangered Species of Wild Fauna and Flora adı verilen Fauna ve Flora Nesli Tehlike Altında Olan Türlerin Uluslararası Ticaretine ilişkin uluslararası bir anlaşma olan CITES sözleşmesine imza atmıştır ve bu anlaşmayla salep dış ticaretinin kontrol altında tutulması sağlanmıştır (Avcı 2005). CITES ‘Nesli Tehlike Altında Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme’ dir. Bu sözleşme ile yabani bitki ve hayvan türlerinin uluslararası ticareti kontrol altına alınması amaçlanmıştır. İçerisinde salepgillerden *Barlia robertiana* (loisel.) Grauter’in de bulunduğu 300.000’den fazla tür koruma altına alınmıştır. Ülkemiz CITES sözleşmesine 23.09.1996 tarihinde başvurmuş, 22.12.1996 tarihinde de CITES sözleşmesine imza atmıştır. Ülkemizde CITES sözleşmesi yürürlüğe girmeden önce orkideler doğadan sökülüp serbestçe yurt dışına satışı yapılabiliyorken, günümüzde bu sözleşme ile yumru olarak satışı yasaklanmıştır. Salep orkidelerinin türlerinin tehlike altında olmasından dolayı Türkiye’nin ilk orkide bilimcisi Prof. Dr. Ekrem SEZİK, ülkemizdeki bütün yumrulu orkidelerin, Dünya Koruma Birliği olan IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) risk kategorilerine göre EN (Tehlikede) kategorisine alınmasını önermiştir. Şehirleşme, aşırı otlatma, ıslah çalışmaları, ormanların tarım arazisine çevrilmesi, nüfus artışı, sanayinin çeşitlenmesi, herbisit kullanımı ve en birinci olarak salep orkidelerinin aşırı ve bilinçsizce sökülmesi gibi etkenler yumrulu orkidelerin yok olma sürecine etki etmişlerdir (Sezik 1984). Sıralanan bütün bu faktörler bir araya gelerek, nadide orkide türlerinin yok olma sürecini hızlandırmıştır. Yapılan anlaşmalar da kıymetli ve zor bulunan orkide türlerinin soylarının devamlılığını korumada yetersiz kalmaktadır.

Salep orkidelerinin doğal habitatlarında yetişmesinin artırılması ve uzun vadede çok kıymetli olan yumrulu orkidelerimizin doğal ortamlarında korunması gerekmektedir. Doğal ortamında çoğalması mikoriza funguslarına bağlı olduğu için bu duruma alternatif olarak *in vitro* çalışmalarla nesillerinin devamı sağlanabilmektedir.

Ünlü Kahramanmaraş dondurmasına esneklik, katılık ve lezzet vermesi için kullanılan, aynı zamanda ilaç hammaddesi olarak da kullanılan salebin elde edildiği bitkilerin kültüre alınması, yetiştiriciliğinin artırılması, kontrollü olarak çoğaltılıp koruma altına alınması en önemlisi bir an önce yok olmasının önüne geçilmesi acilen ele alınması gereken bir konudur.

Bu çalışmada nesli tükenme tehlikesi altında olan, ülkemizde nadir bulunan, yumrularından salep elde edilen, ticari değeri yüksek orkidelerimizden *Barlia robertiana* salep orkidesi kullanılmıştır. Tohumlarında endosperm bulundurmaması sebebiyle çimlenebilmesi için muhakkak mikoriza fungusları ile etkileşime geçmesi gerekmektedir. Çimlenme süresi oldukça uzun, çimlenme oranı ise oldukça düşüktür. Doğada çimlenebilmesi uzun zamanda gerçekleşmektedir. Doğadan aşırı ve bilinçsizce sökülmeleri nedeniyle nesli tükenme tehlikesi altında olup, CITES sözleşmesi ile koruma altına alınmıştır.

Bu çalışmada, *Barlia robertiana*'nın *in vitro* kültür ortamında mikorizal birlikteliğe gerek duymadan çimlendirilmesi ve koruma altına alınan türün neslinin devamlılığını sağlamak amaçlanmıştır. Ülkemizde *Barlia robertiana* salep orkidesinin *in vitro* çimlendirilmesi üzerine yapılmış ilk uygulama niteliğinde olan bu çalışma ileride salep orkidelerinde yapılacak *in vitro* çalışmalara da temel olabilecek potansiyele sahiptir.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *Barlia robertiana* (Loisel.) Greuter Salep Orkidesinin Genel Özellikleri

Orchidaceae familyasına ait olan *Barlia robertiana* salep orkidesi, dünya genelinde 8 tür ve 2 hibrit taksona sahiptir. Kendi içinde 3 grup oluşturmaktadır. Birinci grup, *Himantoglossum comperianum*; ikinci grup *Himantoglossum robertianum*; üçüncü grup ise *Himantoglossum hircinum*'dur. *Barlia robertiana* türü ise ikinci grup içerisinde yer almaktadır. Fas'tan Anadolu'ya, Atlantik sahillerinden İspanya'nın kuzeyine kadar yayılım gösteren tipik bir Akdeniz bitkisidir. İtalya, Portekiz, Fas, Korsika, Yunan Adaları, Fransa, Kıbrıs, Yugoslavya, Malta, Cezayir, Arnavutluk gibi ülkelerde geniş bir yayılıma sahip olduğu halde, oldukça nadir bir tür olarak bildirilmiştir. Tür ülkemizde kayıtlı olarak, en fazla Muğla ve Antalya illerimizde bulunmaktadır (Ernaz vd. 2012). *Barlia robertiana* ülkemizde Ayıkulağı, Patpatan, Patpatınak, Keşkek çiçeği, Sahlep, Salep çiçeği gibi isimlerle bilinmektedir (Sezik 1969). Makiliklerde, otlı taşlı yamaçların açıklıklarında, kalkerli tepelerde, çam ve meşe ağaçlık alanlarda yetişmekte olan *Barlia robertiana* türüne deniz seviyesinden 1700 metre yüksekliklere kadar rastlamak mümkündür (Delforge 2006). Kromozom sayısı $2n = 36$ olarak belirlenen *Barlia robertiana* salep orkidesi oldukça erken çiçeklenen bir türdür (Kamari vd. 2010). Çiçeklenme zamanı genellikle Ocak-Nisan arasındaki aylarda gerçekleşmekte olup, nadiren de olsa Aralık ve Mayıs aylarında da çiçeklenme görülmektedir (Renz ve Taubenheim 1984, Delforge 2006).

Barlia robertiana salep orkidesi bitkisinin boyunun, yapılan ölçümler sonucunda 20 ila 60 cm arasında değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Yaprakları kalın ve etli, dikdörtgenimsi ve mızraksı şekilde olup yaprak boyutu 25x8 cm'dir. Sipika ortalama 20 cm kadar ölçülmüştür. Çiçekleri hoş kokulu olup brakteler mızraksı şekillidir. Sepaller oval olup ortalama 10-15 mm boyutunda, hafif konkav yapılı, yeşilimsi veya kahverengimsi renklerde fakat iç yüzde mor beneklidir. Petaller sepallerden daha kısa boylu olup, soluk yeşil renge sahiptir. Labellum 15-22 mm boyutunda olup, beyazımsı kırmızı renklere sahip olduğu belirtilmiştir. Loplar yeşilimsi hafif mor renkli olup yan loplar 4-10 mm olarak ölçülmüştür. Yan loplar oraksı ve dalgalı bir yapıya sahipken orta loplar karemsi ve dikdörtgenimsi olarak belirtilmiştir (Renz ve Taubenheim 1984).

Barlia robertiana salep orkidesinin tohumları oldukça küçük yapılıdır. 'Toz tohum' olarak da adlandırılan türün tohumları endosperm içermediğinden doğada kendiliğinden çimlenememektedir. Çimlenebilmesi için mikorizal funguslarla simbiyotik birlikteliğe ihtiyaç duymasından dolayı, çimlenme yüzdesi oldukça düşüktür (Rao 1977). Her yıl kısıtlı yumru vermesi, doğadan bilinçsizce sökülmesi ve vejetatif yollarla çoğaltımlarının olmaması gibi sebepler *Barlia robertiana* salep orkidesinin çoğaltımının önünde bulunan en önemli engellerdir.

Barlia robertiana salep orkidesi türü, nesli tehlike altında olan orkide türlerinden biridir. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı adlı eserde *Barlia robertiana*'nın tehlike

kategori VU (Vulnerable = Zarar görebilir) olarak belirtilmiştir (Ekim vd. 2000). Bu ayrıntıya ek olarak *Barlia robertiana* salep orkidesinin Türkiye’de türün tehdit altında olma derecesi 2, (kuvvetli tehdit altında olma) ve ender olma derecesi de 2, (çok ender) olarak belirtilmiştir (Kreutz 2009).

2.2. Orkide Tohumlarının *In Vitro* Koşullarda Çimlendirme Çalışmaları

Bitki doku kültürleri geleneksel metotlarla çoğaltımı zor olan bitkilerin üretiminde sıkça başvurulan bir yöntemdir. Bitki doku kültürü, aseptik koşullarda yapay bir besin ortamında bütün bir hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki ya da bitkisel ürünlerin üretilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmaların bütünü olarak bildirilmiştir (Babaoğlu vd. 2001). Biyoteknolojik yöntemler bitkilerin daha kısa yoldan ve daha fazla sayıda üretilmesini sağlayan önemli bir araçtır. Bu yöntemlerden *in vitro* doku kültürü, bitkilerin kültüre alınması ve çoğaltılmasında en çok başvurulan yöntemdir. Bu yöntem nesli tükenmekte olan ya da yayılış alanı oldukça kısıtlı halde bulunan, çoğaltılması faydalı bulunan türlerin yüksek oranda çoğaltılıp üretiminin artırılmasına olanak sağlamaktadır.

1922 yılına kadar orkide çoğaltımında simbiyotik çimlenmenin teşvik edilmesi bilinen tek yöntem olarak kayıtlara geçmiştir. Uygulaması çok da kolay olmayan bu yöntem, Avusturalya’da; Avrupa’da (Smreciu ve Currah 1989) ve Kuzey Amerika’da (Zettler ve McInnis 1993; Zettler 1994) karasal orkidelerin çimlendirilmesinde kullanılmıştır. Simbiyotik çimlendirme yöntemi, bütün orkide türlerinde başarı göstermeyen, doğada kendiliğinden çimlenemeyen orkide tohumlarının çimlendirilmesinde etkili olmayan bir yöntem olarak bildirilmiştir (Watkinson 2002).

Knudson adlı araştırmacı, karasal orkidelerin yaşamlarını devam ettirebilmeleri için funguslarla ortak yaşam ihtiyacı içinde olmayabilecekleri düşüncesini ortaya atmış ve fungus olmadan da orkide tohumlarının mineral ve şeker içeren basit bir besin ortamında çimlenebildiğini göstermiştir. Knudson (1922), orkide bitkilerinin genç gelişme döneminden sonraki gelişme evrelerinde fungusun çok az bir öneme sahip olduğunu bildirmiştir. Bunun nedeni ise bitki çimlenip geliştikten sonra artık fotosentetik ototrof beslenme yeteneğine kavuşmasıyla açıklanmıştır (Withner 1974). Knudson’un bu yıllarda yapmış olduğu çalışmalar özellikle *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum* ve diğer pek çok orkidenin *in vitro* koşullarda asimbiyotik olarak çimlendirilebileceğini göstermiştir. Knudson’un elde ettiği başarılar akademi dünyasında büyük yankı uyandırmıştır (Pierik 1981). Yapılan çalışmalardan elde edilen ilk bulgulardan sonra, çeşitli orkide cins ve türlerinde en iyi çimlendirme imkânı sunan çok farklı besin ortamı içerikleri ortaya konmuştur (Arditti 1967, 1982, Fast 1980, Arditti ve Ernst 1982).

Orkide tohumlarının çimlenebilmesi için özellikle karanlık ortamların uygun olduğunu belirten Arditti (1967)’ye göre, bazı orkide türleri çimlenebilmek için ışıklanma ve fotoperiyodik koşullara ihtiyaç duymaktadır. Arditti, bazı türlerin ise karanlık ve ışıklı ortamlarda aynı düzeyde çimlenebildiğini göstermiş ve bu çalışmalarına ek olarak orkide tohumlarının çimlendirilmesiyle ilgili kronolojik bilgilendirmeler de yapmıştır. Bu bilgilendirmeler ışığında ilk kez orkide tohumlarının simbiyotik olarak mikorizal funguslarla laboratuvar koşullarında, 1899 yılında Noel Bernard tarafından

çimlendirildiği ifade edilmiştir. Bu çalışmalara ek olarak 1950 yılında Knudson isimli araştırmacı orkide tohumlarını Vanilla türünde basit bir mineral ve şeker karışımında asimbiyotik olarak çimlendirmeyi başarmış ve bu alanda yeni bir dönemin başlamasına öncülük etmiştir.

Öncelikli olarak tropikal orkideler olmak üzere daha pek çok sayıdaki orkide türünde büyüme düzenleyicilerinin, besin ortamlarının fiziksel özelliklerinin ve farklı besin ortamlarının orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine etkileri araştırılmıştır (Olivia ve Arditti 1984; Jong ve Sin 1985, Singh ve Prakash 1985)

Pierik (1987), orkidelerin *in vitro* çimlendirilmesinin avantajlarını birçok yazarın görüş ve düşünceleri ile birlikte kısaca şöyle açıklamıştır:

1. Orkide tohumları oldukça küçüktür ve endosperme sahip değildir ya da tohumlarda çok küçük bir besin birikimi mevcuttur. Bu tohumların çok küçük yapılı olması, *in vivo* ekimlerde çoğunun kaybolmasına neden olmakta veya tohumun sahip olduğu sınırlı besin maddesi nedeniyle tohum yaşamını devam ettirememektedir. *In vitro* koşullarda çimlenmenin çok daha başarılı olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.
2. Çimlenme sürecinde ve fide gelişme aşamalarında fungus ile beraber yürütülen simbiyotik birlikteliğin olumlu etkileri görülmüştür. Ancak, besin ortamı kullanılarak fungusa olan ihtiyaç ortadan kaldırılmıştır. Bu şekilde gerçekleştirilen çimlenmeye asimbiyotik çimlenme adı verilir.
3. *In vitro* koşullarda çimlendirme ile ıslah materyalinin çimlenme oranını ve bitki elde etme oranını arttırmak mümkündür.
4. *In vitro* koşullarda çimlendirme, olgunlaşmamış embriyoların besin ortamına ekilmesiyle de gerçekleşebilmektedir. Böylelikle ıslah döngüsü kısaltılıp, ıslah programlarında süre kazancı meydana gelmektedir.
5. *In vitro* koşullarda, tohum çimlenmesi ve elde edilen bitkiciğin büyümesi çok daha çabuk gerçekleşmektedir. Bunun nedeni koşulların tamamen kontrollü olmasıdır.

Harvais ve Hadley (1967), *Orchis purpurella* bitkisine ait tohumların çimlenme gelişimini inceleyerek, çimlenmenin sterilizasyon süresinin uzatılması ve yüksek sıcaklık uygulamasıyla doğru orantılı olduğunu belirtmiş ancak çimlenme oranının ışık ile engellendiğini de vurgulamışlardır. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen çimlendirme çalışmasında, saf su, agar ve farklı içeriklere sahip temel besi ortamları kullanılmıştır.

Orchis laxiflora Lam. ve *Ophrys sphegodes* Mill. bitkilerinin *in vitro* çimlenmeleri üzerine yapılan çalışmada, iki tür arasındaki vitamin ve azot kaynaklarının etkilerine bakılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda iki tür arasında farklılıklar görülmüştür. Amonyum nitrat içeren temel besi ortamı kullanılarak, içerisine organik azot, vitamin ve sakaroz eklenmiştir. Bu ortama ekilen iki türün tohumlarında da oldukça iyi gelişmeler meydana gelmiştir. Gerçekleştirilen çalışma sonucunda yüksek oranda tohum çimlenmesi ve bitki gelişimi gözlemlenmiştir. Fakat 8 ay sonra bitkiler canlılığını yitirmiştir. Her iki tür de en iyi gelişimlerini karanlık ortamda gerçekleştirmiştir (Mead ve Bulard 1975).

Van Waes ve Debergh (1986), 23 adet Batı Avrupa orkidesinde *in vitro* koşullarda tohum çimlendirmesi üzerine çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalar ışığında orkide tohumlarının çimlenme oranı üzerine etki eden faktörler araştırılmıştır. Araştırmacılar

öncelikle çimlenmede tohum kabuğunun engelleyici bir etkisinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sterilizasyonda kullanılan kalsiyum hipoklorit ve tween-80 karışımının uygulanma süresinin, çimlenme üzerinde etkisinin bulunduğunu belirtmektedirler. Sterilizasyon uygulamasının sert kabuklu türlerde daha uzun süre tutulması ile tohum kabuğu aşınmakta ve bu durum da çimlenmeyi olumlu yönde etkilemektedir. Temel besin ortamında, azot kaynağının varlığının ya da yokluğunun etkisi tamamen türlere bağlı olarak değişkenlik göstermekte olduğu bildirilmiştir. Besin ortamına kazein hidrolizat eklenmesi ile çimlenme olumlu yönde etkilenmiştir.

Farklı orkide türlerinde yapılan *in vitro* çimlendirme çalışmasında araştırmacılar çimlenmenin hormonlarla ilişkisini incelemişlerdir. Bu çalışmaya göre *Cypripedium calceolus* ve *Epipactis helleborine* türlerinde çimlenme için bir sitokinine ihtiyaç duyulmuştur. Ancak *Dactylorhiza maculata* ve *Listera ovata* tohumlarının çimlenmesi için hormon katkısına gerek olmamıştır. Kullanılan 23 tür arasında 21 tanesi, çimlenmeyi başarmıştır (Van Waes ve Debergh 1986).

Waes (1987), yaptığı çalışmasında aktif karbonun çimlenme üzerine etkisini araştırmış ve bu çalışma için 18 orkide türü kullanmıştır. Tüm türlerde %0.02-0.1 oranında aktif karbon kullanılmış ve bu durumun tohumların daha düşük oranda çimlenmesine ve daha yavaş gelişmesine neden olmuştur. Diğer yandan yüksek miktarda polifenol salgılayan türlerde (*Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza* spp., *Epipactis* spp., *Gymnadenia* spp. ve *Listera ovata*) besin ortamına aktif karbon ilave edilmesi, daha iyi bir gelişme sağlamıştır. Fakat gözle görülen bir polifenol salgısı olmayan türlerde (*Ophrys fuciflora*, *Orchis mascula* ile *O. morio* ve *Spiranthes spiralis*) herhangi olumlu bir etki ortaya çıkmamıştır.

Das ve Ghoshall'a (1989) göre birbirinden farklı türlere ait tropikal orkide tohumları *in vitro* da modifiye edilmiş Knudson C ve Burgeff Eg-1 ortamlarına ekilmiş ve çimlenmeler gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile en iyi çimlenme Burgeff Eg-1 ortamında elde edilmiş olup; besin ortamlarına eklenen 1 ppm NAA hormonu köklenmeyi olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir.

Barroso vd.'ne (1990) göre *Ophrys lutea* Cav. ve *Ophrys fusca* Link bitkilerinin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış tohumlarının Curtis ortamında çimlendirildiği bir çalışmada, tohum ekiminden 2 ay sonra protokormlar meydana gelmiş, daha sonra bu protokormlar bir orkide kültür ortamına transfer edilmiştir. Protokormlar transfer edildikten 2 ay sonra bitkiciklerin oluştuğu gözlemlenmiştir.

