

Ege Bölgesi'nde Doğal Yayılış Gösteren *Orchidaceae* Familyasına Ait Bazı Türlerin *In Vitro* Koşullarda Üretimleri Üzerinde Araştırmalar*

Kubilay ÖNAL

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Menemen, İzmir - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 17.12.1997

Özet : Ege Bölgesinde yapılan sürveyler sonucunda *Orchidaceae* familyasına giren, *Orchis*, *Ophrys*, *Dactylorhiza*, *Serapias*, *Aceras*, *Anacamptis* cinslerine ait toplam 21 tür saptanmıştır. *In vitro* koşullarda yapılan ve değişik gıda ortamlarının kullanıldığı embriyo kültürlerinde *Orchis laxiflora* ve *Orchis sancta* ile *Serapias vomeracea* türlerinden olumlu sonuçlar alınmış, diğer türlerin ise gelişmedikleri belirlenmiştir. *Orchis laxiflora* ve *Orchis sancta* türlerine ait bitkilerde yumru oluşumunun +5 derece sıcaklık ve devamlı karanlık şartlarda daha yüksek oranda gerçekleştiği belirlenmiştir. *In vitro*'da iki türe ait oluşan yumruların toprağa transferinde (*in vivo*) en uygun zamanın ağustos ayı olduğu, ilkbahar aylarında yapılan transferde gelişen bitki oranının düşük olduğu gözlenmiştir.

In Vitro Propagation of Some Species From *Orchidaceae* Family Existing in The Natural Flora of Aegean Region

Abstract : A total of 21 species belonging to *Orchis*, *Ophrys*, *Dactylorhiza*, *Serapias*, *Aceras*, *Anacamptis* genera, *Orchidaceae* family, was collected from Aegean Region. *Orchis laxiflora*, *Orchis sancta* ve *Serapias vomeracea* were successfully cultured by means of embryo culture, but the other species did not grow. Tuber production rates of *Orchis laxiflora* and *Orchis sancta* were found to be higher in dark conditions at +5°C than normal conditions. For the same species successfully cultured, the optimum transfer time to the soil was august, while the percentage of developing plants was low in spring months.

Giriş

Taksonomik olarak monokotiledonlar içinde yer alan orkideler, *Orchidaceae* familyasına ait olup; yaklaşık 450 cins ve 20.000 tür içermektedir (1). Anadolu, Vavilov tarafından orijin merkezi olarak adlandırılan gen merkezlerinden Küçük Asya ve Akdeniz gen merkezlerinin sınırları içerisinde yer almasından dolayı çok zengin bir floraya sahiptir (2). Türkiye, ortakuşak orkideleri bakımından Avrupa ve Ortadoğunun en zengin ülkelerinden biridir (3). Türkiye'de *Orchidaceae* familyasına ait salebin dahil olduğu 24 cins ve 100 kadar tür saptanmıştır (4).

Salep, yumru lu orkidelerden elde edilmesine karşın tüm yumru lu cinsler bu amaç için uygun değildir. Daha çok *Orchis*, *Anacamptis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Himantoglossum*, *Barlia* gibi ovoid yumru lu olanlarla, *Dactylorhiza* gibi parçalı yumru ya sahip orkidelerin değişik türleri salep elde edilmesinde kullanılmaktadır. Son yıllarda *Platanthera* türlerinden de bazı bölgelerde salep elde edildiğine dair bilgiler bulunmaktadır (5).

Salep bitkisinin yumruları her yıl tek bir yavru yumru meydana getirmekte ve yeni yumru geliştikçe eski yumru yok olmaktadır. Bu nedenle, pek çok bitki türünde olduğu gibi üretim hızının düşük olması ve bilinçsiz yapılan sökümler sonucu salebin de nesli giderek tükenmektedir. Çoğalması güç ve yavaş olan bu bitkinin tüketimine yönelik bilinçsiz sökümlere rağmen günümüzde az da olsa bulunabilmesi, doğada çok az miktarda tohumun çimlenip yumru oluşturmaya bağlıdır.

Ülkemizde salep ile ilgili yapılan çalışmalar salep yetişen bölgelerdeki türlerin saptanması ve bazı kültüre alma çalışmalarıyla sınırlı kalmıştır (3, 6, 7, 8, 9).

Dünyada ise *Cymbidium* (10, 11), *Dendrobium* (12), *Cattleya* (13) cinslerine ait orkidelerde yapılan meristem kültürü çalışmaları, üretim çalışmalarına öncülük etmiştir.

İlk kez Knudson, orkide tohumlarının çimlenebilmeleri için kesin olarak ortamda mantarların olmasına gerek olmadığı kanısına varmış ve özel olarak hazırladığı ve çeşitli mineral maddeler ile şeker içeren gıda ortamında orkide tohumlarının çimlendirebilmiştir (14). *In vitro*

* Bu çalışmayı TÜBİTAK (Ankara) desteklemiştir (TBGAG-52).

koşullarda yapılan embriyo kültürlerine; endospermi olmayan orkide tohumlarının iyi bir örnek teşkil ettiğini ve bu konuda başarılı sonuçlar alındığını belirtmektedir (1, 15).