Rasmussen vd. (1990), asimbiyotik ve simbiyotik şartlarda *Dactylorhiza majalis* tohumlarının çimlenmesinin sıcaklığa bağlı etkilerini araştırmıştır. Yapılan çalışma sonunda simbiyotik çimlenme oranı asimbiyotik çimlenme oranından yüksek bulunmuştur. Simbiyotik koşullarda elde edilen fidelerin daha büyük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca simbiyotik şartlarda optimum 23-25 °C sıcaklığın üzerinde çimlenmede önemli derecede düşüş kaydedilmiştir. Buna ek olarak asimbiyotik şartlarda 23°C'de çimlenme oranı % 21 ile maksimum orana ulaştığı bildirilmiştir.

Rasmussen vd. (1991), *Listera ovata* türüne ait olgunlaşmamış embriyo ve tohumlarıyla simbiyotik ve asimbiyotik doku kültürü çimlendirme çalışması

yapmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda simbiyotik çalışmadaki embriyolardan tüm safhalarda protokorm elde edilirken, asimbiyotik kültürde sadece belirli safhalarda başarı elde edilmiştir. Çalışmanın sonunda ise zor çimlenen orkide türlerinin üretimi ve uygun fungus tespiti için olgunlaşmamış embriyoların inokulasyonu önerilmiştir.

Pedroso ve Pais (1992), *Orchis papilionaceae* türünden yavru yumru üretmek amacıyla olgunlaşmış ve olgunlaşmamış bitki tohumlarını süspansiyon kültürüne almışlardır. Yapılan çalışma sonucunda olgun tohumların çimlenmesi ve tohumlardan protokorm oluşumu katı ve sıvı ortamlarda düşük olarak gerçekleşmiştir. Olgunlaşmamış tohumların çimlenme oranı ise süspansiyon kültüründe artış göstermiştir. Yavru yumrular, süspansiyon kültüründe aydınlık koşullarda elde edilmiştir. Yavru yumrular karanlık koşullara alındığında ise hiçbir gelişmenin olmadığı gözlemlenmiştir. Çimlenme oranı süspansiyon kültüründe % 33 olarak belirlenmiştir. Oluşan protokormlardan da yavru yumrular elde edilmiştir. Katı ortamdan ise kallus elde edildiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, testadan ayrılmış embriyoların %100 çimlenme gösterdiği bildirilmiştir. Testanın çimlenmeyi değiştirdiği bütün kültür ortamlarında açıkça gözlemlenmiştir. Çalışmada çimlenmeler aynı dönemlerde gerçekleşmediği için, belirli bir homojenlik sağlanamamıştır.

Özdener (1994), farklı sodyum hipoklorit konsantrasyonlarının *Dactylorhiza iberica* tohumlarının çimlenmesine etkilerini araştırmıştır. Yapılan çalışma sonucunda en yüksek çimlenmeyi (%17.7) % 20 sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dakika süre ile uygulanmasıyla bulmuştur. *Dactylorhiza urvilliana* tohumlarında ise en yüksek çimlenme (%70.4) yine %20'lik sodyum hipoklorit konsantrasyonunun 10 dakika uygulanmasıyla elde edilmiştir. VanWaes & DeBergh (VWB) temel kültür ortamı asimbiyotik kültür ortamı olarak çimlenmede kullanılmıştır. Kullanılan bu ortama makro element, mikro element, vitamin, kompleks katkı maddesi (patates ekstraktı), aminoasit, şeker, ve inorganik azotun eklenmesi ya da çıkarılmasıyla oluşturulan değiştirilmiş VWD kültür ortamları kullanılmıştır. Gelişmelerinin daha iyi gözlemlenmesi için protokormlar oluştuktan sonra diğer ortamlara aktarılmıştır. İki orkide türüne ait köklerden fungus izole etmek için %20'lik sodyum hipoklorit ile dört dakika muamele edilmiştir. 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 bitki tohumu için en iyi çimlenmenin sağlandığı ayrı ayrı uygulamalarda yapılmıştır. Asimbiyotik çimlenmede seyreltik ve yoğunlaştırılmış ortamlar kullanılmıştır. Seyreltik kültür ortamına eklenen şekerin ise çimlenmeyi olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir. Fide gelişimi için yoğunlaştırılmış VWD kültür ortamı önemli bulunmuş olup ve bu ortamın modifiye edilmesiyle hazırlanan ortamda organik azotun ve şekerin gerekli olduğu bildirilmiştir.

Lauzer vd. (1994), *Cypripedium acaule* orkide türünün *in vitro* asimbiyotik koşullarda çimlendirilmesi amacıyla, *Cypripedium acaule* orkidesinin olgunlaşmış tohumlarını kullanmışlardır. Tohumların canlılığını belirleyebilmek için TTC (trifenil tetrazolium kloridin) ile boyama metodu kullanılmıştır. Ancak tohumların canlılık oranlarında homojenlik bulunamamıştır. Tohumlar canlı olmasına rağmen çimlenmenin düşük çıktığı çalışmada çimlenmeyi teşvik etmek amacıyla GA₃ uygulaması yapılmıştır. Ayrıca tohumlar suda bekletme ve soğuk uygulama gibi muamelelere de uğratılmıştır. Çimlendirmeyi teşvik etmeye yönelik yapılan bu uygulamalara rağmen çimlenme düzeyi

yine yetersiz kalmıştır. Bu çalışmaya göre en iyi uygulamanın NaOCl ve ultrason uygulamalarının olduğu bildirilmiştir.

Çağlayan vd. (1998), Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetişen bazı salep orkidelerinin embriyolarını *in vitro* koşullarda kültüre almışlardır. Bu çalışmada 14 farklı ortam kullanılmış ve en yüksek çimlenme ve bitki oluşumunun *Orchis coriophora*'ya ait olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek çimlenme oranı % 2.22 ve en yüksek bitki oluşum oranı % 1.11 olarak bulunmuştur. 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 edildiği belirtilmiştir. VWD ortamının yanında Knudson ortamı kullanılmıştır. Ayrıca bu ortamlara ek olarak % 10 oranlarında patates, domates ve salep yumrularından elde edilen ekstraktlar da kullanılmış olup kontrol uygulamaların dışında her ortamda 1 g/l oranında aktif kömürün kullanıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada embriyo kültüründe en iyi sonuç veren ilk iki bitki olan *Orchis coriophora* ve *Orchis anatolica*'nın yumru oluşturma potansiyellerine bakılmıştır. Aynı ortamlar kullanılarak, yine aynı ortamda *Orchis coriophora*'nın en yüksek ortalama ile % 2.45 yumru oluşturduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, çalışmanın sonunda *in vitro* da elde edilen *Orchis coriophora* bitkiciklerini torf ortamına diktikten sonra *in vitro* ile elde edilen bitkilerin % 20'sinin yaşadığını bildirmişlerdir.

Miyoshi ve Mii (1998), *Cypripedium macranthos* orkide türüyle yaptığı *in vitro* çimlendirme çalışmasında tohumların % 70'ine % 0.5'lik NaOCl ile 60 dakika ve % 3.2'lik $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ile 7 saat muamele etmiştir. Çimlenme gerçekleştikten 3 ay sonra farklı sıcaklık ve sitokinin uygulamaları yapılmıştır. Bu çalışmada soğuklama ve hormonun gelişme üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda hipokloritte bekletilip sitokinin uygulanarak 4 °C sıcaklıkta bekletilen denemelerden başarı elde edildiği bildirilmiştir.

Jorgensen (1998), *Dactylorhiza majalis* türünün *in vitro* koşullarda üretilip saksı bitkisi olarak kullanılmasıyla ilgili yaptığı çalışmada, *D. majalis* ve başka bitkilerden elde edilen fungal izolatların kullanılmasıyla simbiyotik yaşamın meydana geldiğini bildirmiştir. Simbiyotik ve asimbiyotik uygulamaları için, olgunlaşmış tohumlar sterilizasyon için 5 dakika süre ile % 1 Tween-80 + % 5 NaOCl ile muamele edilmiştir. Tohumlar 3 g/l toz yulaf içeren besi ortamı içine ekilmiştir. Tohumların ekimden 6 hafta sonra çimlendikleri belirtilmiştir. Araştırmacı, çalışma sonunda *D. majalis* türünden izole edilen 19 fungal izolatla yaptıkları çimlendirmede en fazla % 70 başarı elde ettiklerini ve 12 izolattan sağlıklı protokorm oluştuğunu bildirmiştir. Ayrıca *Goodyera repens* bitkisinden alınan izolatla % 80 oranında çimlenme sağladıklarını da bildirmiştir.

Önal (1999), Ege Bölgesi'nden toplanan 9 orkide türü kullanılarak gerçekleştirdiği embriyo kültüründe 3 tanesinden olumlu sonuç aldığını bildirmiştir. Çalışmasında VWD ve Knudson ortamlarını kullanmış ve bu ortamlara ek olarak % 10-20 patates ekstraktı, % 10-20 muz ekstraktı, % 10 hindistan cevizi sütü, 0.2 mg/l GA_3 , 1 mg/l BAP ilaveli 14 farklı ortam daha kullandığını belirtmiştir. Tohumların yüzey sterilizasyonunun ise 15-20 dakikada % 0.6'lık NaOCl'de yapıldığını bildirmiştir. Araştırmacı *Orchis sancta* orkide türünün tüm ortamlarda en erken bir ayda çimlendiğini belirtmiştir. Ortamlardan en iyi sonuç % 100 başarı ile Knudson + % 10 patates ekstraktından elde edilmiştir. Hormon uygulamalarının neredeyse tüm türlerde ve ortam

tiplerinde memnun eden bir sonuç vermediği bildirilmiştir. En yüksek protokormdan bitki oluşturan türün % 80 oranında *Orchis laxiflora* türü olduğu ve bu sonucun yine Knudson+ %10 patates ekstraktından elde edildiği bildirilmiştir. Yumru gelişimini takip etmek amacı ile ortama %10 patates ekstraktı eklenerek Knudson ortamındaki bitkilerin 3-4 cm sürgün büyüklüğüne ve yeterli kök gelişimine erişmesi beklenmiştir. Bu şekildeki bitkilerin yarısı normal gelişim ortamlarında (24°C ve 16 saat/gün ışık), diğer yarısı da 5°C sıcaklık ve sürekli karanlıkta bekletilmişlerdir. Her iki türe ait bitkilerin değişik sıcaklık altındaki yumru oluşturma potansiyelleri en fazla 24°C ve 16 saat/gün ışık uygulamasında başarı göstermiştir. *In vitro* da elde edilen *Orchis sancta* ve *Orchis laxiflora* türlerine ait 25 adet yumru, 7 cm çaplı saksılara konularak 1:1:1 oranında kum, bahçe toprağı ve organik gübreden oluşan harca dikilmiştir. Çalışma sonucunda *Orchis sancta*'da % 9.1, *Orchis laxiflora*'da % 12.9 oranında sürme tespit edilmiştir.

Sazak (2004) asimbiyotik ve simbiyotik koşullarda *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* ve *Spiranthes spiralis* türlerine ait tohumların çimlenmelerini ve gelişmelerini incelediği çalışmada tohumların yüzey sterilizasyonu için kullanılan çözeltinin konsantrasyonu ve uygulanma zamanının türlere göre farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Her iki türün çimlenmesinde fungal izolatlar kullanılmıştır. Asimbiyotik şartlarda elde edilen çimlenmelerde inorganik azot, *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* türünde azaltıcı olarak belirlenmiştir. *Spiranthes spiralis* türünde ise inorganik azot artırıcı etkiye sahip olmuştur.

Sinha vd. (2004) *Vanda teres* orkidesinin tohumlarını kullanarak yaptıkları çimlendirme çalışmasında VW (Vacin ve Went, 1949) besin ortamı kullanarak, bu besin ortamına 1 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, %2 sukroz, 2 g/l pepton ilave etmişlerdir. Tohumlar kültüre alındıktan 40-45 gün sonra çimlenme meydana geldiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada %10 hindistan cevizi suyu içeren besin ortamında da sürgün rejenerasyonu ile bu sürgünlerin gelişimi ve çoğaltımı sağlanmıştır. Ayrıca 2 g/l muz ekstraktı ve 100 mg/l kazein hidrolizat eklenmiş ½ MS besin ortamında eş uzunluklara sahip köklü sürgünlerin elde edildiği bildirilmiştir.

Wotavová-Novotná vd. (2007) *in vitro* koşullarda çimlendirdikleri *Dactylorhiza* türlerinin sürgün ve kök büyümesinin, şeker ve büyüme düzenleyiciler tarafından önemli ölçüde etkilendiğini vurgulamışlardır. Bu çalışmada çimlenmenin, glukoz ve sakkaroz ile uyarıldığı belirtilmiş, sürgün büyüklüğü ve sürgün uzunluğunun N₆-(2-isopentenil) adenine ve N₆-benziladenin ile IBA'nın kombinasyonu ile arttığı bildirilmiştir. Ayrıca kök büyüme ve kök uzunluğunun NAA ve IBA uygulaması ile arttığı da belirtilmektedir.

Wu vd. (2007), *in vitro* koşullarda çimlendirme denemesi yapmak üzere olgunlaşmamış *Phalaenopsis* tohumlarını kullanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda en başarılı besin ortamı 1/3 MS + 2 mg/l benziladenin + 0.2 mg/l NAA + 50g/l muz püresi + 20g/l şeker + 1g/l aktif kömür içeren ortam karışımı olduğu bildirilmiştir.

Andronova vd. (2007) *Dactylorhiza maculata* türüne ait popülasyondan elde ettikleri 12 adet bitkinin tohumlarında *in vitro* çimlendirme çalışması yapmışlardır. Bitkilerin gelişimleri aynı düzeyde gerçekleşmediği için, bitkilerde bir homojenlik gözlemlenmemiştir. 13 ve 18 aylık olan bitkiler laboratuvar koşullarından dış koşullara toprağı ve yine laboratuvar koşullarında yeniden kültüre alınmıştır. Dış koşullarda

bırakılan 13 aylık bitkiciklerin canlılık oranı %8, 18 aylık bitkiciklerde ise bu oran %30 olarak belirtilmiş olup, laboratuvarında tutulan bitkiciklerin çimlenmeden sonra canlılık oranları 13 aylık bitkiciklerde % 45, 18 aylık bitkiciklerde ise % 83 oranında olduğu araştırmacı tarafından belirtilmiştir.

Gümüş vd. (2008), çalışmalarında Batı Karadeniz Bölgesi'nden toplanan ve salep elde edilen 6 tür orkidinin tohumlarını kullanmışlardır. Tohumlar % 10'luk NaOCl + 1-2 damla Tween-20 + 10 dakika sterilize edildikten sonra MS, ½ MS, VWD ve Knudson C ortamlarında kültüre alınmıştır. Çalışma sonucunda en yüksek çimlenme oranının % 17.43 ile *Dactylorhiza neschalkiorum* bitkisinden elde edildiği bildirilmiştir. Besin ortamları kıyaslandığında ise en yüksek çimlenmenin % 7.34 ile VWD ortamından; türlere göre besin ortamının etkisi incelendiğinde en yüksek çimlenmenin *D. neschalkiorum* türünden % 24.41 ile VWD ortamından elde edildiği belirtilmiştir. Protokorm oluşumunun ise sadece 3 türde meydana geldiği soncuna ulaşılmış ve en yüksek protokorm oluşumunun % 13.11 ile *D. neschalkiorum*'dan elde edildiği bildirilmiştir.

Yararbaş (2008), yaptığı çalışmada salep orkideleri tohumunun *in vitro* da çimlenmesi için 1/10 MS ortamına % 20'lik şeker ilave ettiğini belirtmiştir. Salep orkide tohumlarının zor çimlenmesinden dolayı şeker muamelesine ek olarak ultrason uygulaması da yapıldığını vurgulamıştır. Araştırmacı çalışmada 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 edilmiştir. Çimlenme oluşumundan 2 ay sonra ilk yaprakların oluşmaya başladığı belirtilmiştir.

Valletta vd. (2008), *in vitro* koşullarda yaptıkları çimlendirme çalışmasında *Orchis mascula* türünden elde edilen tohumları kullanmışlardır. Bu çalışmada farklı besin ortamları ve sterilizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Böylece tohum kabuğu geçirgenliğinin ve çimlendirme yeteneğinin belirlenmesini amaçlamışlardır. Kullanılan 6 farklı besin ortamı arasından, en çok çimlenmenin sağlandığı ortam Orchimax ticari ortam bileşimi olarak bildirilmiştir. Tohum kabuğunun kırılması için değişik uygulamaların yapıldığı bu çalışmada H₂SO₄ (sülfürik asit) kimyasalı farklı doz ve sürelerde uygulanarak tohumun su alıp şişmesi sağlanmış ayrıca tohumların 2 ay süreyle 4-8°C sıcaklık ile muamele edilmesi çimlenmeyi olumlu yönde etkilemiştir. Tohumların sürekli karanlık koşullarda bırakılmasının ise çimlenmeyi engellediği bildirilmiş, 16/8 saat aydınlık/karanlık uygulamasının tohumlarda 1 ay içinde şişmeye neden olduğu, 3 ay içinde rhizoid (köksü yapı) oluşumunun gerçekleştiği, 4-5 ay içinde sürgün ucunun belirmeye başladığı ve 5-6 ay içinde ise ilk yaprak oluşumunun gerçekleştiği bildirilmiştir.

Gümüş (2009), çalışmasında Batı Karadeniz'de yetişen ve salep elde edilen 16 adet orkide türünde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda asimbiyotik üretim yapmıştır. Besi ortamı olarak ½ MS, MS, VWD, KC ve KC-N ortamları kullanmış ve bu ortamlara GA₃ hormonunun 0, 0.1, 0.5 ppm dozları ilave edilmesiyle hazırlanmış ortamlar kullanılmıştır. Çimlenme üzerinde farklı ışık uygulamaları denenmiştir. Tüm orkide türlerinde çimlenme ve protokorm elde edildiği bildirilirken, fide gelişiminin yalnızca 8 türde görüldüğü ifade edilmiştir. Bitkiye dönüşüm oranı en yüksek KC besin ortamında yetişen *Orchis morio*

türünde % 89.88 olarak bulunmuştur. Dış koşullara alıştırmada bir başarı sağlanamamıştır. Bitkiler dış koşullara en fazla bir ay dayanabilmiş, sonrasında canlılıklarını kaybetmişlerdir. Bu çalışmaya ilaveten denenen *in situ* çalışmasında da bölünmüş ve bölünmemiş ana yumruların doğaya aktarılması sonucu bitkilerde çıkış gözlenmemiştir.

Roy vd. (2011), yaptıkları çalışmalarında *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. tohumlarını *in vitro* çimlendirmişlerdir. Kullandıkları MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamına NAA (5,36 µM), BAP (3,8 µM) ve Phytamax ilavesiyle protokorm rejenerasyonu gerçekleştirmiş ve aktif kömür (3 g/l) ilavesiyle de sürgün rejenerasyonu elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Islam vd. (2011) *Vanda roxburgii* tohumları ile yaptığı çimlendirme denemelerinde 200 mg/l patates ekstraktı içeren besin ortamında %78,24 oranında tohum çimlenmesi gerçekleştiğini bildirmiş, 100 mg/l patates ekstraktı içeren besin ortamında ise eş boyut ve özelliklere sahip köklü sürgünlerin elde edildiğini belirtmiştir.

Palaz vd. (2011) yaptıkları çalışmada doğal ortamından toplanan *Orchis sancta*, *Orchis coriophora*, *Dactylorhiza romana*, *Dactylorhiza iberica* ve *Ophrys apifera* türlerine ait tohumlar kullanılmıştır. Çalışmalarında orkide tohumlarını *in vitro* çimlendirmeyi amaçlamışlardır. Besin ortamı olarak Knudson C kullanılmış ve çimlendirmeyi teşvik etmek amacıyla bu ortama 1 mg/l GA₃ ilave edilmiştir. Tohumlar ilk iki hafta karanlık ortamda 24 °C sıcaklıkta tutulmuş daha sonra 16 saatlik fotoperiyotta 24 °C sıcaklıkta iklimlendirme kabini içinde kültüre alınmıştır. *Orchis sancta*, *Orchis coriophora*, *Dactylorhiza romana*, *Dactylorhiza iberica* türlerinde çimlenme gözlemlenirken *Ophrys apifera* türünde çimlenme olmadığı bildirilmiştir. *Orchis sancta* tohumlarında çimlenme yaklaşık 2 hafta içerisinde gerçekleşirken, *Dactylorhiza romana* türünde bu süre 14 hafta olarak bildirilmiştir. Tohumların çimlenme yüzdeleri birbirleri ile kıyaslandığında en yüksek çimlenme yüzdesi (%30) *Orchis sancta* tohumlarına ait olduğu belirtilmiştir.

Bektaş (2016), Orchidaceae familyasına ait *Dactylorhiza urvillanana*'nin doku kültürü yöntemleriyle çoğaltılmasını amaçladığı çalışmasında başlangıç materyali olarak türe ait olgunlaşmış tohumları kullanmıştır. Sterilizasyonları ve canlılık testleri yapılan tohumların farklı besi ortamlarındaki çimlenme, protokorm ve kallus oluşum oranları tespit edilmiştir. Tohumlar çimlendikten sonra oluşan protokormlar, zeatin'in farklı seviyeleri ile desteklenen Orchimax aktif kömürlü besi ortamında (OAM) organogenesize teşvik edilerek sürgün uzama miktarları ve ortalama kök sayıları belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında, çimlenme, protokorm oluşumu ve kallus oluşumunda en iyi sonucu Orchimax aktif kömürlü besi ortamının verdiği bildirilmiştir. Bu ortamdaki çimlenme oranı %62,39, protokorm oluşum oranı %73,18 ve kallus oluşum oranı %8,6 olarak belirlenmiştir. Farklı zeatin oranlarının sürgün uzaması ve kök sayısı üzerine etkilerine bakıldığında, 1,0 mg/L' nin diğerlerinden daha olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiş ve bu ortamdan elde edilen ortalama sürgün boyu ve kök sayısı değerleri sırasıyla 36,05 mm ve 3,4 adet olarak belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

Araştırma 2016-2018 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Laboratuvarları ile Bahçe Bitkileri Bölümüne ait laboratuvarlarda yürütülmüştür. Araştırmamızın ilk aşaması olan tohum sterilizasyonu işlemlerimiz ise Kuzey Agripark şirketinde yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak *Barlia robertiana* (Loisel) Greuter salep orkidesinin kapsülleri içerisinde yer alan tohumları kullanılmış ve bu kapsüller de Antalya'nın Kepez ilçesinde bulunan 36° 55' 36.7140" ve 30° 39' 12.4416 koordinatlı lokasyondan toplanmıştır (Şekil 3.1). *In vitro* çalışmada kullanılacak kapsüller, embriyoların genç dönemde bulunduğu, kapsüllerin koyu yeşil renge sahip oldukları dönemde toplanmıştır (Şekil 3.1.). Çalışmada bölgede kendiliğinden var olan *Barlia robertiana*'dan elde edilen kapsüller toplandıktan sonra önce kurutulmuş, ardından buzdolabında muhafaza edilmiş ve sonra kapsül içerisinde yer alan tohumlar *in vitro* yapay besin ortamında kültüre alınmıştır.



Şekil 3.1. Doğal alanda kapsül oluşturmuş *Barlia robertiana* (Loisel) Greuter bitkisi

Çalışmada bitkisel materyal olarak belirtilen lokasyonda doğal olarak yetişen *Barlia robertiana* orkidesi üzerinden toplanan kapsüller kullanılmıştır. Bitki teşhisi Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. R. Süleyman Göktürk tarafından yapılmıştır. Bitki ortalama 25 cm uzunluğunda olup, tohumları içeren kapsüller koyu yeşil renkli ve bitki gövdesine sık bir şekilde dizilmiştir.



Şekil 3.2. Toplanıp depo edilen *Barlia robertiana* (Loisel) Greuter kapsülleri

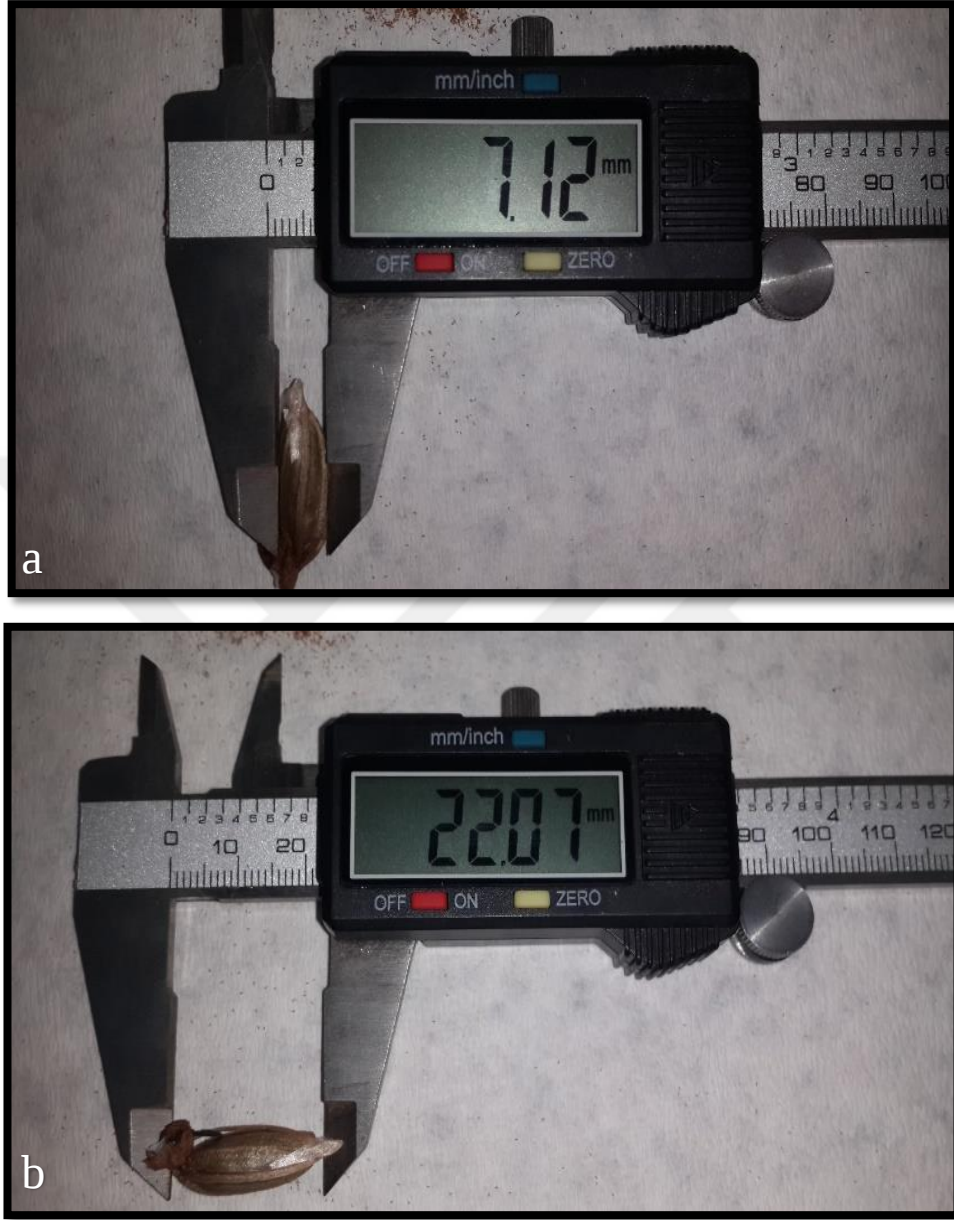
Barlia robertiana açık alanda, zeytin ağaçlarının arasında, orta derecede taşlı ve humusça zengin toprakta doğal olarak varlığını sürdürmektedir. 27.04.2016 tarihinde toplanan kapsüller steril laboratuvar ortamında kurutma kağıtları üzerinde 12 gün boyunca kurutulmuştur (Şekil 3.2.).

Kurutma kâğıtları üzerinde iyice kurutulan kapsüller 09.05.2016 tarihinde buzdolabında (4 °C) tutularak 5 ay süreyle tohumlarda dormansinin giderilmesi amaçlanmıştır. *Barlia robertiana*'nın tohumları kapsüller içerisinde bulunmaktadır. Tohumları çok küçük boyutlarda olup, renkleri ise kahverengidir. Toz tohum olarak adlandırılan *Barlia robertiana* tohumları, her kapsül içerisinde ortalama bir milyon ile bir buçuk milyon arasında değişiklik gösteren adette tohum bulundurmaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Barlia robertiana* tohumları **a)** Kapsül yapısı; **b)** Kapsül içindeki tohumlar

Çalışmada kullanılan kapsüllerin ortalama boyu: 22,07 mm, eni: 7,12 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *Barlia robertiana* kapsüllerinin boyutları **a)** kapsül eni; **b)** kapsül boyu

Kapsüllerin ağırlıkları tartılarak 1000 adet kapsül ağırlığı 63 gram olarak bulunmuştur.

3.1.2. Besin ortamlarının bileşimi

Yapılan araştırmalar sonucu *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirilmesi ile ilgili daha önceden yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle besin ortamı hazırlanmasında, yakın akraba türlerin *in vitro* çimlendirilmesinde kullanılan ve en iyi sonuçları veren ortamlar seçilmiştir. Seçilen ortamlar, daha önceki yıllarda yürütmüş

olduğumuz salep orkidesi *in vitro* çimlendirme çalışmalarından elde ettiğimiz bulgulara göre en yüksek çimlenme oranını veren ortamlar olmuştur. Yapılan literatür çalışmalarında salep orkidelerinde en iyi çimlenme ortamını Knudson C ve Van Waes Debergh ortamları sağlamış olmasına rağmen, yaptığımız önceki denemelerde bu ortamlar ile başarısız sonuçlar elde ettiğimiz için *Barlia robertiana* salep orkide tohumlarının *in vitro* çimlendirme çalışmasına bu iki ortamı dahil etmemiş bulunmaktayız.

Farklı türlerdeki orkidelerin *in vitro* çimlendirilmesi çalışmalarında çoğunlukla Murashige & Skoog (MS) temel besi ortamı tercih edilmiş ve en başarılı sonuçlar MS temel besin ortamından elde edilmiştir. Bu araştırmaların ışığında, çalışmada farklı konsantrasyonlarda MS temel besi ortamı ve üzerine ilave olarak farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyiciler denenmiştir. Ayrıca MS temel besi ortamı dışında Orchimax aktif kömürlü besi ortamı (OAM) da kullanılmıştır. Her bir ortama tampon madde olarak, pH değerini sabitlemek amacıyla 1 gram Morfolin Etan Sülfonik Asit (MES) eklenmiştir. Bu çalışmada toplamda 6 farklı ortam kullanılarak, *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirilmesi amaçlanmıştır.



Şekil 3.5. Temel besi ortamlarının hazırlanması



Şekil 3.6. *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirilmesinde kullanılan ortamlar

Çizelge 3.1. *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirilmesinde kullanılan ortamlar

ORTAMLAR	KULLANILAN BESİ ORTAMLARI
1	MS + 2 mg/l Kinetin + 1 g MES
2	MS + 1 mg/l Kinetin + 1 g MES
3	Orchimax + Aktif kömür + 30 g Sukroz
4	$\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA + 1 g MES
5	$\frac{1}{2}$ MS + 4 mg/l Kinetin + 0,5 NAA + 1 g MES
6	$\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/l NAA + 1 g MES

3.1.2.1. MS temel besin ortamının içeriği

Barlia robertia'nın *in vitro* çimlendirilme çalışmasında her bir ortamdan 1 litre hazırlanmıştır. 4,4 gram MS, 30 gram sukroz ve 7 gram agar ile MS temel besin ortamı hazırlanarak ortamların tamamının pH'ı 5,7 olarak ayarlanmıştır. Sterilizasyon işlemi ise 121 °C sıcaklıkta 1,2 atmosfer basınca sahip otoklavda 20 dakika sürede gerçekleştirilmiştir.



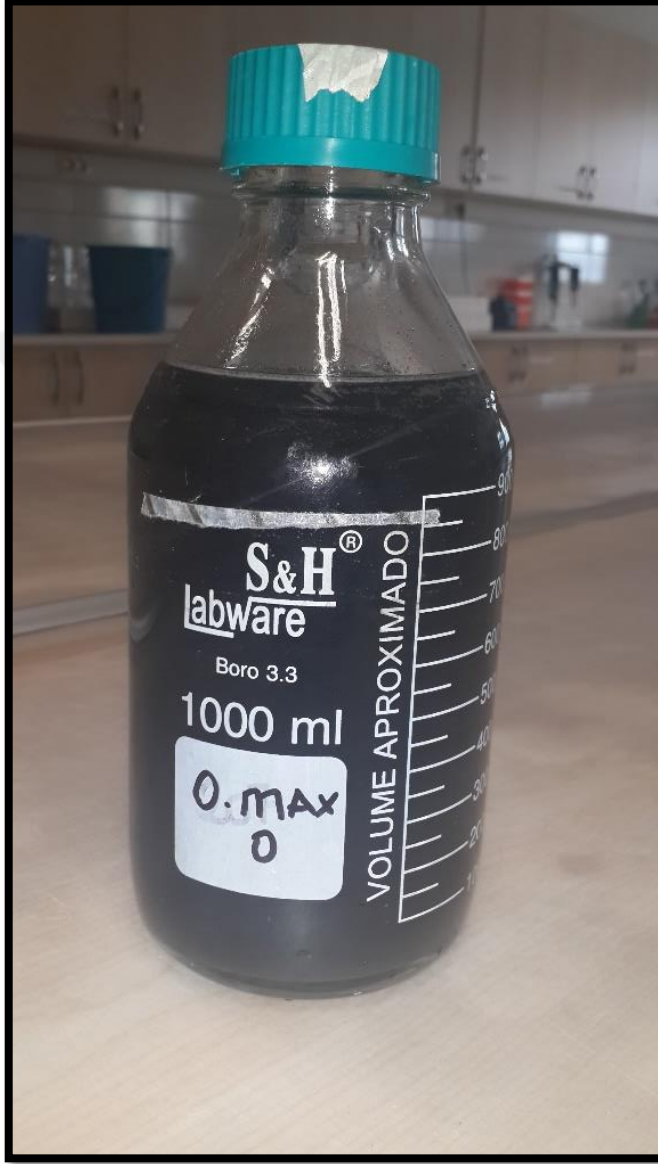
Şekil 3.7. MS temel besi ortamının hazırlanışı

Çizelge 3.2 MS temel besi ortamının içeriği

Mikro Elementler	mg/l	µM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.11
KI	0.83	5.00
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
MnSO ₄ .4H ₂ O	16.90	100.00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	29.91
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	1.03
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
Makro Elementler	mg/l	µM
CaCl ₂	332.02	2.99
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
KNO ₃	1900.00	18.79
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61

3.1.2.2. Orchimax temel besin ortamının içeriği

Araştırmalar sonucunda elde edilen bilgilere göre orkidelerin çimlenerek en yüksek oranda protokorm oluşturduğu ortamlardan biri de Orchimax besin ortamı olmuştur.



Şekil 3.8. OAM (Orchimax aktif kömürlü besin ortamı)

Kullanılan besin ortamlarına pH tamponlamak için 1 gram MES ilave edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyici olarak ortamlara farklı konsantrasyonlarda Benzil aminopurin (BAP), Kinetin ve Naftalin asetik asit (NAA) eklenmiştir. Çalışmada distile su cihazı, otoklav, etüv, ışık mikroskobu, steril kabin, buzdolabı, iklimlendirme kabini, pens, bistüri, beher, pH metre, shaker, petri kapları, kurutma kağıdı kullanılarak uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. OAM (Orchimax aktif kömürlü besin ortamı) İçeriği

Mikro Elementler	mg/l	µM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0125	0.05
KI	0.415	2.5
H ₃ BO ₃	3.10	50.16
MnSO ₄ .H ₂ O	8.45	50.00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	5.30	18.42
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.125	0.52
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0125	0.05
FeNaEDTA	36.70	100.00
Makro Elementler	mg/l	µM
CaCl ₂	166.00	1.50
KH ₂ PO ₄	85.00	0.62
KNO ₃	950.00	9.40
MgSO ₄	90.35	0.75
NH ₄ NO ₃	825.00	10.31
Vitaminler	mg/l	µM
myo-Inositol	100.00	554.94
Nicotinic acid	1.00	8.12
Pyridoxin HCL	1.00	4.86
Thiamine HCL	10.00	29.65
Tampon	mg/l	µM
MES	1000.00	4.69
Organik Maddeler	g/l	µM
Sükroz	30.00	58.43
Tryptone	2.0	
Aktif Kömür	2.0	

3.2. Metot

3.2.1. Genel sterilizasyon işlemleri

Yürütülen *in vitro* çimlendirme çalışmasında kullanılan tüm ortam ve malzemeler aseptik koşullar altında hazırlanmıştır. Steril laboratuvar koşullarında hazırlanan ortamlar petri kaplarına dökülmeden önce 121 °C otoklavda 20 dakika boyunca muamele edilmiştir. Daha sonra hazırlanan ortamlar steril kabinde petri kaplarına dökülerek, tohumların ekimi için hazırlanmıştır (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Temel besi ortamlarının petri kaplarına aktarılması



Şekil 3.10. Steril kabinde petrilere dökülen besin ortamları

Çalışmada kullanılan tüm malzemeler otoklava girmeden önce, bulaşık deterjanı, sodyum hipoklorit ve saf su ile yıkanmıştır. Pens, bistüri ve kurutma kağıtları alüminyum folyo kağıtlarına sarılarak 121°C sıcaklıkta 1,2 atmosfer basınçta çalışan otoklavda 60 dakika süresince steril edilmiştir. Laminar akışlı steril kabinde gerçekleştirdiğimiz çalışmada, her çalışmaya başlamadan önce kabinin içi % 70'lik etil alkolle dezenfekte edilmiştir. Ardından 30 dakika boyunca ultraviyole ışığı çalıştırılmıştır. Çalışma esnasında kullanılan pens ve bistüri sterilizasyon amacıyla cam boncuklu sterilizatör cihazında birkaç dakika bekletilerek temizlenmiştir. Çalışma süresince de steril kabinin içi sürekli alkolle dezenfekte edilmiş, bulaşık beherler, pens ve bistüri gibi diğer bulaşık malzemeler 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 yeniden steril edilmiştir.

3.2.2. Tohumların yüzey sterilizasyonu

Barlia robertiana'nın tohumları çok küçük yapılı olduğu için tohum sterilizasyonu büyük bir önem taşımaktadır. Çalışmanın geleceği açısından en önemli kısım olan tohum sterilizasyonu işlemi çalışma yürütülürken üç kez tekrarlanmış ve son sterilizasyon işleminde beklenen başarı yakalanmıştır. İlk sterilizasyon işlemi 18.10.2016 tarihinde yapılmıştır. Tohumlar kurutma kâğıtlarına yerleştirilip % 70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dakika muamele edilmiştir. Ardından üçer kez steril saf su ile durulanmıştır. Durulama işleminden sonra tohumlar içerisinde 2 damla Tween-20 içeren % 20'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dakika muamele edilmiş ardından saf su ile üçer defa yeniden durulanmıştır. Fakat on gün içerisinde tüm ortamlarda kontaminasyon gözlemlenmiş ve deneme tekrar kurulmuştur.