Pekçok araştırmacı orkide tohumlarının çimlenmesinde farklı gıda ortamlarının (16), büyüme regülatörlerinin (17), gıda ortamlarının fiziksel özelliklerinin (18) etkilerini araştırmışlardır.

Bu çalışma ile Ege Bölgesi'nde *Orchidaceae* familyasına ait doğal yayılış gösteren cins ve türlerin yapılan sürveyler sonucu belirlenmesine ve bu salep türlerinin *in vitro* koşullarda çoğaltılmalarına, yumru oluşturma oranlarının belirlenmesine ve en uygun toprağa aktarma zamanının saptanmasına çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Ege Bölgesi'nde yapılan sürveylerde belirlenen *Orchidaceae* familyasına ait bazı cins ve türlere ait bitkiler ve bunlardan alınan tohumlar ile taksonomik çalışmalar için gerekli herbaryum örnekleri bitkisel materyali oluşturmuştur. Laboratuvar araç ve gereçleri olarak ta doku kültürü laboratuvarı ve gıda ortamları kullanılmıştır.

Arazi çalışmaları

Survey-Herbaryum Hazırlama: Literatür bilgileri ve yapılan anketlere göre salep bitkisinin Ege Bölgesi'nde doğal olarak yayıldığı belirlenen yerlere 1993 yılında çiçeklenme zamanı olan nisan-mayıs aylarında survey programları düzenlenmiştir. Bu surveylerde belirlenen örneklerin herbaryumları teşhise imkan verecek şekilde alınmış, fotoğraf ve slaytları çekilmiştir. Belirlenen örneklerin tür teşhisleri yapılmıştır. Teşhiste Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve Dokuz Eylül Üniversitesi herbaryum koleksiyonlarından yararlanılmıştır. Her örnekten bir miktar bitki, doğadan yumrusu ile birlikte sökülerek kuruluşa getirilmiş ve saksılara dikilmiştir.

Tohum Örneklerinin Alınması: Ege Bölgesinde belirlenen ve denemeye alınan farklı türlerin tohum kapsülleri florada yetiştiği lokasyonlardan ve saksılara dikilmiş bitkilerden mayıs, haziran ve temmuz aylarında alınmıştır. Laboratuvar koşullarında kurutulan kapsüllerden tohumlar çıkarılıp cam kavanozlara konulmuş ve kullanılıncaya kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir.

In-vitro Çalışmaları

Embriyo kültürü

Sterilizasyon: Tohumlar endosperm ihtiva etmedikleri ve toz gibi bir yapıya sahip oldukları için filtre kağıtlarından yapılan ufak paketlerde % 0,6 sodyum hipoklorit içinde 15-20 dakika tutularak sterilize edilmişlerdir. Bunun arkasından üç kez steril saf su ile çalkalanmışlardır (8).

Gıda Ortamı: Kültür ortamları olarak Knudson (KC) (19) ve Van Waes-Debergh (WD) (20) temel ortamları kullanılmıştır. Gıda ortamlarına, %10-20 patates ekstraktı (P), %10-20 muz ekstraktı (M), %10 hindistan cevizi sütü (CM), 0,2 mg/lit giberellik asit (GA3), 1,0 mg/lit Benzilamino purin (BAP) ilave edilmiş ve toplam 14 farklı gıda ortamı kullanılmıştır. 8 g/l agar ilave edilerek sertleştirilen gıda ortamlarının pH'sı 5,8'e ayarlanmıştır (Tablo 1).

Çevre koşulları: *In vitro* çalışmalarında amaca göre 24°C sıcaklık, 16 saat/gün aydınlık (3000 lüks), 5°C sıcaklık ile devamlı karanlık ışık rejimleri uygulanmıştır.

Kültür yapımı: Sterilize edilmiş 28 ml'lik cam şişelere 10 ml gıda ortamı dökülmüştür. Her ortam için 5 tekerrür (şişe) yapılmıştır. Her gıda ortamı kombinasyonu için her bir türden 5 mg tohum kullanılmıştır. Bu 5 mg tohum 5 eşit kısma ayrılarak filtre kağıtlarına yerleştirilmiş ve yukarıda belirtilen esaslara göre sterilize edilmiştir. Sterilizasyon bittikten sonra tohumları içeren filtre kağıtları bir pensle su içinden steril bir petri kabına aktarılıp, burada uçları kesilerek kağıtlar açılıp gıda ortamı bulunan şişelere yerleştirilmiştir. Kültürlerin gelişmeleri devamlı olarak izlenip, başlangıçtan itibaren çimlenme, sürgün ve kök gelişme dönem ve durumları, birim ağırlıktaki tohumdan kaç bitki oluştuğu belirlenmiştir.