Şekil 3.11. 1. sterilizasyon denemesi *Barlia robertiana* tohumlarının yüzey sterilizasyonu

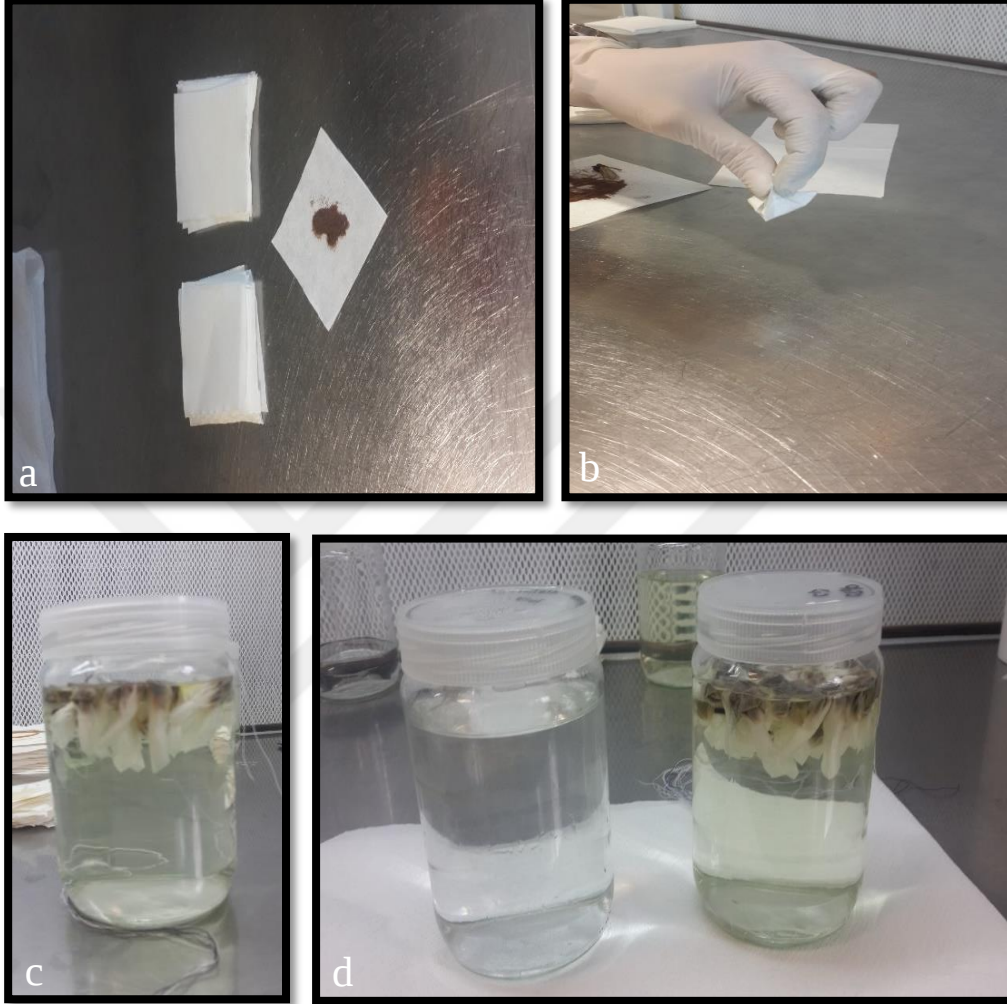
İkinci sterilazyon işlemi 02.11.2016 tarihinde yeniden yapılmıştır. Bu kez sodyum hipoklorit oranı %20'den %30'a çıkarılmış ve tohumlara daha uzun süreli çift sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Kurutma kağıtlarına alınan tohumlar %70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dakika muamele edildikten sonra, üç kez saf su ile durulanmıştır. Durulanan tohumlar %30'luk sodyum hipoklorit + 2 damla Tween-20 çözeltisinde önce 20 dakika tutulup ardından üç kez saf su ile durulanmış, hemen sonra %30'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde ikinci kez uygulamaya tabi tutulup bu sefer 15 dakika muamele edilmiş, üç kez durulama işleminin ardından sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Durulandıktan sonra kapsüller kurumaya bırakılmış ardından ortamlara ekimi yapılmıştır. Birinci denemeye göre sterilizasyon için uygulanan süre, konsantrasyon miktarı artırılmış ve çift yapılan sterilizasyon işlemine rağmen, iki hafta süre içerisinde petrilerin tamamında yeniden kontaminasyon gözlemlenmiş ve deneme tekrar kurulmuştur.



Şekil 3.12. 2. sterilizasyon denemesi *Barlia robertiana* tohumlarının yüzey sterilizasyonu
a) % 30'luk sodyum hipoklorit + Tween-20 uygulaması; **b)** Steril edilen kapsüllerin kurutulması

Sterilizasyon işleminde tohumlar ikiye ayrılarak, her bir gruba sodyum hipokloritin iki farklı derişimi uygulanmıştır. Tohumların yarısı % 25'lik sodyum hipoklorit ile muamele edilirken, kalan yarısı ise % 50'lik sodyum hipoklorit konsatrasyon oranına tabi tutulmuştur. Her iki oranda çift sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Sterilizasyon işlemine geçmeden önce otoklavlanmış steril kurutma kağıtları 3x3 cm'lik çaplarda kesilerek, içlerine 1'er gramlık tohumlar yerleştirilmiş ve kurutma kağıtlarının ağızları bohça şeklinde kapatılmıştır. Tohumlar bohça şeklinde kapatıldıktan sonra ağız kısımları iplerle bağlanmış, ardından iplerle bağlanan tohumların tamamı ilk önce % 70'lik etil alkol çözeltisinde 1 dakika bekletilip, üçer kez, 3-2-1 dakikalık sürelerle durulanmıştır. Daha sonra tohumların yarısı %25'lik sodyum hipoklorit + Tween-20 çözeltisinde 30 dakika muamele edilmiş 3-2-1'er dakikalık sürelerle durulandıktan sonra siterilizasyon işlemi tekrarlanarak %25'lik sodyum hipoklorit + Tween-20 çözeltisinde tohumlar yeniden 30 dakika süre ile muamele edilmiştir. Tohumların kalan diğer yarısı ise % 50'lik sodyum hipoklorit + Tween-20 çözeltisinde önce 20 dakika muamele edilmiş, saf su ile 3-2-1'er dakikalık sürelerle

durulandıktan sonra ikinci sterilizasyon işlemine geçilmiştir. İkinci sterilizasyon işleminde ise tohumlar % 50'lik hipoklorit + Tween-20 çözeltisinde 10 dakika bekletilerek saf su ile 3-2-1'er dakika süre ile 3'er kez durulanarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.11.).



Şekil 3.13. *Barlia robertiana* tohumlarının yüzey sterilizasyonu **a)** 3x3cm çapındaki kurutma kâğıdına 1 gram tohum eklenmesi; **b)** Kurutma kâğıtlarının bohça şeklinde kapatılması; **c)** Tohumların etil alkol ile sterilizasyonu; **d)** Tohumların sodyum hipoklorit + Tween-20 ile sterilizasyonu

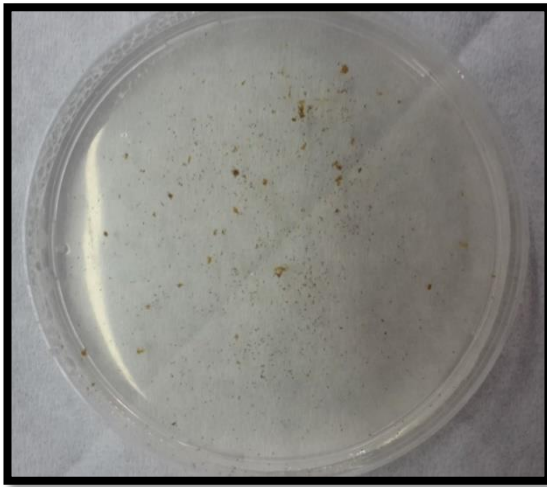
Sterilizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra, tohumlar iplerinden tutulup hiçbir yerle temas etmeden, çalışır durumda bırakılan steril kabin içerisinde bir gece boyunca asılarak kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.14). Sterilizasyon işlemi tamamlanan tohumlar petrilere ekilip kültüre alınmıştır.



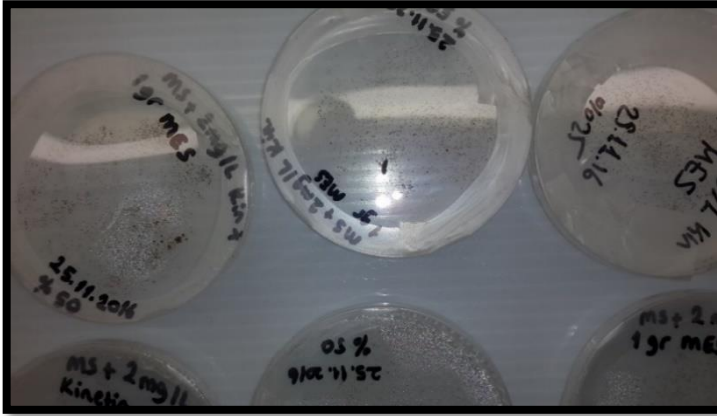
Şekil 3.14. *Barlia robertiana*'nın steril edilen tohumlarının kurutulması

3.2.3.Tohumların kültüre alınması

Barlia robertiana'nın *in vitro* çimlendirme çalışmasında farklı konsantrasyonlarda büyüme düzenleyici içeren 6 farklı besin ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.1.). Tohumların sterilizasyonu işleminde ise %50 ve %25 olmak üzere iki farklı sodyum hipoklorit +Tween-20 konsantrasyonu kullanılmıştır. Sterilizasyon işlemi tamamlanıp tohumlar kurutulduktan sonra, steril kabinde aseptik koşullarda 9 cm çapındaki petrilere tohum ekme işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.15.). Öncelikle kurutma kâğıtlarına bağlı halde bulunan tohumların ipleri kesilmiş, pens yardımıyla, her bir petri kabına 300 adet tohum ekilmiş, petriler çift kat parafilmle sarılarak kültüre alma işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.16.)



Şekil 3.15. Tohumların petrilere ekimi



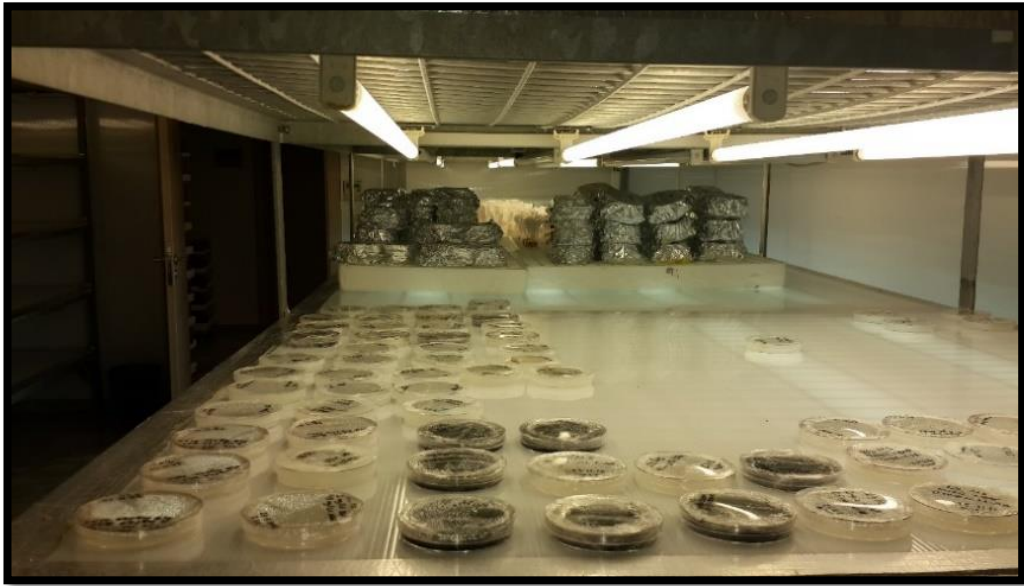
Şekil 3.16. Farklı ortamlarda ve uygulamalarda ekimi yapılan tohumlar

3.2.4.Yapılan ön uygulamalar

Petrilere ekilen tohumlar, 4 farklı ön uygulamaya tabi tutulmuştur:

- 1.Uygulama: Tohumlar tamamen aydınlık ortamda tutulmuştur.
- 2.Uygulama: Tohumlar bir ay süre ile karanlık ortamda tutulmuştur.
- 3.Uygulama: Tohumlar iki ay süre ile karanlık ortamda tutulmuştur.
- 4.Uygulama: Tohumlar üç ay süre ile karanlık ortamda tutulmuştur.

Karanlık uygulama gerektiren petriler, alüminyum folyo ile sarılarak iklimlendirme odasında tutulmuştur. Süre tamamlandıkça alüminyum folyolar açılarak, petriler aydınlık ortama alınmıştır. Petriler, 25⁰ C sıcaklıkta, 4000 lüks ışık şiddetinde ve 16 / 8 fotoperiyot koşullarında tutularak, önce çimlenmeleri ardından protokorm oluşturmaları beklenmiştir.



Şekil 3.17. İklimlendirme odasında kültüre alınan *Barlia robertiana* tohumları

Çalışmada, her bir uygulama 7 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş, toplamda 336 adet petri ile çalışma tamamlanmıştır.

Toplamda altı farklı kültür ortamına (çizelge 3.1.) % 25'lik ve % 50'lik sodyum hipoklorit çözeltisi + Tween-20 ile steril edilmiş tohumlar ekilmiştir. Ekimi yapılan tohumlar ise tamamen aydınlık, bir ay karanlık, iki ay karanlık ve üç ay karanlık ortamda tutulmak üzere 4 farklı uygulamaya tabi tutulmuştur ve her uygulama yedi tekerrür olarak yapılmıştır. Toplamda 336 adet petri bulunmaktadır. Her petriye 300 adet tohum ekimi yapılmış ve tohumların çimlenip protokorm oluşturmaları beklenmiştir.



4. BULGULAR

Barlia robertiana'nın *in vitro* çimlendirme çalışması sonuçları yapılan uygulamalara göre değişiklik göstermektedir. Yapılan araştırmalarda *Barlia robertiana* tohumlarının *in vitro* kültür ortamında çimlendirilmesiyle ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple söz konusu çalışma *Barlia robertiana* tohumlarının *in vitro* çimlendirilmesi ile ilgili yapılan ilk çalışmadır.

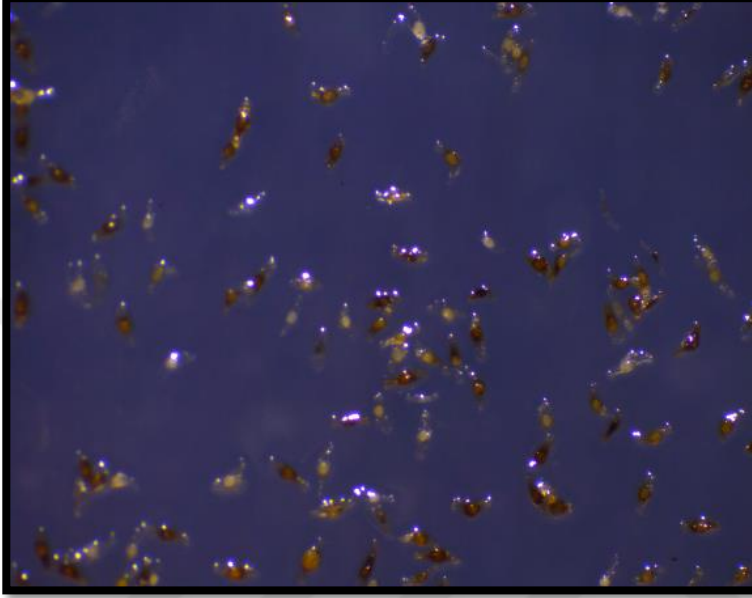
Çalışmada başarılı sonuç veren sterilizasyon işleminde tohumlar ikiye ayrılmış, her bir gruba %25 ve %50 olmak üzere iki farklı sodyum hipoklorit derişimi çift sterilizasyon olarak uygulanmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre, kontaminasyona uğrayan petriler çoğunlukla % 25 oranında hipoklorit asit çözeltisi ile dezenfekte edilen tohumlara ait olduğu sonucuna ulaşılmış ve 12 adet petride kontaminasyon gözlemlenmiştir. Toplamda kontaminasyona uğrayan petri sayısı 18 olarak belirlenmiştir. % 50'lik ticari çamaşır suyu ile dezenfekte edilen tohumlardan ise yalnızca 6 adet petride kontaminasyon yaşanmıştır. Yapılan sterilizasyon işleminde her iki derişimde de başarı elde edilmiş ancak % 50 oranında sodyum hipoklorit ile steril edilen tohumlarda daha az miktarda kontaminasyon gözlemlenmiştir. Geliştirdiğimiz bu yöntem ile sterilizasyonu çok zor olan salep orkidelerinden *Barlia robertiana* tohumlarının steril edilmesinde başarı elde edilmiştir.

Tohumlarında endosperm bulundurmeyen *Barlia robertiana* tohumlarının doğada kendi kendine çimlenmesi oldukça güçtür. Bu çalışmada altı farklı besin ortamı ve farklı oranlardaki büyüme düzenleyicilerin bileşimi ile oluşturulmuş kültür ortamları kullanılarak tohumların embriyolarının şişerek çimlenmesi ve çimlenen *Barlia robertiana* tohumlarından protokorm oluşması ve daha sonra oluşan protokormlardan bitki elde edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgulara göre tohumların çimlenme gelişimlerinin ve protokorm oluşturma oranlarının, ortamdaki farklılık gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

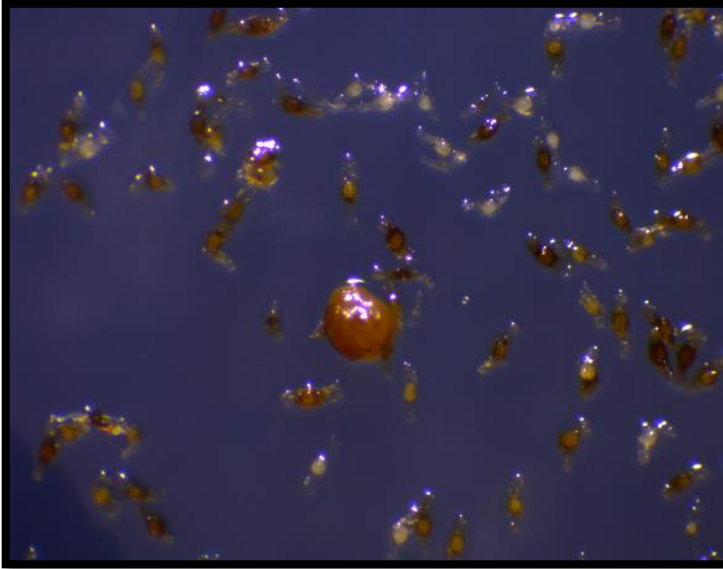
Hazırlanan kültürler, iklimlendirme kabinine alınmış ve tohumların önce çimlenmeleri ardından da çimlenen tohumlardan protokorm oluşturmaları beklenmiştir. Tohumlar kültüre alındıktan sonra çimlenme gelişimleri takip edilmiştir. Bu süreç oldukça yavaş işlemiş, ilk dört ay tohumlarda çimlenme belirtisi gözlemlenmemiştir. Tohumlar kültüre alındıktan sonra düzenli olarak ışık mikroskopunda çimlenme durumları kontrol edilmiş, ilk çimlenme tohumlar kültüre alındıktan 124 gün sonra gerçekleşmiştir. Bu tarihte embriyoların yavaşça şişmeye başladığı gözlemlenmiştir. Bu süreçten sonra iki ay süre boyunca ortamların hepsi farklı oranlarda çimlenme göstermiştir. Tohumların çimlenme oranlarını bulmak için çimlenmeye başladıkları ilk tarihten itibaren iki hafta süre ile çimlenen tohum sayımı yapılmıştır. Bu tarihlerde, kurulan denemenin tamamında çimlenme gözlemlenmiş ve atmış gün boyunca tohumlar çimlenmeye devam etmiştir.

Oluşan ilk protokorm ise tohumlar kültüre alındıktan tam 186 gün sonra gerçekleşmiş, çimlenen tohumlardan oluşan protokormlar aseptik koşullarda steril kabin içerisinde hormonsuz MS ortamına aktarılmıştır. Bir aylık sürelerle elde edilen protokormlar taze MS0 ortamına alınarak, protokormların da genç bitkiciğe dönüşmesi amaçlanmıştır.

Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde, tohumların çimlendiği, embriyolarının şişmesinden anlaşılmıştır. Tohumların çimlenme süreci oldukça yavaş ilerlemiştir. Çimlenen tohumların sayısı, bulundukları ortama ve uğradıkları muamelelere göre farklılık göstermiştir. İlk çimlenme gösteren ortam $\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA ortamında 3 ay karanlık muamele ile % 25'lik sodyum hipoklorit + Tween-20 uygulamasından elde edilmiştir.



Şekil 4.1. *Barlia robertiana*'nın 33 günlük çimlenen tohumlarının mikroskop altındaki görüntüsü



Şekil 4.2. İlk çimlenme gösteren ortam 28 günlük ($\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA)

Tohumlar çimlendikten sonra, protokorm oluşturma sürecine girmişlerdir. İlk tohum çimlendikten 66 gün sonra ilk protokorm oluşmuştur. İlk protokorm oluştuktan sonra, çimlenmiş tohumların protokorm oluşturma oranlarını hesaplamak için iki hafta aralıklarla ışık mikroskopunda protokormların gelişimi takip edilmiştir. Protokorm gelişimi oldukça yavaş ilerlemiş ve altı ay sonra durmuştur. Oluşan ilk protokorm $\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA ortamından elde edilmiş, % 25 sodyum hipoklorit çözeltisinde muamele edilmiş ve 3 ay karanlık ortamda uygulamaya tabi tutulmuştur. Protokorm oluşturma süresi ise tohumların ilk kültüre alındığı tarihten itibaren 186 gün olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. İlk protokorm (14 günlük) oluşumu ($\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA- %25 sodyum hipoklorit-3 ay karanlık)

Yapılan çalışmada 6 farklı besin ortamı kullanılmış ve bu ortamlarda sterilizasyon derişimi (% 25 sodyum hipoklorit -% 50 sodyum hipoklorit) ve fotoperiyot olmak üzere toplamda 8 uygulamaya (%25- aydınlık, % 50- aydınlık, %25- 1 ay karanlık, % 50- 1 ay karanlık, %25- 2 ay karanlık, % 50- 2 ay karanlık, %25-3 ay karanlık, % 50- 3 ay karanlık) tabi tutulmuşlardır. Her bir uygulama 7 tekerrürlü olarak 7 adet petriden oluşmaktadır. Her bir petriye 300 adet tohum ekimi yapılmıştır. Kültüre alma işlemi gerçekleştikten sonra, uygulanan muamelelere göre, en iyi çimlenme yüzdesini ve protokorm oluşturma oranlarını veren besin ortamı, sodyum hipoklorit derişimi ve fotoperiyot belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *In vitro* koşullarda *Barlia robertiana*'nın çimlenen tohum sayısı

BESİN ORTAMLARI		MS + 0.5 NAA	$\frac{1}{2}$ MS + 2mg/l BAP + 0.5 NAA	$\frac{1}{2}$ MS + 4 mg/l Kin + 0.5 NAA	MS + 2 mg/l Kin.	MS + 1 mg/l Kin.	Orchimax + Aktif karbon	ORT	Toplam
Işıklandırma Rejimi	NaClO Derişimi								
AYDINLIK ORTAM	%25	176±4,76	102±14,24	198±11,49	98±18,65	86±15,49	114±24,89	129	774
	%50	170±21,04	93±9,70	190±17,37	76±12,30	84±6,45	109±11,93	120	722
1 AY KARANLIK ORTAM	%25	201±11,72	108±11,10	224±15,72	135±18,81	97±16,24	124±9,03	148	889
	%50	197±15,59	91±8,82	220±27,12	142±14,01	99±11,85	108±8,20	142	857
2 AY KARANLIK ORTAM	%25	188±16	112±9,09	246±19,30	127±9,26	101±14,53	148±27,11	154	922
	%50	180±4	98±12,68	240±31,28	114±15,58	99±16,18	142±8,70	145	873
3 AY KARANLIK ORTAM	%25	224±16,61	128±9,64	266±9,68	133±10,88	105±13,69	164±15,01	170	1020
	%50	212±	117±7,06	254±5,10	126±9,40	103±8,72	151±8,72	160	963
TOPLAM		1548	849	1838	951	774	1060		
ORT		193	106	229	118	96	132		

Yukarıdaki çizelgede, yapılan her uygulamadan elde edilen çimlenmiş *Barlia* tohum sayılarının istatistiki analiz sonuçları verilmiştir. Uygulama olarak, çizelgede de belirtildiği üzere 6 farklı besi otamı, 4 farklı fotoperiyot ve 2 farklı NaClO derişimi kullanılarak her uygulama için çimlenen tohum sayıları bulunmuştur. Çizelge 4.2.'de ise uygulamaların tek tek ve birbirleriyle interaksyonları bulunarak varyans analiz tablosu verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Barlia robertiana in vitro* çimlendirme çalışması varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	SD	KT	KO	F
Tekerrür	6	3738,625	623,104	1,839
Aydınlık Karanlık Uyg. (A)	3	66875,699	22291,900	65,782**
Hata ₍₁₎	18	6099,780	338,877	
Sterilizasyon (B)	1	4792,741	4792,741	18,951**
AxB	3	72,914	24,305	0,096
Hata ₍₂₎	24	6069,595	252,900	
Ortam (C)	5	766075,634	153215,127	716,070**
(AxC)	15	26265,783	1751,052	8,184**
(BxC)	5	1823,420	364,684	1,704
(AxBxC)	15	2277,997	151,866	0,710
Hata ₍₃₎	240	51352,000	213,967	
Genel	335	935444,188		

* $\alpha=0.05$, ** $\alpha=0.01$ yanılma düzeylerinde istatistiki olarak önemli.

Çizelge 4.2 'de *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirme çalışması varyans analiz çizelgesi verilmiştir. Söz konusu çizelge incelendiğinde, Aydınlik-Karanlık Uygulama ve Sterilizasyon interaksyonu %5'lik seviyede istatistiki açıdan *Barlia robertiana*'nın çimlenmesine etki etmediği görülmüştür. Aydınlik-karanlık uygulama, besin ortamları, sterilizasyon, aydınlık-karanlık uygulama ve besin ortamları interaksyonu, %5'lik seviyede istatistiki açıdan *Barlia robertiana*'nın çimlenmesinde etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3. *Barlia robertiana* tohumlarının *in vitro* uygulamalarından oluşan protokorm sayısı

Besin Ortamları	AYDINLIK		1 AY KARANLIK		2 AY KARANLIK		3 AY KARANLIK	
	%25 NaClO	%50 NaClO	%25 NaClO	%50 NaClO	%25 NaClO	%50 NaClO	%25 NaClO	%50 NaClO
Orchimax + Aktif karbon	-	-	-	-	-	2	5	9
MS + 1 mg/l Kin.	-	-	1	-	-	-	-	2
MS + 2 mg/l Kin.	5	1	-	-	-	-	1	-
½ MS + 4 mg/l Kin + 0.5 NAA	-	19	1	-	5	16	17	13
½ MS + 2mg/l BAP + 0.5 NAA	-	2	-	-	1	-	6	2
½ MS + 0.5 NAA	6	7	1	3	15	9	11	-

4.1. Besin Ortamına Göre Tohum Çimlenme ve Protokorm Oluşturma Yüzdesi

Çalışmada 6 farklı besin ortamı kullanılmış ve bu ortamlardan elde edilen çimlenen tohum sayısı ile protokorm oluşturma yüzdeleri hesaplanmıştır. Her bir petriye ortalama 300 adet tohum ekimi yapıldığı göz önünde bulundurularak ve her uygulamadan yedi tekerrür ile gerçekleştirilen çalışmada, ortamlara göre çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdeleri hesaplanmıştır. Her bir petride 300 adet tohum olduğundan, tohumların çimlenme yüzdeleri 300 adet tohum üzerinden hesaplanmıştır. Protokorm oluşturma yüzdesi ise çimlenen tohum sayısı üzerinden hesaplanmıştır.

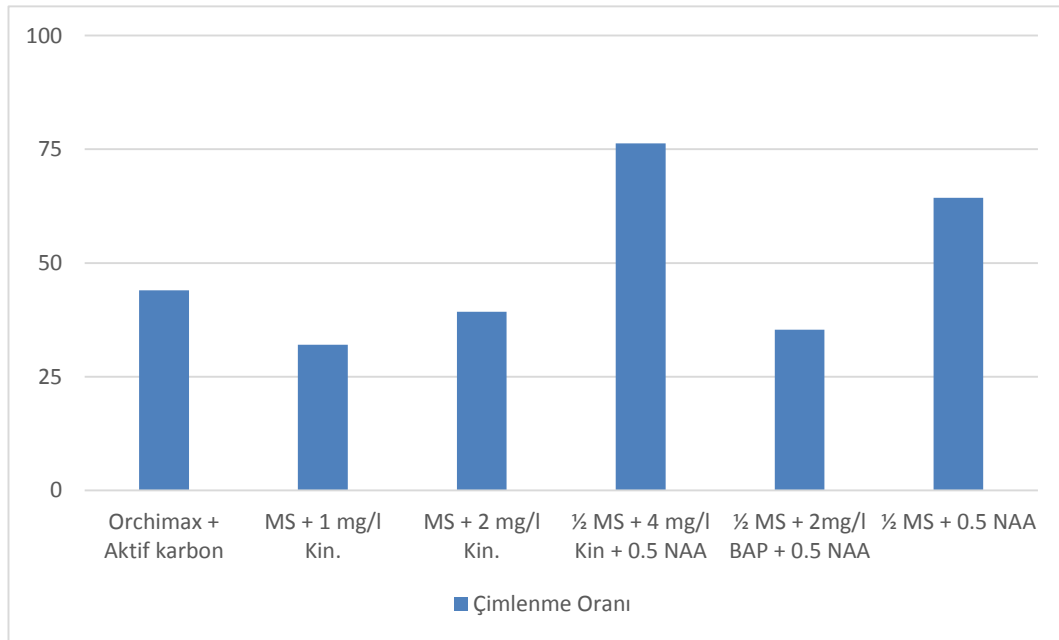
Çizelge 4.4. Besin ortamlarına göre çimlenen tohum sayısı ve çimlenme yüzdesi

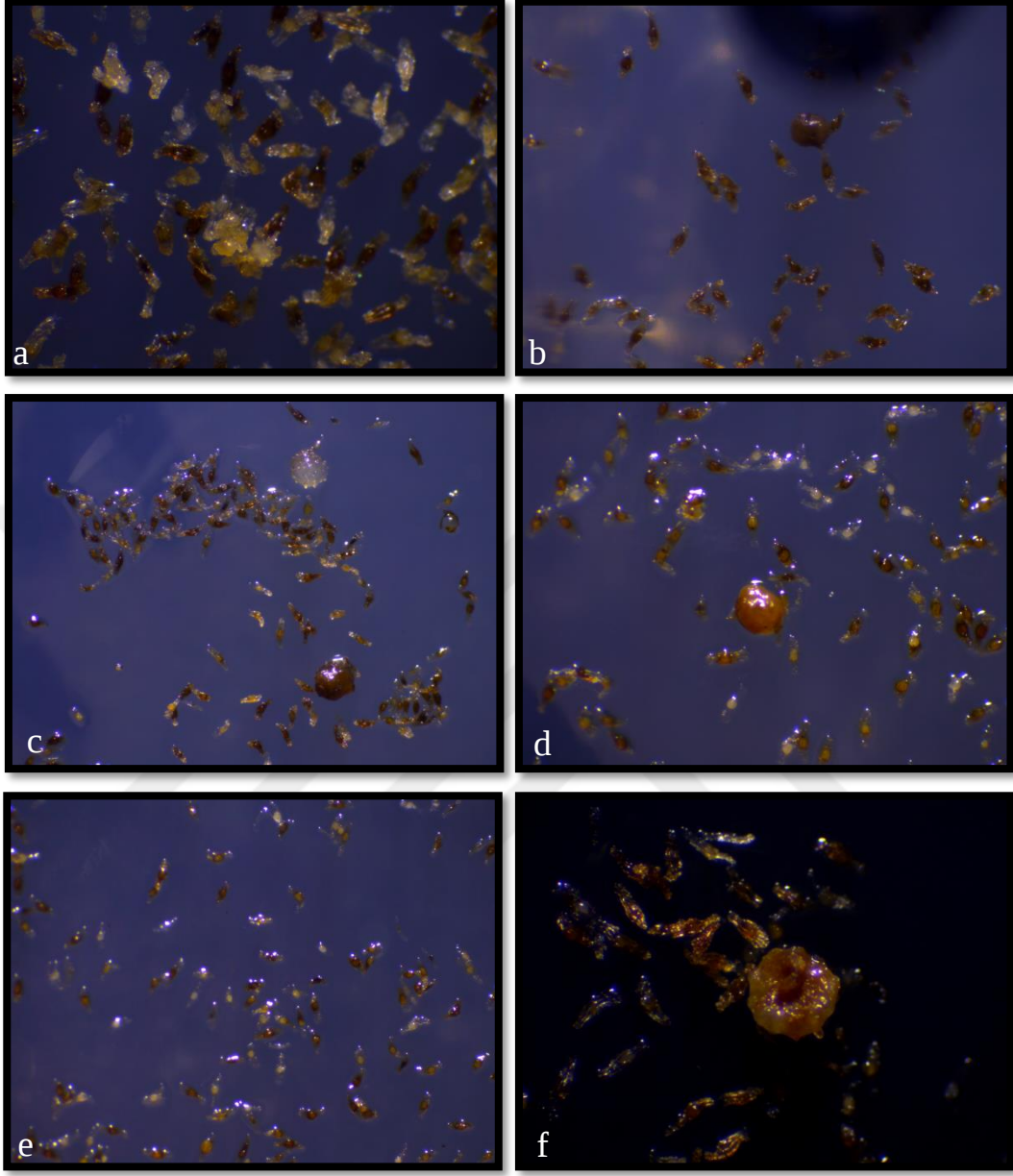
BESİN ORTAMI	ÇİMLENEN TOHUM SAYISI (ADET)	ÇİMLENME %'si
Orchimax + Aktif karbon	132,50 c	44
MS + 1 mg/l Kin.	96,75 e	32
MS + 2 mg/l Kin.	118,87 d	39,3
½ MS + 4 mg/l Kin + 0.5 NAA	229,22 a	76,3
½ MS + 2mg/l BAP + 0.5 NAA	106,00 d	35,3
½ MS + 0.5 NAA	193,86 b	64,3

HKO= 482,09 $\alpha = 0.5$

Çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre, *Barlia robertiana* deneme kurulduktan dört ay sonra (124 gün), ilk kez embriyoları şişerek çimlenmeye başlamış ve ilk çimlenme gösteren ortam ½ MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA (%25 NaClO - 3 ay karanlık) besi ortamı olmuştur. İlerleyen zamanlarda diğer besin ortamlarında da embriyolar şişmeye başlayarak tohum çimlenmesi gözlemlenmiştir. En iyi çimlenme oranı % 76,3 oran ile ½ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA besi ortamından elde edilirken, en düşük çimlenme oranı ise % 32 oranı ile MS + 1 mg/l Kinetin besi ortamından elde edilmiştir.

Yapılan istatistiki analizler sonucunda tohum çimlenmesi bakımından en iyi ortam ½ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA ortamı olarak bulunmuştur.

**Şekil 4.4.** *Barlia robertiana* 'nın ortamlara göre çimlenme performansları



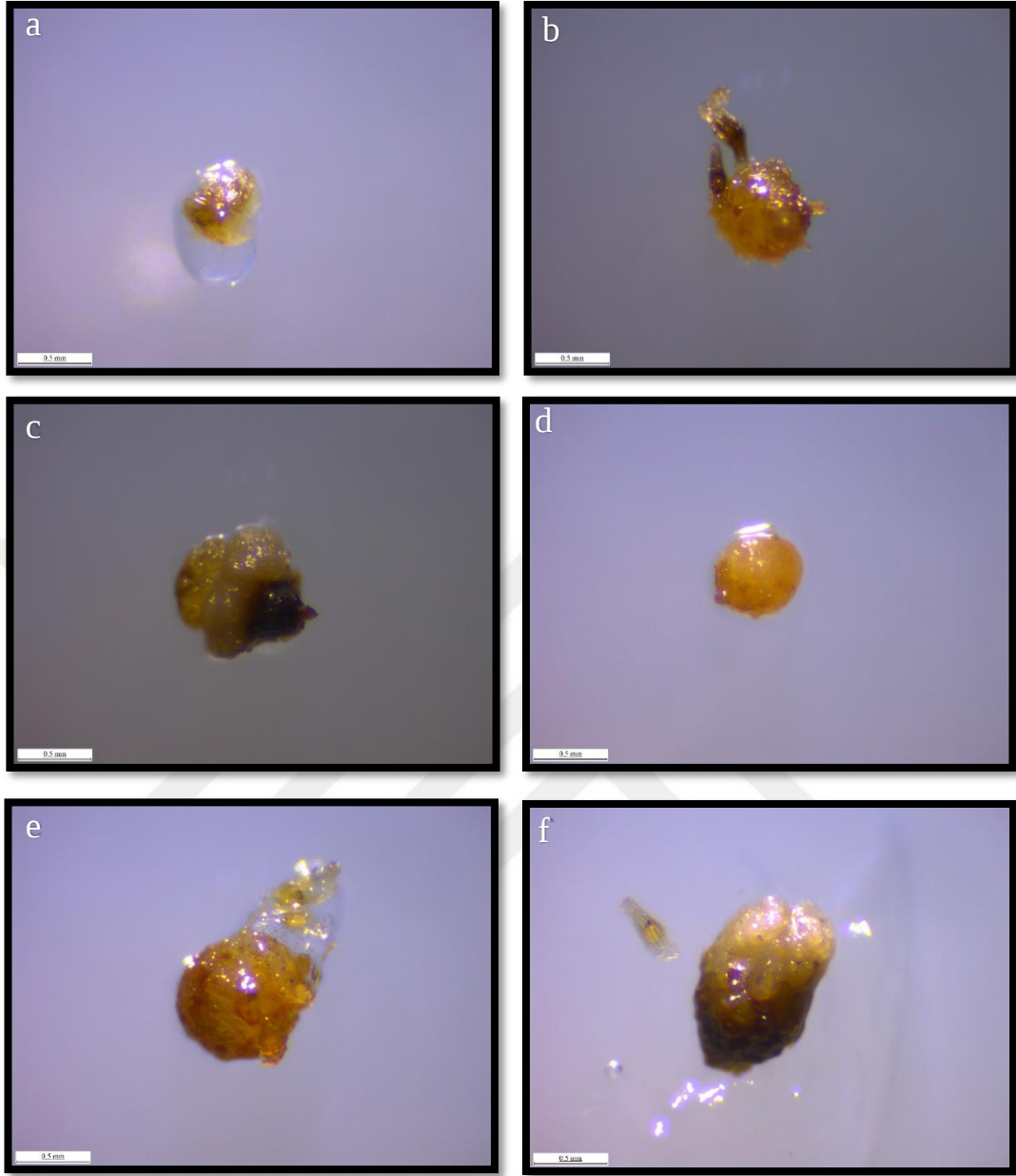
Şekil 4.5. *Barlia robertiana*'nın farklı ortamlarda çimlenen tohumları **a)** MS + 2 Mg/L Kin. (%25 NaCIO - 2 ay karanlık) ortamında çimlenen tohumlar (22 günlük) **b)** MS + 1 mg/l Kin. (Aydınlık-%50) ortamda tohum çimlenmesi (16 günlük) **c)** 1/2 MS + 2mg/l BAP + 0.5 NAA (%50-Aydınlık) çimlenen tohumlar (14 günlük) **d)** 1/2 MS + 4 mg/l Kin + 0.5 NAA (%25- 3 Ay karanlık) ortamında çimlenen tohumlar (33 günlük) **e)** 1/2 MS + 0,5 NAA (% 25- 3 ay karanlık) ortamında çimlenen tohumlar (28 günlük) **f)** Orchimax + Aktif karbon (%25- 1 ay karanlık) ortamında tohum çimlenmesi (17 günlük)

Çizelge 4.5. Ortamlara göre protokorm sayısı ve protokorm oluşturma %'si

ORTAM	Protokorm Sayısı	Protokorm %'si
Orchimax + Aktif karbon	16	12.12
MS + 1 mg/l Kin.	3	3.125
MS + 2 mg/l Kin.	7	5.93
½ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 NAA	76	33.18
½ MS + 2mg/l BAP + 0,5 NAA	11	10.37
½ MS + 0,5 NAA	52	26.94

Yürütülen çalışmaya göre, *Barlia robertiana* tohumları çimlenmeden 66 gün sonra ilk protokormu ½ MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA besin ortamından elde edilmiştir. En iyi protokorm oluşturma oranı % 33,18 olarak ½ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA ortamından elde edilmiştir. En düşük oranda protokorm oluşturan ortam ise % 3,125 oranı ile MS + 1 mg/l Kin olarak bulunmuştur.