Çimlenen kültür oranı (%): Beş tekerrürlü (5 şişe) olarak kurulan denemede çimlenme görülen şişe sayısının toplam sayıya oranı olarak belirlenmiştir.

Bitki oluşturan kültür oranı (%): Kültür yapılan beş şişede çimlenen ve daha sonra bitki oluşturan şişelerin sayısının başlangıç kültür sayısına oranı olarak bulunmuştur.

Gelişen bitki sayısı (adet/mg): Bitki oluşan tekerrürlerdeki bitkiler sayılmıştır.

Ortalama sürgün boyu (cm): Oluşan bitkilerin boyu ölçülerek ortalaması alınmıştır.

Tablo 1. *In vitro*'da kullanılan temel besin ortam içerikleri.

Kimyasallar	Ortam (mg/l)	
	Knudson C	VanWaes&Debergh
Makroelementler		
NH ₄ NO ₃	-	370
(NH ₄) ₂ SO ₄	500	60
KH ₂ PO ₄	250	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1000	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	100
Mikroelementler		
Na-EDTA	-	27
FeSO ₄ ·7H ₂ O	25	37.3
MnSO ₄ ·4H ₂ O	7.5	25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	10
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	0.0025
H ₃ BO ₃	-	10
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	-	0.025
Aminoasitler		
L-Glutamin	-	100
Vitaminler		
Nikotinik Asit	-	2
Piridoksin-HCl	-	0.50
Thiamine-HCl	-	0.50
Biotin	-	0.05
Myo-Inositol	-	1000
İlaveler		
Hindistan Cevizi Sütü	-	200 ml
Sakkaroz	20000	20000
Agar Technical (OXOID)	%0.8	%0.8
pH	5.8	5.8

Uygun gıda ortamlarının belirlenmesi: Kültür yapılan tüm ortamlarda elde edilen sonuçlar; çimlenen kültür yüzdesi, bitki oluşturan kültür yüzdesi, gelişen bitki sayısı ve ortalama sürün boyu değerleri, birlikte dikkate alınarak en uygun gıda ortamları belirlenmiştir.

Işık uygulaması: Bitkilerin sürgün ve kök gelişmeleri belirli bir iriliğe gelince (sürgün 3-4 cm) yumru oluşturmak için iki farklı çevre koşulu denenmiştir. *In vitro*'da elde edilen ve %10 patates ekstraktı içeren KC gıda ortamında tutulan bitkilerin yarısı normal gelişme koşullarında (24°C ve 16 saat/gün ışık), diğer yarısı da 5°C sıcaklık ve devamlı karanlık koşullara aktarılmıştır. Kültürler her 15 günde bir gözlenerek her koşulda oluşan yumru miktarları belirlenmiştir.

Toprağa aktarma: Bu çalışmalar farklı denemeler şeklinde yürütülmüştür.

Deneme 1: *In vitro*'da elde edilen yumruların toprağa aktarılma durumunda süren, gelişen kültür yüzdesini belirlemek için yumrular, mart ayında toprağa aktarılmış ve gelişen yumru yüzdeleri belirlenmiştir.

In vitro'da oluşan yumruların toprağa aktarılması için en uygun dönemi belirlemek amacıyla farklı iki deneme yürütülmüştür.

Deneme 2: Ağustos ayında, 5°C sıcaklık ve devamlı karanlık koşullarda *in vitro*'da elde edilen 90 adet yumru üç gruba ayrılmıştır. 1. grup: 7 cm çapındaki saksıların her birine birer yumru dikilmiştir. 2. grup: Yumruları içeren tüpler 24°C sıcaklık ve 16 saat/gün aydınlık olan normal gelişme koşullarına alınmıştır. 3. grup: Yumruları içeren tüpler 5°C sıcaklık ve devamlı karanlık koşullara alınmıştır. Bu koşullarda tutulan kültürler mart ayından itibaren aşağıdaki programa göre toprak ve *in vitro*'da normal gelişme koşullarına aktarılmıştır.

Mart ayı başında, 5 yumru saksılara, 5 yumru da normal *in vitro* koşullara aktarılmıştır.

- Mart ayı ortası ve nisan ayı başında da aynı işlemler yapılmıştır.

Her uygulamada; gelişen, süren yumru miktarları belirlenmiştir (yüzde olarak).