Çalışmada altı farklı besin ortamı kullanılmış ve bu ortamlarda meydana gelen çimlenme yüzdeleri ve çimlenen *Barlia robertiana* tohumlarından meydana gelen protokorm sayıları ile protokorm oluşturma oranları hesaplanmıştır. En iyi protokorm oluşturan ilk besin ortamı ½ MS + 4 mg/l Kinetin + 0,5 mg/l NAA ortamı olurken, en iyi ikinci besin ortamı ise ½ MS + 0,5 mg/l NAA besin ortamı olmuştur. Orchimax + Aktif karbon besin ortamı 16 adet protokorm sayısı ile üçüncü sırada yer alırken, MS ve Kinetin hormonunun kombinasyonları ile hazırlanan besin ortamlarından en az sayıda protokorm oluşumu gerçekleşmiştir. Hazırlanan altı farklı ortam arasından 3 adet protokorm oluşturma sayısı ile MS + 1 mg/l Kinetin hormonu ile oluşturulan besin ortamı en az sayıda protokorm oluşturan besin ortamı olmuştur.



Şekil 4.6. Çimlenen *Barlia robertiana* tohumlarının oluşturduğu protokormlar **a)** Orchimax + Aktif karbon (% 50-3 ay karanlık) uygulamasından elde edilen protokorm (14 günlük) **b)** ½ MS + 0.5 NAA (% 25- 2 ay karanlık) uygulamasından elde edilen protokorm (14 günlük) **c)** ½ MS + 2 mg/l BAP + 0.5 NAA (% 25- 3 ay karanlık) uygulamasından elde edilen protokorm (28 günlük) **d)** MS + 1 mg/l Kin (% 50- 3 ay karanlık) uygulamasından elde edilen protokorm (14 günlük) **e)** MS + 2 mg/l Kin (% 25- Aydınlik) ortamdan elde edilen protokorm (28 günlük) **f)** ½ MS + 4 mg/l Kin + 0.5 NAA (% 25- Aydınlik) uygulamadan elde edilen protokorm (28 günlük)

4.2. Işığın Tohum Çimlenmesi ve Protokorm Oluşumuna Etkisi

Bu çalışmada ışığın çimlenme ve protokorm oluşumu üzerine etkisini ölçebilmek amacıyla tohumlar,

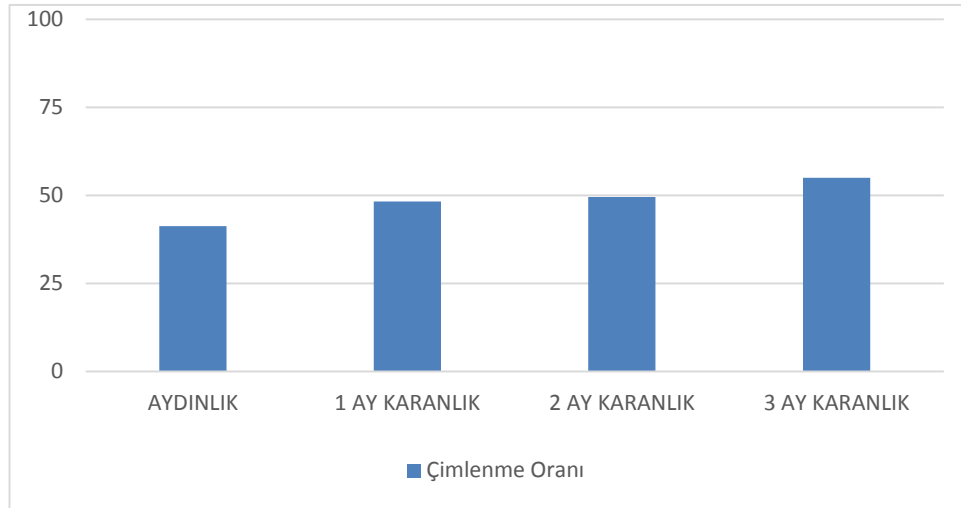
- 1) Tamamen aydınlık ortam
- 2) 1 ay karanlık ortam
- 3) 2 ay karanlık ortam
- 4) 3 ay karanlık ortam olmak üzere toplam 4 farklı uygulamaya tabi tutulmuştur.

Çizelge 4.6. Işıklanma süresine göre çimlenme yüzdesi

ORTAM	Çimlenen tohum sayısı	Çimlenme oranı (%)
AYDINLIK	124,67 c	41.3
1 AY KARANLIK	145,50 b	48.3
2 AY KARANLIK	149,58 b	49.6
3 AY KARANLIK	165,25 a	55.0

HKO= 482,09 $\alpha = 0.5$

Çalışmada yapılan ışıklandırma uygulamaları sonucunda karanlık ön uygulama yapılan tohumlar tamamen aydınlık ortamda bırakılan tohumlara göre daha iyi oranda çimlenme göstermiştir. Yapılan istatistik incelemeleri sonucunda karanlık uygulamaları arasında istatistiki açıdan önemli olup en iyi çimlenme 3 ay karanlık ortamda gerçekleşmiştir. Ayrıca karanlık uygulama süresi arttıkça çimlenme oranında arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.7. *Barlia robertiana*'nın ışıklandırma sürelerine göre çimlenme oranı

Çizelge 4.7. Işıklarına süresine göre protokorm oluşturma yüzdesi

ORTAM	PROTOKORM SAYISI	PROTOKORM %' si
AYDINLIK	40	32.2
1 AY KARANLIK	6	4.13
2 AY KARANLIK	48	32.2
3 AY KARANLIK	55	33.3

Çalışmadan elde ettiğimiz bulgulara göre, karanlık ön uygulamanın çimlenmeyi ve protokorm oluşumunu teşvik ettiği sonucuna varılmıştır. En iyi çimlenme oranı % 55 ile 3 ay karanlık ön uygulamadan elde edilmiştir. En iyi protokorm oluşturma oranı ise toplamda 55 adet protokorm sayısı ile % 33.3 oranında yine 3 ay karanlık ortamdan elde edilmiştir. Karanlık ortamda muamele edilen tohumların daha yüksek oranda çimlenme gösterdikleri ve karanlık ortamdan çimlenmiş tohumların ise daha yüksek oranda protokorm oluşturdıkları bu çalışmadan çıkarılabilecek bir sonuçtur.

4.3. Sodyum hipoklorit çözelti derişiminin sterilizasyon, çimlenme ve protokorm oluşumuna etkisi

Orkide tohumları sert bir tohum kabuğuyla örtülü oldukları için tohumların çimlenebilmesi için, sert olan tohum kabuğunun zayıflatılması gerekmektedir. Tohumların yüzey sterilizasyonunda kullanılan kimyasalların derişimleri ve muamele

edilme süreleri hem yüzey sterilizasyonu için hem de tohum kabuğunun zayıflatılması için oldukça büyük bir önem taşımaktadır (Bektaş vd. 2016). Bu çalışmada çift sterilizasyon işlemi uygulayarak %25 ve %50'lik iki farklı derişimdeki sodyum hipoklorit çözeltisinin sterilizasyon, çimlenme oranı ve protokorm oluşturma oranı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Daha önce yapılan sterilizasyon uygulamalarından denemenin tamamı kontaminasyona uğramış, sterilizasyon işlemi başarısız olmuştur. Fakat uyguladığımız son metot ve yeni derişim oranları ile çok düşük oranda kontaminasyon ile başarı sağlayarak, *Barlia robertiana*'nın sterilizasyonunda yeni bir yöntem geliştirmiş bulunmaktayız. Elde ettiğimiz bulgulara göre, kontaminasyona uğrayan petripler çoğunlukla % 25 oranında hipoklorit asit çözeltisi ile dezenfekte edilen tohumlara ait olduğu sonucuna ulaşıldı ve toplamda kontaminasyona uğrayan petri sayısı 18 olarak belirlendi. % 50'lik ticari çamaşır suyu ile dezenfekte edilen tohumlardan ise yalnızca 6 adet petride kontaminasyon yaşandı.

Çizelge 4.8. Sodyum hipoklorit derişiminin tohum çimlenmesine etkisi

Hipoklorit Derişimi	Çimlenme Sayısı	Çimlenme oranı	Protokorm sayısı	Protokorm oranı
% 25	150	% 50	76	% 50.6
% 50	141	% 47	85	% 60.2

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, hipoklorit derişimlerinin çimlenmeye etkisi iki oranda da birbirine yakın çıkmıştır. Çimlenme oranı olarak bakıldığında % 25'lik hipoklorit çözeltisi daha iyi sonuç verirken, en yüksek protokorm oluşturma oranı ise % 50'lik sodyum hipoklorit çözeltisinden elde edilmiştir. Ancak her iki derişim yüzdesinde de tohum çimlenmesi ve protokorm oluşumu gerçekleşmiştir.

5.TARTIŞMA

Barlia robertiana, tohumlarında endosperm bulundurmadağı için, doğal ortamında çimlenebilmesi yalnızca mikorizal funguslarla mümkün olmaktadır. Funguslar, embriyonun çimlenebilmesi için gereken enerjiyi sağlayıp, tohum çimlenmesine katkıda bulunurlar. Doğal ortamda, orkide tohumlarının sadece %5'ten azı çimlenebilmektedir. Çimlendikten sonra da ergin bir bitki meydana gelebilmesi için 2-16 yıl gibi uzun bir süre beklemek gerekmektedir (Gümüş 2009).

Bu çalışmada, *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirilmesi araştırılmıştır. Bu amaçla tohumun çimlenmesi için gerekli olan besin ve enerji dışardan hazır olarak verilmiş, mikoriza fungusu ile simbiyotik birlikteliğe gerek kalmadan tohumlar çimlendirilmiştir. Araştırmada altı farklı ortam kullanılmıştır. MS, ½ MS ve Orchimax ortamlarına BAP, Kinetin ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarda eklenmesiyle tohumun çimlenmesi ve çimlenen tohumdan protokorm oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmada uygulanan ortamların tamamında farklı oranlarda çimlenme gözlemlenmiş, protokorm oluşumu ise her ortamda gözlemlenmemiştir. *Barlia robertia*'nın *in vitro* çimlendirme çalışmasında hem tohumlar çimlenmiş hem de çimlenen tohumlardan protokormlar meydana gelmiştir. Yaptığımız çalışmada ½ MS ortamında kültüre aldığımız tohumlar MS ve OAM ortamlarında kültüre aldığımız tohumlardan daha yüksek oranda çimlenme göstermiştir. Karanlık ortamda uygulamaya tabi tuttuğumuz *Barlia* tohumları ise aydınlık ortama göre daha fazla çimlenme miktarına sahiptir. Hatta tohumları karanlıkta tutma süresi arttıkça, tohumların çimlenme oranının da doğru orantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Bektaş vd (2013), *Orchis coriophora* tohumlarının *in vitro* çimlendirme çalışmasında, bitki tohumlarını dört temel besi ortamında çimlendirmiş ve en iyi sonucu % 27,4 çimlenme oranı ile Orchimax temel besi ortamından almıştır. Bektaş (2016), *Dactylorhiza urvillenna* tohumlarını farklı içeriğe sahip temel besi ortamlarında *in vitro* çimlendirme çalışması yapmış ve bu ortamlardan en yüksek çimlendirme oranını Orchimax ortamından % 62,39 oranı ile elde ettiğini bildirmiştir. *Barlia robertiana* üzerinde yürütmüş olduğumuz *in vitro* çimlendirme çalışmasında ise Orchimax besin ortamına alınan tohumlarda en yüksek oranda çimlenme gözlemlenmemiştir. Bu çalışmada Orchimax ortamında tohum çimlenmesi gözlemlenmiş ve elde edilen çimlenme oranı % 44 olarak bulunmuştur. En yüksek oranda çimlenme gösteren ortam % 76,3 çimlenme oranı ile ½ MS ortamı olarak bulunmuştur.

Chitta Ranjan vd. (2010) *Cymbidium aloifolium* (L.)' ın *in vitro* çimlendirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada en iyi sonucu MS temel besi ortamından aldıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacı yaptığı çalışmasında sitokinin ve oksin kombinasyonlarının çimlenmeyi teşvik ettiğini bildirerek, kendi çalışmalarında MS ortamına ilave NAA ve BA'nın farklı oranlarındaki kombinasyonlarından en yüksek oranda çimlenme elde ettiklerini bildirmişlerdir. MS ortamında kültüre alınan tohumlarda NAA içeren petrillerdeki tohumlar % 90 oranında çimlenme gösterirken, BA içeren MS ortamındaki tohumlar ise % 70 oranında çimlenme gösterdiği bildirilmiştir. Benzer sonuçlar elde ettiğimiz çalışmamızda en iyi çimlenme sonucunu 1/2 MS besi ortamında elde etmiş bulunmaktayız. Bu çalışmada en yüksek çimlenme oranı % 76,3 oranı ile ½ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA ortamından elde edilmiştir. En iyi 2. çimlenme yüzdesi % 64,3 ile ½ MS + 0,5 mg/l NAA ortamından elde edilmiştir. NAA tek başına ve Kinetin ile kombinasyonunda yüksek oranda çimlenme göstermiştir. Sitokinin ve oksin kombinasyonunun çimlenmeyi teşvik ettiği, bizim çalışmamızda da gözlemlenmiş, en

yüksek çimlenme yüzdesi sitokinin ve oksin kombinasyonundan elde edilmiştir. NAA'nın BAP ile kombinasyonunda ise çimlenme gerçekleşmiş fakat oranı % 35,3' e düşmüştür. *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirme çalışmasında, NAA hormonunun tek başına çimlenmeyi teşvik ettiği ayrıca Kinetin hormonu ile birlikte en yüksek oranda çimlenme oranı verdiği gözlemlenmiştir. NAA hormonunun BAP ile kombinasyonunda ise çimlenme oranının daha düşük gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır.

Gümüş (2009)' a göre *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorhiza. nischalkiorum* ve *Orchis pinetorum* türlerinin *in vitro* çimlendirme çalışmasında temel besi ortamı olarak MS ve ½ MS besi ortamı kullanmıştır. Çalışma sonucunda çimlenme oranının türden türe göre değiştiğini bildirmiş ancak ½ MS (% 3,30) ortamından elde ettiği çimlenme oranını MS (%1,04) ortamından elde ettiği çimlenme oranına göre daha yüksek bulmuştur. Bu çalışma da da en yüksek çimlenme oranı %76,3 ile ½ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 NAA ortamından elde edilmiştir. Bu ortamı %64,3 çimlenme oranı ile ½ MS + 0,5 NAA ortamı takip etmiştir. ½ MS ortamına alınan tohumlar MS ortamına alınan tohumlardan daha yüksek oranda çimlenme göstermiştir.

Rajkumar vd. (2006) *Ascocende kangla* çimlendirme çalışmalarında en başarılı sonuca ½ MS ortamında ulaşmışlardır. MS ortamına ekledikleri Kinetin ve NAA oranı ile çimlendirmeyi teşvik etmişler ve tohumun protokormdan bitkiciğe dönme sürecini hızlandırmışlardır. Bu çalışmada da Kinetin ve NAA'nın birlikte bulunduğu ½ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 NAA ortamı en yüksek oranda çimlenme gösteren ortam olarak bulunmuştur.

Bhadra vd. (2003) tehlike altında bulunan orkide türlerinden *Geodorum densiflorum* tohumlarını MS temel besin ortamında kültüre almıştır. Çalışmasında MS ve ½ MS ortamlarını kullanmış ve tohum çimlendirmesini başarmıştır. Ortamlarına ilave ettiği 2 mg/l NAA ve 2 mg/l BAP büyüme düzenleyicilerin tohum çimlenmesine, protokorm oluşturmaya, protokormdan bitkiciğin oluşmasına ve sürgünlerin uzamasına neden olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada da *Barlia* tohumlarının çimlenmesine ve protokorm oluşturmaya NAA'nın tek başına ve Kinetin ile kombinasyonunda teşvik edici etkisi gözlemlenmiştir fakat NAA+BAP kombinasyonu en düşük çimlenme oranlarından biri olarak bulunmuştur. Pauw vd. (1995) sitokinin hormonunun *Cypripedium candidum* orkide tohumunun çimlenmesine ve protokorm oluşturmaya etkisini araştırmışlar ve tohum ekiminden sekiz hafta sonra en yüksek çimlenme oranı 0,8 mg/l BA içeren ortamda elde etmişlerdir. Bu çalışma da sitokinin hormonu olarak BAP ve Kinetin kullanılmış en yüksek çimlenme oranı 4 mg/L Kinetinden elde edilirken Kinetinin konsantrasyonu azaldıkça çimlenme oranı da azalmıştır. Çalışmada kullanılan BAP ise Pauw vd. (1995)'nin bulgularının aksine %36,3 oranı ile en düşük çimlenme oranlarından birini vermiştir.

Barlia robertiana'nın *in vitro* çimlendirilme çalışması daha önceden yapılmadığı için, bu çalışma bir ilk özelliği taşımaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda orkide tohumlarının MS, ½ MS ve Orchimax temel besin ortamlarında çimlenmenin başarılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Fakat bu durumun türden türe, ortamda bulunan büyüme düzenleyicilere bağlı olarak farklılık gösterdiği de bildirilmektedir.

Büyüme düzenleyicilerden sitokininlerin tek başlarına ya da oksinlerle beraber oluşturdukları kombinasyonları da protokorm oranının artmasına neden olduğu sonucuna

ulaşılmıştır. Ayrıca ½ MS ortamına ekilen tohumların MS ortamına ekilen tohumlardan daha yüksek oranda çimlenme ve protokorm oluşturma yüzdesine sahip olduğu da edinilen diğer bir bilgidir.

Araştırmalar sonucunda *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirilme çalışması için en iyi sonuç veren MS, ½ MS ve Orchimax temel besin ortamlarına BAP, Kinetin ve NAA ilave ederek besin ortamı hazırlanıp, deneme kurulmuştur.

Yapılan çalışmalarla hemen hemen aynı sonuçlar alınarak en iyi çimlenme oranı ve en iyi protokorm oluşturma oranı ½ MS + 4 mg/l KİN. + 0,5 mg/l NAA ortamından elde edilmiştir. Bu çalışmada da sitokinin ve oksinin birlikte kullanılması hem çimlenme yüzdesini hemde protokorm oluşturma oranını arttırmıştır. Kinetin hormonunun yüksek derişimlerinin düşük derişimlerine oranla daha yüksek oranda çimlenme ve protokorm oluşumu gösterdiği bu çalışmada gözlemlenmiştir. Kinetinin NAA ile kombinasyonu en iyi oranda çimlenme yüzdesine sahiptir. NAA tek başına ya da Kinetin ile birlikte yüksek oranda çimlenme gösterirken BAP ve NAA kombinasyonu, Kinetin ve NAA kombinasyonuna göre daha düşük oranda çimlenme göstermiştir.

Ortamlar tohum çimlenme oranlarına göre kıyaslandığında en iyi çimlenme gösteren ortam % 76,3 oranı ile ½ MS + 4 mg/l KİN. + 0,5 mg/l NAA ortamı olurken, ½ MS + 0,5 mg/l NAA ortamı % 64,3 çimlenme oranı ile ikinci sırada yer almıştır. MS + 1 mg/l KİN. ortamı % 32 çimlenme oranı ile en az çimlenen ortam olmuştur. Çimlenen tohumlardan protokorm oluşturma oranı ise en yüksek % 33,18 oran ile ½ MS + 4 mg/l KİN. + 0,5 mg/l NAA ortamına aittir. En az protokorm oluşturan besi ortamı ise % 3,125 oran ile MS + 1 mg/l KİN ortamı olarak bulunmuştur.

Tohumlar petrilere ekildikten sonra 7 günlük periyotlarla ışık mikroskopunda gelişimleri takip edilmiş ve embriyoların şişip tohumun çimlenmeye başlaması tam 124 gün sürmüştür. İlk çimlenen tohumlar, ½ MS + 2 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA ortamından elde edilmiştir. Oluşan ilk protokorm yine aynı ortamdan elde edilmiş olup ekim tarihinden 186 gün sonra gerçekleşmiştir. *Barlia robertiana* 'nın tohum çimlenmesi ve protokorm oluşturmaları oldukça uzun zaman almıştır. Pauw vd (1995) *Cypripedium* türlerinde, *in vitro* ortamda benzer ortamları kullanarak yaptıkları çimlendirme çalışmasında çimlenme süresini sekiz hafta olarak bildirmiştir.

Karasal orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine en olumlu etkiye sahip hormonların sitokininler olduğu bildirilmiştir. Ancak bitki hormonlarının çimlenme üzerindeki etkilerinin de farklı orkide türlerinde farklı sonuçlara neden olabileceği bildirilmiştir (Arditti ve Harrison 1977).

Stewart and Kane (2006), BA, Zeatin, Kinetin ve 2ip sitokininlerini farklı oranlarda *in vitro* çimlendirme ortamına ilave ederek çimlenme üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çimlenme üzerine en olumlu etkiyi yapan hormon BA olarak bulunmuştur. Hadley and Harvais (1968), *Dactylorhiza purpurella* türü tohumlarını *in vitro* çimlendirmek amacıyla besi ortamına eklediği IAA, GA3 ve kinetinin çimlendirmeye etkilerini araştırmıştır. Kinetinin tek başına veya IAA ile birlikte kullanılmasının çimlenmeyi olumlu etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca IAA'in çimlenme oranını düşürdüğü ancak protokormların uzamasını sağladığı ve giberellik asitin protokorm ömrünü uzattığı ancak protokorm sayısına etki etmediğini de bildirmişlerdir.

Barlia robertiana'nın *in vitro* çimlendirme çalışmasında ise kinetinin tek başına çimlenmede düşük sonuçlar verdiği gözlemlenmiş ve kinetinin yüksek derişimi ile düşük derişimli NAA kombinasyonuna sahip besi ortamları en yüksek çimlenme yüzdesini vermiştir.

Pedroza-Manrique and Mican-Gutierrez (2006), *Odontoglossum gloriosum*'un *in vitro* çimlendirme çalışmasında toplamda 3 farklı ortam ve 4 farklı ışık uygulaması kullanarak endemik olan orkide türünün çimlenmesini amaçlamışlardır. Yaptıkları bu çalışmada besin ortamına NAA ilavesinin çimlenmeyi olumlu etkilediğini bildirmişler ve en yüksek çimlenme oranını 2,68 μM NAA içeren ortamdan elde etmişlerdir. NAA'nın tek başına orkide tohumlarında çimlenmeyi teşvik ettiği *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirme çalışmasında da gözlemlenmiştir. En yüksek ikinci çimlenme oranını NAA'nın tek başına yer aldığı, % 64,3 çimlenme oranı ile $\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg/l NAA ortamından elde edilmiştir. Vejsadova (2006), üç farklı orkide türünde yürüttüğü *in vitro* çimlendirme çalışmasında oksin ve kinetinin çimlenme ve bitki oluşumuna teşvikini incelemiş, IAA ve NAA'nın Zeatin ile kombinasyonunda yüksek oranda tohum çimlenmesi ve ardından hızlı bir şekilde bitki gelişimi gözlemlendiğini bildirmiştir. *Chloraea crispa* karasal orkidesinde *in vitro* asimbiyotik çimlendirme çalışması yapan, Quiroz vd., sitokininlerin orkide tohumlarında çimlenmeyi teşvik ettiğini bildirmiş, 3 farklı besi ortamında yürüttüğü çimlendirme çalışmasında sitokinin olarak BAP ve IBA kullanmış en yüksek oranda çimlenmeyi 0,1 mg·L⁻¹ oranında kullandığı BAP hormonundan elde etmiştir. Yürütmüş olduğumuz bu çalışmada, *Barlia robertiana* tohumlarının çimlenmesini teşvik amacıyla farklı dozlarda BAP, Kinetin ve NAA kullanılmış, NAA'nın tek başına ve Kinetin ile birlikte uygulanması, çimlenmeyi teşvik etmiştir. Kinetinin tek başına 1 mg/l ve 2 mg/l dozlarında uygulanması diğer uygulamalar içinde daha düşük çimlenme yüzdesi vermiştir. En iyi çimlenme yüzdesi ise Kinetinin NAA ile kombinasyonundan ele edilmiştir.

Orkide tohumlarının çimlenmesinde ışık da büyük bir öneme sahiptir. Yapılan araştırmalar sonucunda karanlık ortamda tutulan tohumların daha fazla çimlenme oranına sahip oldukları ve daha çok sayıda protokorm oluşturdıkları gözlemlenmiştir. Van Waes vd. (1986), orkide tohumları üzerine yaptığı *in vitro* çimlendirme çalışmasında en iyi sonucu karanlık ortamdan aldığını bildirmiştir. Zettler vd. (1994), yedi gün boyunca 8/16 fotoperiyotta tuttuğu orkide tohumlarını tamamen karanlık ortama aldığında tohum çimlenmesinin %20'den % 44'e çıktığını bildirmiştir. Zettler vd. (1997), ışığın orkide tohumlarının çimlenmesine büyük etkisinin olduğunu bildirmiştir. Yapılan *in vitro* çimlendirme çalışmasında tamamen karanlıkta bırakılan orkide tohumları ile 8/16 ya da 14/10 fotoperiyotta tuttuğu tohumların çimlenme yüzdeleri oranlamış ve karanlık ortamdan elde edilen çimlenme yüzdesi aydınlık ortamdan elde edilen çimlenme yüzdesinden fazla bulunmuştur.

Kauth (2006), *in vitro* çimlendirme çalışmalarında tamamen karanlık ortamların 8/16 saatlik normal periyottaki ışıklandırma süresine sahip ortamdan çok daha yüksek çimlenme yüzdesine sahip olduğunu belirtmektedir. Stewart vd. (2006), *Habenaria macroceratitis* orkidesinde yaptıkları *in vitro* çalışmada en yüksek tohum çimlenmesi oranını % 91 ile tamamen karanlık ortamdan elde ettiklerini bildirmişlerdir. Kısakürek vd (2010), ışık rejiminin ve farklı besin ortamlarının orkide türlerinin çimlenmeleri üzerine etkisini araştırdığı çalışmasında, karanlık ve 16 saat/gün aydınlık uygulaması yapmış ve

en iyi çimlenme sonucunun orkide türlerine göre değişiklik gösterdiğini belirtmiştir. Çalışmasında aydınlık ortamdaki çimlenme yüzdesi karanlık ortama göre daha yüksek bulunmuştur. Hürkan vd (2018), doğadan bilinçsizce sökülüp nesli tehlike altına giren orkide türlerinden, *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich, *Anacamptis morio* (L.) R.M. Bateman, *Pridgeon & M.W. Chase subsp. morio*, *Dactylorhiza romana* (seb.) Soo ve *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M. Bateman, *Pridgeon & M.W. Chase* orkidelerinin asimbiyotik çimlendirme çalışmasında tohumları on iki hafta boyunca karanlık ortamda kültüre almış ve dört hafta sonra tohumlar şişkinleşerek ilk çimlenme belirtileri ortaya çıkmıştır. *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirme çalışmasında da ışığın çimlenmeye etkisine bakılmıştır. Bu çalışmada hem karanlık hem aydınlık ortamda da çimlenme gözlemlenmiştir ancak en yüksek çimlenme yüzdesi karanlık ortamlarda ön uygulamaya tabi tutulan *Barlia* tohumlarından elde edilmiştir. Işık çimlenmeye etkisi, orkide türüne ve kullanılan ortama göre farklılıklar göstermiştir.

Daha önce *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlenmesi üzerine yapılmış bir çalışma olmaması ve orkidelerin çimlenmelerinde yaşanan zorluklar nedeniyle bu alanda yapılan çalışmaları oldukça sınırlı tutmuştur. Yapılan araştırmalar sonucunda, çoğunlukla orkide tohumlarının karanlık ortamda daha fazla çimlenme gösterdikleri dikkate alınarak bu çalışmada dört farklı ışıklandırma ortamı denenmiştir. 9 cm çapındaki petrilere tohum ekimi işleminden sonra tohumlar, tamamen aydınlık, bir ay karanlık, iki ay karanlık ve üç ay karanlık olmak üzere toplamda 4 farklı uygulamaya tabi tutulmuştur. Bu çalışmada da en iyi çimlenme yüzdesi karanlık ortamda muamele edilen petrilere gözlemlenmiştir. % 55 çimlenme oranı ile 3 ay boyunca karanlıkta tutulan *Barlia robertiana* tohumları en yüksek oranda çimlenme göstermiştir. Tamamen aydınlık ortamda tutulan tohumlar ise en düşük oranda (%41,3) çimlenme göstermişlerdir. Çimlenen tohumlardan elde edilen protokorm oranları da yine en yüksek (% 33,3) üç ay karanlık ortamdan elde edilmiştir. Yapılan istatistiki analizlerde karanlık ortamlar birbiriyle kıyaslandığında en iyi çimlenme oranı 3 ay karanlık ortamda gözlemlenmiş, 3 ay karanlık ortam uygulamasını ise sırasıyla, 2 ay karanlık uygulama ve 1 ay karanlık uygulama takip etmiştir. Karanlık ön uygulamada tutulan tohumların, tamamen aydınlıkta tutulan tohumlardan daha yüksek oranda çimlenme gösterdiği belirlenmiştir. Karanlıkta tutma süresi uzadıkça, tohumların çimlenme miktarı da artmıştır.

Çalışmanın geleceği bakımından sterilizasyon işlemi en önemli uygulama kısmını oluşturmaktadır. *Barlia robertiana* tohumları oldukça küçük yapıda oldukları için sterilizasyon işlemi çok zor gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada önce % 70 alkol çözeltisinde 1 dakika boyunca ön uygulamaya uğrayan *Barlia* tohumları durulandıktan sonra, yarısı % 25 Sodyum hipoklorit çözeltisinde (30 dakika – 30 dakika), kalan yarısı ise % 50 sodyum hipoklorit çözeltisinde (20 dakika – 10 dakika) bekletilmiştir. Tohumlara çift sterilizasyon uygulanmış ve toplamda kontaminasyona uğrayan petri sayısı 18 olmuştur, bu sayı da toplam petri sayısının % 5'ine denk gelmektedir. Sterilizasyonda sağlanan bu başarı, steril edilmesi oldukça zor olan diğer orkide tohumlarında da denenebilecek bir yöntemdir.

Miyoshi vd (1995), sterilizasyonu zor olan *Calanthe discolor* karasal orkidesinin yüzey sterilizasyonu için, sterilizasyon işlemlerinde yaygın olarak kullanılan sodyum hipoklorit çözeltisini kullanmıştır. %1'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde muamele edilmiş ve tohumlar çözelti içerisindeyken elle yedi dakika boyunca çalkalanmıştır. Ardından beş kez durulama işlemi gerçekleştirilmiştir. *Barlia* için % 1'lik sodyum

hipoklorit çözeltisi çok düşük bir oran olup sterilizasyonda başarı elde edilecek bir oran değildir. Vujanovic vd (2000), *Cypripedium reginae*, *Cypripedium parviflorum*, *Platantera grandiflora* türlerinde yaptığı in vitro çimlendirme çalışmasında tohumların yüzey sterilizasyonu için % 10 oranında sodyum hipoklorit kullanmıştır. Tohumları 2 saat boyunca sodyum hipokloritte bekleterek sterilizasyon işlemini tamamlamıştır. Bu derişim oranı *Barlia* için oldukça düşüktür.

Kısakürek vd (2010), *Orchis coriophora*, *Orchis morio* var. *morio*, *Orchis laxiflora* ve *Dactylorhiza romana* türlerine ait rohumları in vitro kültüre almışlardır. Türlerle ait tohumlar her kavanoz için 5 mg olacak şekilde filtre kâğıtları içerisine paketlenerek 1-2 damla Tween-80 içeren %1,5 lik sodyum hipoklorit içerisinde 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra srteril kabin içerisinde tohumlar kurumaya bırakılmıştır. Bizim çalışmamıza benzer olarak gerçekleştirilen bu çalışma da da sterilizasyonda başarı sağlanmıştır.

Bektaş (2016), *Dactylorhiza urvileana*'nın in vitro asimbiyotik çimlendirilmesi üzerine yaptığı çalışmasında, uygun sterilizasyon yönteminin belirlenebilmesi için iki farklı sterilizasyon yöntemi gerçekleştirmiştir. Farklı derişimlerde (%5, 10, 20 ve 30) hazırlanan ticari çamaşır suyu ile 10 dakika ve H₂O₂ (% 35'lik stok) ile 30 dakika sürelerle tohumların yüzey sterilizasyonunu gerçekleştirmiştir. Farklı derişimlerdeki çamaşır suyu ile sterilize edilen tohumların kültüre alınmasıyla, kültür ortamlarındaki kontaminasyon sıklıklarına bakıldığında artan derişimin kontaminasyonu engellediği görülmüştür. Çamaşır suyunun % 5 ve % 10'luk derişimleri ile yapılan yüzey sterilizasyonunda kültür kaplarının tamamında kontaminasyon tespit edilmiştir. % 20'lik derişimde ise kültür kaplarının % 50'sinde kontaminasyon görülürken, % 30'luk derişimde bu olumsuzluğa rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda da bezer sonuçlar elde edilmiştir, sodyum hipokloritin derişimi arttıkça kontaminasyon oranı azalmıştır. Hürkan vd (2018), doğadan bilinçsizce sökülüp nesli tehlike altına giren orkide türlerinden, *Anacamptis pyramidalis* (L.) L.C. Rich, *Anacamptis morio* (L.) R.M. Bateman, *Pridgeon & M.W. Chase subsp. morio*, *Dactylorhiza romana* (seb.) Soo ve *Neotinea tridentata* (Scop.) R.M. Bateman, *Pridgeon & M.W. Chase* orkidelerinin asimbiyotik çimlendirme çalışmasında tohumları % 10 sodyum hipokloritte 10 dakika bekleterek sterilizasyon işlemini tamamlamıştır.

Bu çalışmada *Barlia robertiana* salep orkidesinin in vitro çimlendirilmesi amaçlanmıştır. Altı farklı besin ortamı ve dört farklı fotoperiyotta gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda her ortamda çimlenme oluşumu gözlemlenmiş fakat her ortam ve uygulamadan protokorm oluşumu gerçekleşmemiştir. Elde edilen protokormlardan bitkicik elde etmek amacıyla oluşan protokormlar MS0 ortamına alınmış ve gelişmeleri gözlemlenmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, oluşan protokormların da bitkiciğe dönüşmesinin biraz zaman alacağını söylemek mümkündür.

Barlia robertiana'da daha önce hiç yapılmamış bu çalışma, bundan sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacaktır. Tohumlarında endosperm bulunmaması nedeniyle çoğalmaları kısıtlı olan ve nesli tükenme tehlikesi altında bulunan nadir orkide türlerinden *Barlia robertiana* salep orkidesinin in vitro ortamda çimlendirilmesi ve protokorm oluşturulması sağlanmıştır. Bu durum hem doğanın dengesinin korunmasında hem de ülke ekonomisine katkısı bakımından oldukça büyük bir önem arz etmektedir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Barlia robertiana*'nın *in vitro* koşullarda çimlendirme olanakları araştırılmıştır. Çalışmada 3 farklı temel besi ortamı (MS, ½ MS ve Orchimax) kullanılmıştır. Sitokinin ve oksin hormonlarının çimlenmeyi teşvik edici özelliklerinden dolayı, kullanılan temel besi ortamlarına farklı dozlarda BAP, Kinetin ve NAA eklenmiş ve tohumları çimlendirmek için 6 farklı besi ortamı hazırlanmıştır. *Barlia robertiana* tohumlarının çok küçük olması sterilizasyonunu zorlaştırmıştır. Çalışmada tohumlar önce 1 dakika süre ile % 70 etil alkol çözeltisinde bekletilmiş, durulandıktan sonra % 25 (30'+30') ve % 50 'lik(20'+15') sodyum hipoklorit çözeltisinde belirli sürelerde çift sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Geliştirilen bu yöntem başarılı olmuş, tohumlar canlılığını yitirmeden sterilizasyonda başarı elde edilmiştir. Sterilizasyonu yapılan tohumlar, aseptik koşullarda, 9 cm'lik petri kaplarına dökülen 6 farklı besin ortamına ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekim işlemi tamamlandıktan sonra petri kapları parafilm ile sarılarak, tamamen aydınlık ortam, 1 ay karanlık ortam, 2 ay karanlık ortam ve 3 ay karanlık ortam olmak üzere 4 farklı ışıklandırma ortamında, iklimlendirme kabiniinde kültüre alınmıştır.

Kültüre alma işleminden sonra, tohumların çimlenme gelişimleri takip edilmiştir. Bu süreç oldukça yavaş ilerlemiş ve ilk çimlenme tohumlar kültüre alındıktan tam 124 gün sonra gerçekleşmiştir. Bu tarihten itibaren tohumlar hızlı bir şekilde çimlenmeye başlamış ve süreç iki ay devam etmiştir. İlk çimlenme görüldükten sonra 2'şer haftalık aralıklarla embriyoları şişip çimlenen tohumlar takip edilmiş ve tohumların çimlenme oranları belirlenmiştir. Çimlenen tohumlardan protokorm oluşumu ise tohumların kültüre alındığı tarihten 186 gün sonra gerçekleşmiştir. İlk protokorm görüldüğü andan itibaren iki haftalık sürelerle protokorm sayımı yapılmış, protokorm oluşturma oranları belirlenmiştir. Protokorm oluşturma süreci ise 6 ay sürmüş, sonrasında bir oluşum gözlemlenmemiştir. Elde edilen protokormlar sürgün oluşturup, yeni bir bitki oluşturmaları için hormonsuz MS ortamına aktarılmıştır. Bir aylık sürelerle ortamlar yenilenerek, prtokormlar taze MS ortamına alınmıştır.