Deneme 3: *In vitro*'da elde edilen yumrular, kasım-nisan ayları arasında her ay toprağa (saksılara) aktarılmış ve her dönemde süren yumru %'si belirlenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Arazi çalışmaları

Ege Bölgesi'nde nisan-mayıs aylarında yapılan sürveylerde *Orchidaceae* familyasından *Orchis* cinsine ait 7 (*Orchis italica* Poir., *Orchis anatolica* Boiss., *Orchis sancta* L., *Orchis papilionacea* L., *Orchis laxiflora* Lam., *Orchis morio* L., *Orchis mascula* L.spp. *pinetorum* Boiss. et. Kotschy); *Ophrys* cinsine ait 9 tür (*Ophrys mammosa* Desf., *Ophrys reinholdii* Fleischm. spp. *reinholdii*, *Ophrys lutea* Cav. spp. minor O. et. E. Danesh., *Ophrys halosericea* (Burm.fl.) Greuter., *Ophrys bornmulleri* M. Schulze, *Ophrys ferrum-equinum* Desf., *Ophrys umbilicata* Desf. spp. *umbilicata*, *Ophrys speculum* Link., *Ophrys fusca* Link.); *Serapias* cinsine ait 2 tür (*Serapias vomeracea* Briq. ve *Serapias vomeracea* (Burm.fil) Briq.

spp. *laxiflora* (Soo) Gözl et. Reinhard) ile *Aceras antropophurum* (L.) R.Br., *Anacamptis pyramidalis* L., *Dactylorchiza romano* (Seb.) Soo. türlerinin varlığı belirlenmiştir.

***In-vitro* çalışmaları**

Embriyo kültürü

Ele alınan dokuz türden (*Orchis laxiflora*, *Orchis sancta*, *Serapias vomeracea*, *Orchis anatolica*, *Orchis italica*, *Aceras antropophurum*, *Anacamptis pyramidalis*, *Dactylorchiza romano*, *Ophrys umbilicata*) sadece üç türde (*O.laxiflora*, *O.sancta* ve *S.vomeracea*) olumlu sonuç alınmış, diğer türlerin kullanılan gıda ortamlarının hiç birinde gelişmedikleri saptanmıştır. Bu türlerin tohumlarında; her gıda ortamında çimlenmeye kadar geçen süre, çimlenen kültür yüzdesi, çimlendikten sonra gelişmesine devam edip bitki oluşturan kültür yüzdesi, 1,0 mg tohumdan elde edilen bitki sayısı, kültüre başlangıçtan yaklaşık bir yıl sonra oluşan bitkilerin ortalama boyları Tablo 2'de gösterilmiştir. Tüm gıda ortamlarında *O. sancta* 1 ayda, *S.vomeracea* 2,5 ayda, *O.laxiflora* ise 3 ayda çimlenmişlerdir. *O.laxiflora*'da genelde Knudson C ortamına ait kombinasyonlar Van Waes-Deberg ortamlarına göre daha iyi sonuç vermiştir. 1 mg tohumdan elde edilen bitki sayısı diğer kombinasyonlara göre düşük olmasına (21,8 adet/mg) rağmen, yapılan kültürlerin % 80'inde bitki gelişmesi ve oluşan bitkilerde sürgün ve kök gelişmesinin de daha iyi olması nedeniyle en iyi sonucu % 10 patates ekstraktı içeren KC ortamı vermiştir. Bunu % 20 P ve %10 M içeren KC ortamları izlemiştir. 0,2 mg/l GA3 ve 1,0 mg/l BAP içeren ortamlarda ise hiç bir gelişme olmamıştır.

O.sancta'da da genelde yine KC gıda ortam kombinasyonları WD ortam kombinasyonlarına nazaran daha iyi sonuç vermiştir. Bu türde en iyi sonuç % 20 ve %10 patates ekstraktı içeren KC ortamlarında elde edilmiştir.

Çimlenen kültür yüzdesi, bitki geliştiren kültür yüzdesi ve gelişen bitkilerin sürgün boyları birlikte değerlendirildiği zaman, % 10 patates ekstraktı içeren KC ortamının diğer kombinasyonlardan daha iyi olduğu belirlenmiştir. GA3 ve BAP içeren KC ortamlarında az da olsa çimlenme ve bitki gelişmesi olmasına rağmen oluşan sürgünler GA3 içeren ortamda renksiz ve cılız, BAP'lı ortamda ise cılız ve kararlı bir yapı göstermiştir.

S.vomeracea türünde ise gelişme genelde iki türe (*O.laxiflora* ve *O.sancta*) nazaran daha düşük olmuştur.

Bu türde en iyi sonucu % 10 ve % 20 muz ekstraktı içeren KC ortamı vermiştir. Diğer türlerde iyi sonuç veren patates ekstraktı ortamlar bu türde iyi sonuç vermemiştir.

Doğadan tohum alınamayan, ancak yumruları sökülerek kuruluşa getirilip saksılara dikilen; *Ophrys fusca*, *Ophrys speculum*, *Ophrys lutea* spp. minor, *Orchis mascula* spp. *pinetorum* türlerinden ikinci yıl alınan tohumlarla bir deneme kurulmuştur. Ancak bu türlerde önceki sonuçlar dikkate alınarak sadece Knudson C ortamının %10 patates ekstraktı, %10 muz ekstraktı ve %10 Hindistan cevizi sütü içeren üç kombinasyonu kullanılmıştır. *Ophrys fusca* türünde her üç ortamda da ekilen tohumlarda kabarma olmuş, ancak çimlenme ve gelişme olmamıştır. Diğer üç türde de hiç bir gelişme gözlenmemiştir.

Işık uygulaması

Başlangıçtan 11 ay sonra 1 mg tohumdan elde edilen bitki sayıları Tablo 3'te gösterilmiştir. Işık rejiminin etkisi türlere göre değişmektedir. *O.laxiflora*, *O.sancta* türlerinde, 16 saat/gün aydınlık olan ortamda devamlı karanlık şartlara nazaran bitki gelişmesi daha fazla olmuştur. Karanlık şartlarda en iyi sonucu *Serapias vomeracea* türü vermiştir. Ancak karanlık şartlarda gelişme renksiz ve cılız olmaktadır. Bu nedenle çimlenip biraz gelişmeden sonra kültürlerin aydınlık şartlara aktarılması gerekmektedir.

Bu üç denemeden de elde edilen bulgular, ilk kez orkide tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlendirmeyi başaran Knudson (19)'un çalışmalarının yanı sıra, orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine gıda ortamlarının (16), hormonların (17), ve gıda ortamlarının fiziksel özelliklerinin (18) etkisini araştıran çalışmalarla paralellik göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, ışık rejiminin orkidelerde tohum çimlenmesine etki ettiği, örneğin *Cypripedium reginae* orkide tohumlarının karanlık şartlarda daha iyi çimlendiği belirlenmiştir (21).

Yumru oluşturma

Yumru oluşturma çalışmaları *O.laxiflora* ve *O.sancta* türleri ile yapılmıştır. *In vitro*'da elde edilen bitkilerin normal koşullar (24°C sıcaklık ve 16 saat/gün ışık) ile 5°C sıcaklık ve devamlı karanlık koşullarda tutulduğunda yumru oluşum durumları Tablo 4'de gösterilmiştir. %10 patates ekstraktı içeren KC gıda ortamında yapılan kültürlerden her uygulama için 40'ar adet tüp kullanılmıştır. Bitkiler 3-4 cm olunca (*O.laxiflora*'da

Türler	Gıda ortamı	Çimlenen kültür %'si	Bitki oluşturan kültür %'si	Gelişen bitki sayısı (adet/mg)	Ortalama sürgün boyu (cm)
<i>O.laxiflora</i>	KC 10P	80	80	21.8	7.4
	KC 20P	60	40	24.0	7.1
	KC 10M	60	40	42.7	5.3
	KC 20M	40	20	26.0	5.5
	KC 10CM	40	20	46.7	6.5
	KC 0.2GA3	gelişme yok	-	-	-
	KC 1BAP	gelişme yok	-	-	-
	VD 10P	40	40	10.0	2.5
	VD 20P	40	40	5.0	2.5
	VD 10M	40	20	13.0	4.5
	VD 20M	20	20	9.0	2.0
	VD 10CM	20	20	9.5	1.5
	VD 0.2GA3				
	VD 1BAP				
<i>O.sancta</i>	KC 10P	100	40	23.0	4.0
	KC 20P	80	20	49.5	1.5
	KC 10M	80	40	17.0	2.5
	KC 20M	60	40	16.7	1.5
	KC 10CM	40	20	12.0	0.5
	KC 0.2GA3	60	40	21.5	cılız
	KC 1BAP	20	20	8.0	kararma
	VD 10P	40	20	9.0	1.5
	VD 20P	40	20	1.7	0.5
	VD 10M	40	20	6.4	1.5
	VD 20M	20	20	14.0	0.4
	VD 10CM	20	20	12.3	0.7
	VD 0.2GA3	20	20	40.0	cılız
	VD 1BAP	20	20	11.4	kararma
<i>S.vomeracea</i>	KC 10P	20	20	7.3	1.5
	KC 20P	20	20	5.2	1.0
	KC 10M	40	40	8.8	1.7
	KC 20M	40	20	16.7	1.5
	KC 10CM	kabarma			
	KC 0.2GA3	20	20	15.5	0.8
	KC 1BAP	20	20	4.4	0.7
	VD 10P	kabarma			
	VD 20P	gelişme yok			
	VD 10M	20	20	5.2	0.5
	Vd 20M	20	20	4.1	0.5
	VD 10CM	kabarma			
	VD 0.2GA3	20	20	37.0	0.4
	VD 1BAP	20	20	12.6	0.4

Tablo 2. Farklı salep türlerinin *in-vitro* şartlarda değişik gıda ortamlarında gelişme durumları.

Tablo 3. Farklı ışık rejiminin salep türlerinde bitki gelişmesine olan etkileri.

Türler	Bitki sayısı adet/mg	
	Aydınlık	Karanlık
<i>O.anatolica</i>	Kabarma	2.6
<i>O.laxiflora</i>	25.5	2.8
<i>O.sancta</i>	28.3	15.6
<i>O.speculum</i>	Kabarma	5.4
<i>O.fusca</i>	Kabarma	4.0
<i>S.vomeracea</i>	8.8	24.8
<i>Oph.lutea minor</i>	Kabarma	7.4

başlangıçtan 9 ay, *O.sancta*'da 6 ay sonra) kültürlerin yarısı normal gelişme şartlarında tutulmuş, diğer yarısı da +5°C ve devamlı karanlık şartlara alınmıştır. Tablo 4'de görüldüğü gibi *O.sancta*'da normal şartlarda kültürlerin % 71,4'ü 316 günde yumru oluşturmuştur. Geri kalan kısımda 275-455 gün arasında değişik dönemlerde yumru oluşturmuştur. +5°C ve devamlı karanlıkta ise, 320 güne kadar kültürlerin toplam %94,5 (% 49,1+% 45,4)'inde yumru oluştuğu görülmüştür. Normal koşullarda ise hemen hemen aynı sürede kültürlerin toplam % 80,1 (% 71,4+% 4,6+% 4,1)'inde yumru

Türü	24. C°-16 saat/gün ışık		5 C° devamlı karanlık	
	Başlangıçtan yumru oluşuncaya kadar geçen süre (gün)	Yumru oluşumu (%)	Başlangıçtan yumru oluşuncaya kadar geçen süre (gün)	Yumru oluşumu %
<i>O.sancta</i>	316	71.4	320	49.1
	375	8.0	290	45.4
	365	6.6	395	4.4
	283	4.6	455	1.1
	425	4.6	-	-
	275	4.1	-	-
	455	0.7	-	-
<i>O.laxiflora</i>	330	65.5	332	65.4
	300	17.2	325	28.2
	340	9.1	340	6.4
	360	8.2	-	-

Tablo 4. *O.laxiflora* ve *O.sancta* türlerinin farklı koşullarda yumru oluşturma durumu.

oluşturmuştur. +5°C ve devamlı karanlık şartlarda yumru oluşturma daha dengeli olduğu görülmektedir.

O.laxiflora türünde ise normal gelişme şartlarında kültürlerin % 65,5'inde 330 günde yumru oluşmuştur. 300 günde yumru oluşturan % 17.2 miktarı da ilave edildiğinde, 330 güne kadar kültürlerin toplam 82,7'sinde yumru olduğu görülmektedir. +5°C ve devamlı karanlıkta ise, 332 güne kadar kültürlerin toplam % 93,6 (% 65,4 + % 28,2)'sinin yumru oluşturduğu görülmüştür.

Her iki türde de 5°C ve devamlı karanlık şartlarda yumru oluşmasının daha yüksek oranda ve dengeli bir şekilde olduğu belirlenmiştir.

Toprağa aktarma

Deneme 1: *In vitro*'da elde edilen *O.sancta* ve *O.laxiflora* türlerine ait 25 adet yumru mart ayı başında saksılara aktarılmıştır. 7 cm çapında olan saksılara 1:1:1 oranında kum: bahçe toprağı: organik gübre'den oluşan steril harç konulmuştur. Yapılan gözlemlerde *O.sancta*'da % 9,1; *O.laxiflora*'da % 12,9 sürme olduğu saptanmıştır.

Deneme 2: *In vitro*'da normal gelişme koşullarında yumruların % 74,2'si 82 gün sonra, ağustos ayında toprağa aktarılan yumruların % 81,2'si 77 gün sonra sürmüştür. 5°C ve devamlı karanlık şartlarda tutulan yumrular mart ayından itibaren toprak ve *in-vitro* normal gelişme koşulların alınmış, her üç dönemde (mart ayı başı, mart ayı ortası ve nisan ayı başı) toprağa aktarılan yumruların hiç birinde sürme olmamıştır. *In-vitro* normal gelişme koşullarında ise; mart ayı başında % 30,4; mart ayı ortasında % 16,6; nisan ayı başında % 14,3 oranında kültürlerde gelişme olmuştur.

Deneme 3: Toprağa aktarmaya ilişkin yapılan bu denemelerde *O.sancta* ve *O.laxiflora* türleri aynı sonuçları verdiği için sonuçlar bunların aritmetik ortalamaları üzerinden verilmiştir. Kasım-nisan ayları arasında toprağa aktarmada sürme yüzdeleri; kasımda 5,6; aralıkta 0,7; ocakta 2,2; şubatta 2,0; martta 4,3; nisanda 14,6 olmuştur.

Her iki denemede de görüldüğü gibi ağustos ayında gerek toprağa aktarılan ve gerekse *in vitro*'da normal şartlara aktarılan yumrular sırasıyla % 81,2 ve % 74,2 oranında sürmüştür. Soğukta tutulan (6 ay) yumrular direkt olarak toprağa aktarıldığında ise hiç gelişmemiş, normal *in vitro* koşullarında ise % 14,3-30,4 oranında sürme göstermiştir. Kasım-nisan ayları arasında toprağa transfer edilen yumrulara ise düşük bir gelişme belirlenmiştir (% 0,7-% 14,6).

Orkide tohumları endosperm içermemektedir ve embriyoları farklılaşmamış 80-100 hücreden meydana gelmiştir (22). Bu nedenle doğada çimlenebilmeleri için simbiyotik yaşam kurabilecekleri funguslara gereksinim duyarlar (23). Ancak *in vitro* üretim yöntemlerinin kullanılmasıyla mikorizal funguslara gereksinim duymadan da çoğalabilirler (24). *Himantoglossum affine* türü ise hiç bir ortam kombinasyonunda çimlenme göstermemiştir. Arditti ve ark. (25), araştırmalarında bir tür için başarılı olarak bulunan bir yöntemin diğer türlere uygulanmadığını hatta bir bölgeden toplanan orkide tohumlarına uygulanan yöntemlerin başka bölgeden toplanan aynı türe ait tohumlara uygulandığında bile aynı sonucun alınmadığını bildirmişlerdir.

Sonuç

Bölgede survey çalışmaları sırasında yapılan gözlemler ve gerekse yöre halkıyla yapılan söyleşilerde salep bitkisinin bilinçsiz sökümler sonucu gittikçe azaldığı ve bir çok türün zorlukla bulunabildiği saptanmıştır.

Bu çalışma nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olan gıda ve ilaç hammaddesi olarak son derece önemli bir ürün durumundaki salep orkidelerinin üretimine olanak sağlayacak bulguları yansıtması açısından önemlidir. Bu tür çalışmaların devam etmesi, daha uzun bir zaman diliminde pratiğe aktarılan sonuçların alınması ülke ekonomisine büyük ölçüde katkıda bulunacağı gibi doğanın korunması açısından da önemlidir.

O.laxiflora, *O.sancta* türlerinden alınan tohumların patates, muz ekstraktı ve hindistan cevizi sütü içeren Knudson C gıda ortamlarında aynı maddeleri içeren VD ortamlarına nazaran daha iyi geliştiği, *O.laxiflora* türünde %10 patates ekstraktı içeren KC ortamında 1 mg tohumdan elde edilen bitki sayısının diğer kombinasyonlara göre daha az olmasına rağmen, bitki gelişmesinin (sürgün ve kökleri itibarıyla) iyi olması nedeniyle en iyi sonucu verdiği, *O.sancta* türünde de çimlenen ve bitki geliştiren kültür yüzdesinin % 10 P içeren KC ortamında yüksek olduğu, GA3 ve BAP'lı ortamlarda ise sürgünlerin renksiz ve cılız olduğu, *S.vomeracea* türünde ise çimlenme oranının diğer türlere nazaran düşük olmasına rağmen en iyi sonucun % 10 ve % 20 muz ekstraktı içeren KC ortamlarından alındığı belirlenmiş, denemeye alınan diğer türlerden ise olumlu bir sonuç alınamamıştır.

Yapılan birçok çalışmada ışık rejiminin orkidelerde tohum çimlenmesine etki ettiği, örneğin *Cypripedium reginae* orkide tohumlarının karanlık şartlarda daha iyi çimlendiği belirlenmiştir (21). Bu çalışmada da *O.laxiflora* ve *O.sancta* türleri tohumlarının çimlenmesinde 16

saat/gün aydınlık ışık rejiminin devamlı karanlığa nazaran daha iyi sonuç verdiği *S.vomeracea* türünde ise devamlı karanlıkta tohum çimlenmesinin ışık rejimine nazaran daha iyi olduğu, ancak sürgünlerin renksiz ve cılız gelişmesi nedeniyle, çimlenmenin hemen sonrasında ışığa geçirilmesi gerektiği gözlenmiştir. *O.sancta* ve *O.laxiflora* türlerinde aydınlık ve devamlı karanlık ışık rejimlerinde de yumru oluşabildiği ancak devamlı karanlığın daha iyi olduğu saptanmıştır.

In vitro koşullarda salep üretimi (bitki ve yumru) için kullanılacak gıda ortamlarının, hormon konsantrasyonlarının ve çevre faktörlerinin her tür için değişebileceği ve bu nedenle her tür için ayrı ayrı çalışma yapılması gerektiği, yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi, bu deneme ile de varılan sonuçlardan birisidir.

In vitro'da oluşan yumruların toprak şartlarına (*in vivo*) aktarılması için en uygun zamanın ağustos ayı olduğu, ilkbahar aylarında (mart-nisan) yapılan transferlerde gelişen kültür oranının düşük olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca bu çalışma ile *Orchis* cinsine ait iki türde *in vitro* koşullarda yumru üretiminin gerçekleştirilebileceği gösterilmiştir. Laboratuvar tekniklerinin geliştirilmesi ile salep yumrularının ekonomik anlamda kitle üretimlerinin gerçekleştirilmesi mümkün olabilecektir. Böylece gıda ve ilaç sanayine hammadde sağlamak için doğanın tahrip edilmesi yerine *in vitro* yumruların kullanma olanağı doğacaktır.

Teşekkür

Tür teşhisinde katkılarından dolayı Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr.Mahmure Nakiboğlu'na teşekkür ederim.

Kaynaklar

1. Rao, A.N., Tissue Culture in the Orchid Industry. In: Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. (Ed) Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 44-65. Springer Verlag, New York. 1977.
2. Vavilov, N.I., The Origin, Variation, Immunity and breeding of Cultivated Plants, Chron. Bot., 13: 1-364, 1951.
3. Baytop, T. ve Sezik, E., 1968. Türk salep çeşitleri üzerine araştırmalar. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Mec. 4: 61-68, 1968.
4. Sezik, E., Türkiye'nin Orkideleri. Bilim ve Teknik Dergisi, 23: 269, 5-8, 1990.
5. Sezik, E., Orkidelerimiz, Sandoz Kültür Yayınları. No: 6: 166, 1984.
6. Gönülşen, N., Salep bitkilerinden *Orchis anatolica* Boiss.'in doku kültürleri ile üretimi. EBZAE. Yayınları No: 28, 1983.
7. Özkoç, İ. ve Dalcı, M., Bazı orkide türlerine ait tohumların çimlenmesi üzerine yüzeysel sterilizasyonda kullanılan sodyum hipoklorit etkisi. Ondokuz Mayıs Üniv., Fen Dergisi 3(1): 116-122, 1991.

8. -. İki farklı kültür ortamında *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Brig. Subsp. *Laxiflora* (500) Gözl et. Rein hard (*Orchidaceae*) tohumlarının çimlenme ve gelişmesi üzerine bazı fungusların etkisi. Doğa-Tr. J. Of Biology 16, 158-164, 1992a.
9. -. İki farklı kültür ortamında *Orchis laxiflora* Lam. (*Orchidaceae*) tohumlarının çimlenme ve gelişmesi üzerine bazı fungusların etkisi. Doğa-Tr.J. of Biology 17: 23-28, 1992b.
10. Morel, G., M., A News Means of Clonal Propagation of Orchids. Amer. Orch. Soc. Bull. Dec. 1077-1080, 1964.
11. Sagawa, Y., Shaji, T. and Shaji T., Clonal Propagation of *Cymbidiums*. Through Shoot Meristem Culture., Amer. Orch. Soc. Bull., Feb, 118-122, 1966.
12. Kim, K.K., Kunisaki, T. and Sagawa, Y., Shoot-tip Culture of *Dendrobiums*. Amer Orch. Soc. Bull., Dec, 1077-1080, 1970.
13. Lindemann, E.G.P., Guckel, J.E. and Davidson, O.W., Meristem Culture of *Cattleya*. Amer. Orch. Soc: Bull., Nov, 1002-1004, (1970).
14. Knudson, L., Physiological investigations on orchid germination. Proc. Congr. Plant Sci 2: 1183-1189, 1929.
15. Gönülşen, N., bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları. ETAE Yayınları, No: 78, 1978.
16. Oliva, A.P., and Arditti, B., Seed Germination of North American Orchids. II. Native California and Related Species of *Aplectrum*, *Cypripedium* and *Spiranthes*. Bot. Gaz., 145 (4): 495-501, 1984.
17. Jong-Suk and Sin-Sup., Effect of NAA and BA on Dark Culture of *Cypripedium Virescens* Rhizom In Vitro, 11, 1985.
18. Singh, F., Prakah, F., Suspension Culture Technique for the Culture of Orchid Embryos, Gartenbauwissnschaft, 50 55): 236-238, 1985.
19. Knudson, L., 1951. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Amer. orchid. Soc. Bull. 14, 214-217, 1951.
20. Vanwaes, J.M., and Debergh: P.C., The impact of meristem propagation of orchids. In: Corrigan, M.J.G. (Ed): Proc. & th World Orchid Conf., 107-110, 1986.
21. Harvais, G., Growth requirement and development of *Cypripedium reginae* in axenic culture. Can J. Bot., 51: 327-332, 1972.
22. Arditti, J., Factors affecting of orchid seeds. Bot. Rev. 33, 1-97, 1967.
23. Ingold, C.T. and Hudson, H.J., 1993. The Biology. Sixth edition Chapman Hall. London, 224 pp. 1993.
24. Ruplup, A., Chavez, V. and Martinez, A., *In vitro* seed germination and reintroduction of *Bletia urbana* (*Orchidaceae*) in its natural habitat. Lindleyana. 4:2, 68-73, 1989.
25. Arditti, J., Michaud, J.D. and loiva, A.P., Seed germination of North American Orchids. I. native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera* Bot. Gaz. 142: 4, 442-453, 1981.