Bu çalışmada tohum sterilizasyonunda önemli bir başarı yakalanmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu elde edilen bulgulara, orkide tohumlarının sterilizasyonunda, var olan yöntemler çeşide göre farklı sonuçlara neden olmuştur. Bu çalışmada uygulanan sterilizasyon metodu ile tohumlar canlılıklarını kaybetmeden çimlenme göstermiş ve protokorm oluşturmuşlardır. % 25 ve % 50 olmak üzere iki farklı sodyum hipoklorit derişimi ile tohumlar dezenfekte edilmiş ve iki derişimde de tohumların çimlenmeleri arasında az bir fark gözlemlenmiştir. Bu çalışmada en az kontaminasyon %50 sodyum hipoklorit asit ile muamele edilen *Barlia* tohumlarında gerçekleşirken en iyi çimlenme sonucu veren sterilizasyon yöntemi % 25'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde çift sterilizasyonlu muamele olarak bulunmuştur.

Tohumlar altı farklı kültür ortamına ekilmiş ve en iyi çimlenme % 76,3 oranı ile $\frac{1}{2}$ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 NAA kültür ortamından elde edilmiştir. En iyi protokorm oluşturma % 33.18 oran ile yine aynı ortam olan $\frac{1}{2}$ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 NAA'dan elde edilmiştir. Denemenin ışıklandırma süreleri birbiri ile kıyaslandığında en iyi çimlenme oranı %55 ile 3 ay karanlık muameleye tabi tutulan tohumlardan elde edilmiştir. Işıklanma sürelerine göre protokorm oluşturma oranları birbirleri ile kıyaslandığında uygulamalardan elde edilen sonuçlar birbirine yakın olmakta fakat en yüksek oran % 33,3 ile 3 ay karanlık uygulamadan elde edilmiştir.

Bulgular teker teker incelendiğinde uygulamalara göre çimlenme ortalaması en yüksek olan sonuç $\frac{1}{2}$ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 mg/l NAA ortamında %25 sodyum hipoklorit ile steril edilmiş ve 3 ay karanlık ortamda kültüre alınan uygulamadan gelmektedir. Protokorm oluşturan en iyi kültür koşulları ise tamamen aydınlık ortamda muamele görmüş % 50 sodyum hipoklorit ile steril edilmiş $\frac{1}{2}$ MS + 4 mg/l Kin + 0,5 NAA besin ortamı olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada *Barlia robertiana* tohumları *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş, çimlenen tohumlardan protokorm oluşumu meydana gelmiştir. *Barlia robertiana*'nın *in vitro* çimlendirilme çalışması daha önce yapılmadığı için bu çalışma bir ilktir. Bu çalışma ile sterilizasyonda yeni bir metot denenmiş, tohumun çimlenmesi bakımından çok büyük bir sorun olan sterilizasyon işlemi başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Doğada kendiliğinden çimlenmesi güç olan, nadir ve koruma altında bulunan orkide türlerimizden *Barlia robertiana*'nın *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ve protokorm oluşturmaları sağlanmıştır. Elde edilen protokormlardan bitki eldesi henüz gerçekleşmemiş, bitki oluşturmak için protokormları alt kültüre alma çalışmaları devam etmektedir. Böylelikle doğada çimlenmesi güç olan ve çimlenebilmesi için mikoriza fungusları ile simbiyotik birlikteliğe ihtiyaç duyan *Barlia robertiana*'nın *in vitro* koşullarda yapay besi ortamında çimlendirilip, protokorm oluşturmaları sağlanmıştır. Ülkemizde ve dünyada orkide tohumlarının *in vitro* çimlendirme çalışmaları oldukça az olduğundan, bu çalışma geliştirilerek, ileride yapılacak olan *in vitro* çimlendirme çalışmalarına ışık tutabilecektir. Salebin sahip olduğu ticari değer sebebiyle ülkemizde salep elde etmek amacıyla milyonlarca orkide yumrusu bilinçsizce doğal ortamından sökülmetedir. Bu durum özellikle salep orkidelerinin nesillerini yok olma tehlikesi ile karşı karşıya bırakmıştır. Geliştirilen *in vitro* çimlendirme çalışmasıyla nadir bulunan salep orkidelerinden *Barlia robertiana*'nın üretimi arttırılarak, ülke ekonomisine kazandırılabilir. Yumrularından milli içeceğimiz olan salebin elde edilmesi ve dondurma yapımında kullanılması, *Barlia robertiana*'nın ticari önemini daha da arttırmaktadır. Salep içerisinde yer alan glikomannan bileşimi, gıda sanayisinde kullanılan çok önemli bir katkı maddesidir. Geleneksel Maraş dondurasına katılık ve esneklik verir. Kötü kolesterole iyi geldiği ve kandaki trigliserit oranlarını düşürdüğü de bildirilmektedir. Güzel görüntüsü ve hoş kokusu ile de aynı zamanda bir süs bitkisidir. Çimlenme biyolojisindeki zorluklar çoğalmasını kısıtlamış, doğadan bilinçsiz ve aşırı sökümlemler ise

Barlia robertiana'nın koruma altına alınmasına neden olmuştur. Yalnız sadece koruma altına almak, türün neslini devam ettirmek için yeterli olmamaktadır.

Bu çalışma *Barlia robertiana*'nın neslini devam ettirebilmesi bakımından umut vericidir. Çalışmalar ilerletilerek doğada yok olma tehdidi altında bulunan *Barlia robertiana* salep orkidesi *in vitro* koşullarda çimlendirilmeli ve doğaya kazandırılmalıdır. Yumrularından salep elde edildiği için oldukça değerli olan *Barlia robertiana*'nın hem doğanın dengesinin korunması hem de milli ekonomiye olan faydaları bakımından kültüre alınması önem arz etmektedir.



7. KAYNAKLAR

- Altundağ, E., Sevgi, E., Kara, Ö., Sevgi, O., Tecimen, H. B. ve Bolat, İ. 2012.
- Himantoglossum Robertianum (Loisel.) P. Delforge (Orchidaceae) Türünün Morfolojisi, Anatomisi ve Yetiştirme Ortamı Özellikleri, II.Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.173-184, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Anonymous 2011 c: <http://www.lokmanhekimimiz.com/1149/Urunlerimiz/SifaliBitkiler/Salep-Hakiki-Saf-Salep-SAHLEP-50-GR.aspx>
- Avcı, M., 2005. Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki örtüsü, İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü, Coğrafya Dergisi, Sayı 13, Sayfa 27-55, İstanbul.
- 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., Ivashenko, Zh., V., 2007. Viability of different plant offsprings of *Dactylorhiza maculata* (Orchidaceae) after transfer from in vitro culture to nature. *Botanicheskii Zhurnal*, 92(10):1544-1554.
- Arditti, J., 1967. Factor affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33:1-97.
- Arditti, J., Harrison, C.R., 1977. Vitamin requirement and metabolism in orchids. 6. *Orchid Biology: Review and Respectives.* Cornell University Press, I, Ithaca, NY. 160-175.
- Arditti, J., 1979. Aspects of orchid physiology. *Bot. Rev.*, 7:421-655.
- Arditti, J. and Ernst, R.1982. In: Stewart and Merwe, Van der, 263-277.
- Arslan, N. 2012. Ülkemizde CITES Listesinde Olan Bitki Türleri Ve Salep, II.Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.45-54, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Arsılkaya, H. 2012. Türkiye'deki Endemik Orkide Türlerinin Türkiye Biyoçeşitliliğinin Devamı Açısından Önemi, II.Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.67-86, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Aytaş T, 1994. Bazı Ophrys L. (Orchidaceae) türlerinden simbiyotik fungusların izolasyonu 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.
- Bektaş E, Cüce M, Sökmen A (2013) *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey Turkish Journal of Botany 37:336-342.

- Bektaş, E. 2016. *Dactylorhiza urvileana*'nın in vitro asimbiyotik çimlendirilmesi ve fidelerinin oluşturulması *Artvin Coruh University Journal of Forestry Faculty*, 17(1): 89-95.
- Çağlayan, K., Özavcı, A., Eskalen, A., 1998. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yaygın olarak yetişen bazı salep orkidelerinin embriyo kültürü kullanılarak in vitro koşullarda çoğaltılması. *Turkish J. Agriculture and Forestry*, 22:187-195.
- Çığ, A., İşler, S. ve Öztürk, F. 2012. Salep Orkidelerinde Yapılan Bazı Simbiyotik ve Asimbiyotik Çoğaltma Çalışmalarının Karşılaştırılması, II.Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.281-292, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Çilden, E. 2012. Aydın Paşayaylası'ndan Salepgiller (Orchidaceae) Kayıtları, II.Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.133-144, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Das, A., Ghoshall, K.K., 1989. In vitro germination behaviour of some orchids seeds developed in plains of West Bengal. *Indian Agriculturist*, 33(2):103-109.
- Delforge, P. 2006. *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East*. Timber Press, Portland.
- EKİM, T., KOYUNCU, M., VURAL, M., DUMAN, H., AYTAÇ, Z., ADIGÜZEL, N., 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Red Data Book of Turkish Plants. Ankara. S.246.
- Ellialtıoğlu, Ş., Gümüş, C. 2011. Orkidenin Doku Kültürü ile Çoğaltılması. I.Salep Orkidesi Çalıştayı. 24-25 Mayıs 2011, Kahramanmaraş, s:129-144.
- Erzurumlu, S.G. 2012. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Doğal Salep Türlerinin Saptanması Ve Mikorizaların Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar, II.Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.99-124, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Fast 1980. *Orchideen Kultur*. Verlag E. Ulmer, Stuttgart: 1-460.
- Jong, S. and Sin, S. 1985. Effect of NAA and BA on Dark Culture of *Cymbidium Virescens* Rhizom. In vitro, 11.
- 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.
- 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.
- 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. ve Ellialtıoğlu, Ş. 2012. Salep Bitkisinin Doku Kültürü İle Çoğaltılması ve Arazi Koşullarına Aktarma Çalışmaları, II.Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.259-268, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.

- Harvais, G., Hadley, G., 1967b. The development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytol.*, 66:217-230.
- Hadley, G., Harvais, G., 1968. The effects of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. *New Phytol.*, 67:441-445.
- Hürkan, Y.K., Hürkan, K. ve Akı, C. 2018. Comparative Growth Media Performances On *In vitro* Propagation of Some Salep Orchids. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C- Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji* 7:(1) ss. 52-62
- Ingold, C.T. and Hudson, H.J. 1993. *The Biology*. Sixth edition Chapman Hall. London, 224 pp. 1993.
- 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.
- Karaman, B., Ö. Aydoğan, 2009. Geleneksel Bir İçeceğimiz Salep, Gıda Mühendisliği, Uludağ Üniversitesi, Bursa, 9, <http://kishazirliklari.blogspot.com/2009/09/salep.html>
- Kauth PJ, Vendrame WA, Kane ME. *In vitro* seed culture and seedlings development of *Calopogon tuberosus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2006;85:91-102.
- Keçeli, T., A. Konar, 2003. Salep ve Alternatif Bazı Stabilizatör Maddelerin İnek Sütünden Yapılan Dondurmaların Özelliklerine Olan Etkileri, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda 28 (4): 415-419, Adana.
- Kısakürek, Ş. ve Arpacı, B.B. 2010. Kahramanmaraş Doğal Florasında Bulunan Bazı Salep Orkidelerinin Kültüre Alınabilme Olanakları, *Bahçe* 39 (2): 9 – 16
- KOYUNCU, O., 2011, “Osmaneli (Bilecik/Türkiye) ve Çevresindeki Orkidelerin Yayılış, Tahribat ve Risk Kategorileri Bakımından Değerlendirilmesi”, *Biological Diversity and Conservation* 4: 1.Knudson 1922. *Bot.Gaz.*, 73;1-25
- Kreutz, C.A.J., 2000. *Flora of Turkey and East Aegan Islands*. Vol:11, University Press, Edinburgh, 656.
- Kreutz, K.A.J., 2002. Türkiye’nin Orkideleri, Salep, Dondurma ve Katliam. *Yeşil Atlas*, No: 5, 98-109.
- KREUTZ, K., ÇOLAK, A.H., 2009. Türkiye Orkideleri (Botanik Özellikleri, Ekolojik İstekleri, Doğal Yayılış Alanları, Yaşam Tehditleri, Koruma Önlemleri). Rota Yayınları. İstanbul.
- Lauzer, D., St-Arnaud, M., Barabe, D., 1994. Tetrazolium staining and in vitro germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae). *Lindleyana*, 32(6):408-412.
- Mead, J. and W., Bulard, C. 1975. Effects Of Vitamins And Nitrogen Sources On Asymbiotic Germination And Development Of *Orchis laxiflora* And *Ophrys sphegodes* . *New Phytol.*, 74, 33-40.
- 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.

- Oğuz, B., A. O. Sarı ve A. Bilgiç. 2005. Ege Bölgesinde Yayılış Gösteren Bazı Salep orkidelerinin Üretim Olanaklarının Araştırılması. Proje Sonuç Raporu. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Menemen, İzmir.
- Oliva, A.P., Arditti, J., 1984. Seed germination of North American orchids. II. Native California and related species of *Aplectrum*, *Cyripedium* and *Spiranthes*. *Bot. Gaz.*, 145 (4):495-501
- Öğretmen, N.G., Özcan, İ.İ., Arabacı, O. 2012. Orkide'nin Gizemi Ve Salep Orkideleri, II. Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.55-66, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Önal, K., 1999. Ege Bölgesi'nde doğal yayılış gösteren *Orchidaceae* familyasına ait bazı türlerin in vitro koşullarda üretimleri üzerinde araştırmalar. *Turkish J. Agriculture and Forestry*, 23(5):1057-1064.
- Özdener, Y., 1994. *Dactylorhiza urvilleana* (Steudel) Bauman ve *Künkele* ve *D. iberica* (Bieb. Ex Willd) Soo (Orchidaceae) Türlerinin Köklerinden Fungusların İzole Edilmesi, Bu Türlerle Ait Tohumların Simbiyotik ve Asimbiyotik Kültür Ortamlarında Çimlenme ve Gelişmesi Üzerinde Bir Araştırma (doktora tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Özen, F. ve Acemi, A. 2012. Orkidelerin In Vitro Çoğaltımında Eksplant Seçiminin Önemi, II. Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.256-280, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- 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.
- Palaz, E. B., Özdemir, A., Kaya, Y. 2012. Bazı Salep Orkide Türlerine Ait Tohumların Asimbiyotik Çimlendirilmesi Üzerine Yapılan Araştırmalar, II. Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.293-300, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- 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.
- Pedroza-Manrique, J. and Mican-Gutierrez, Y. 2006. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* RCHB.F (Orchidaceae) under in vitro conditions. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 42(6); 543-547.
- Pierik et al. 1982. *Neth. J. Agric.Sci.* 30:341-346.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro Culture of Higher Plants*, 149-158.
- Quiroz, K., Saavedra, J., Vagel, H., Verdugo, G., Caligari, D.S., ve Garcia- Gonzales R., 2017. In vitro asymbiotic germination for micropropagation of the recalcitrant terrestrial orchid *Chloraea crispa*, *Appl Plant Sci.* 5(8): apps.1600142.
- RAO, A.N., 1977. Tissue culture in the Orchid industry, in; Reniert. J. And Y.P.S. Bajaj. (Ed). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture.* 44-65. Springer Verlag New York.
- 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.
- Roy, A.R., Patel, A.S., Patel, V.V. and Deka, B.C. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex.Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae* 128(3):325-331
- 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.
- Smreciu, E.A., Currah, R.S., 1989. Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana*, (1)4:6-16.
- 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., 2004. *Bazı Orkide Türlerine Ait Tohumların Simbiyotik ve Asimbiyotik Olarak Çimlendirilmesi ve Fide Gelişimi* (yüksek lisans tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Sezik, E., Orchidaceae familyası bitkilerinin Türkiye’de yayılışı, TÜBİTAK II. Bilim Kongresi, 17-19 Kasım 1969, Ankara (1969).
- Sezik, E. ve ark., Salep ve Orkidelerin Tahribi, TÜBİTAK Projesi ,TBAG-Ç.SEK/23 (103T008), Ankara (2007).
- Sezik, E., 1984. *Orkidelerimiz, Türkiye’nin Orkideleri*. Sandoz Kültür Yayınları, No: 6, 166.
- Sezik, E., 2002. *Acta Pharmaceutica Turcica*. 44:151-157.
- Sezik, E. 1984. *Orkidelerimiz*, Sandoz Kültür Yayınları. No:6, 166s.
- Sezik, E., İşler, S., Orhan, Ç., Deniz, İ.G., Güler, N., Aybeke, M., Üstün, O. 2007. Salep ve Orkidelerin Tahribi. Tübitak Projesi, TBAG-Ç.SEK/23(103T008), Ankara.
- Sezik, E. 1967. Türkiye’nin Salepgilleri, Ticari Salep Çesitleri ve Özellikle Mugla Salebi Üzerinde Araştırmalar Doktora Tezi, "İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi.
- Sezik, E. 2012. Salep mi? Orkideler mi?, II.Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.37-44, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir
- Smreciu, E.A. and Currah, R.S. 1989. Symbiotic germination of eeds of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana*, 1(1):6-15.
- Singh, F., and Prakash, F. 1985. Suspension Culture Technique fort he Culture of Orchid Embryos, *Gartenbauwissnschaft*, 50 (5): 236-238.
- Stewart, L.S. and Kane, M.E. 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrstrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2):147-158.
- Tamer, E.C. 2012. Salep ve Bileşiminde Yer Alan Hidrokolloidlerden Glukomannan’ın Özellikleri, II.Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.25-30, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.

- Tutar, M., A.O. Sarı, A. Bilgiç, F. Çiçek, 2011. Salep Orkidelerinin Tarla Şartlarında Yetiştirilme Olanakları, Türkiye IX. Tarla Bitkileri Kongresi, 1235-1240, Bursa.
- Tutar, M. Sarı, A.O., Çiçek, F., ve Yıldız, Ö. 2012. Ege Bölgesi'nde Salep Olarak Toplanan Belli Başlı Orkideler, II. Salep Orkidesi Çalıştayı, ss.145-156, 25-26 Nisan, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- 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.
- Valletta, A., Attorre, F., Bruno, F., and Pasqua, G. 2008. In vitro asymbiotic germination of *Orchis mascula* L. *Plant Biosystems- An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 142(3):653-655.
- Vejsadova, H. 2001. Endangered Orchid conservation using In vitro Method. *Planta Europa Conference III*.
- Vejsadova, H. 2006. Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia Series*.
- Vujonoviç, V., Arnaud. M., ve Barabe, D. 2000. Viability Testing of Orchid Seed and the Promotion of Colouration and Germination, *Annals of Botany*, 86:(1) ss. 79-86.
- Waes, J. van. 1987. Effect Of Activated Charcoal On In Vitro Propagation Of Western European Orchids. *ISHS Acta Horticulturae 212: Symposium on In Vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants*.
- Watkinson, Jonathan I. 2002. Characterization of two genes, trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase and nucleotide binding protein, shown to be differentially regulated in roots of *Cypripedium parviflorum* var. *Pubescens* grown with a mycorrhizal fungus *Thanatephorus pennatus*. Chapter 1, Introduction: Biology of orchids and of orchid mycorrhizal interactions Dissertation Ph.D.
- Whitner 1974. *The Orchids*. J.Wiley, New York:1-604.
- Wotavova-Novotna, K., Vejsadova, H., and Kindlmann, P. 2007. Effects of sugars and growth regulators on in vitro growth of *Dactylorhiza* species. *Biologia Plantarum*, 51(1): 198-200.
- Yararbaş, R.T., 2008. *Bazı Orkide Türlerinin In Vitro Koşullarda Çoğaltılması, Çiçeklenmesi* (doktora tezi). E.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir.
- Zettler, L.W. 1994. Symbiotic seed germination of *Platanthera integrilabia* (Correll)
Luer, an Endangered Terrestrial Orchid. Ph. D. Dissertation, Clemson University, Clemson, SC.
- Zettler, L.W., 1997. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. *Selbyana*, 18(2):1188-194.

ÖZGEÇMİŞ

DUYGU AĞAR
duygu_agar@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2018	Ziraat Fakóltesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2008-2013	Ziraat Fakóltesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya