



## *Orchis sancta L.* tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlenme, protokorm oluşumu ve bitkiye dönüşümü üzerine araştırmalar



### Germination, protocorm body formation and plantlet regeneration from *Orchis sancta L.* seeds *in vitro*

Hamdi Kamçı, Behiye Karakuş

Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 46500 Kahramanmaraş

#### MAKALE BİLGİSİ

Geliş Tarihi: 7 Şubat 2015  
Revizyon Tarihi: 11 Mart 2015  
Kabul Tarihi: 22 Mart 2015  
Elektronik Yayın Tarihi: 30 Aralık 2015  
Basım: 20 Ocak 2016

#### ÖZET

Bu çalışmada *Orchis sancta L.* orkidelerinin *in vitro* koşullarda çimlenme, protokorm oluşumu ve bitkici krejenerasyonunu etkileyen faktörler araştırılmıştır. Aseptik *in vitro* kültür sırasında gözlemlenen yoğun kontaminasyon nedeniyle tohumların yüzey sterilizasyon için bildiğimiz kadarıyla daha önce denenmemiş ön (sterilizasyon öncesi) protokolü oluşturulmuştur. Arkasından optimize edilen yüzey sterilizasyonunda, maksimum canlılık ve minimum kontaminasyon hedeflenmiştir. Aseptik *in vitro* kültürün sürdürülebilmesi için besiyerlerine 0,02 % AgNO<sub>3</sub> eklenmiştir. Temel besiyeri kompozisyonunda orkide doku kültüründe kullanılmakta olan basit inorganik tuzlar seçilmiştir. Çimlenme ve protokorm oluşumu süresince bu besiyeri farklı azot kaynaklarıyla (Trypton, maya özütü, kaseinhidrolizat, aminoasit solüsyonu) desteklenmiştir. Çimlenme ve protokorm oluşturma oranları tohum ekiminden 10 gün, 30 gün ve 50 gün sonra alınan verilere göre değerlendirilmiştir. Bu çalışmada *Orchis sancta* % 47 ile en yüksek protokormu 1 gr tripton içeren T1 ortamından sağlamıştır. Elde edilen protokormlar, daha sonra tripton içeren ve iki farklı organik substratla desteklenen bitki büyüme besiyerine alınmıştır. Bitki büyüme besiyerine transfer edilen *O. sancta* protokormları, yaklaşık bir ay sonra %96 verimle ortalama 5-7 cm uzunluğunda bitkicik haline dönüştürülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Orkide, *in vitro*, Çimlenme, Besin ortamı

#### ABSTRACT

In this study factors affecting the germination, protocorm body formation and plantlet regeneration of *Orchis sancta* were investigated. Due to intense contamination occurring following *in vitro* conditioning of surface sterilized *O. sancta* seeds, a preparatory step was devised and this step is unique in that, to our knowledge such step has not been formulated yet in any other previous work. Following this preparatory step a surface sterilization method practiced, aiming minimum contamination and maximum viability during *in vitro* culture. For maintaining this aim and as continuing step of surface sterilization, germination media was seeded with 0.02% (w/v) AgNO<sub>3</sub>. The basic culture media composition included simple inorganic salts that are being used readily for orchid culture *in vitro*. During germination and protocorm body formation this basic culture media composition was supplemented with various types and concentrations of nitrogen sources. Germination and protocorm formation scores were arbitrarily taken at 10, 30 and 50 days. According to the results, in this work, *O. sancta* protocorm formation was maintained at highest rate (47%) in tryptone containing media. These protocorms later on were transferred to plantlet regeneration media that is fortified with two organic substrates. Approximately 1 month later, *O. sancta* protocorms transferred to plantlet regeneration media were converted to 5-7 cm long small plantlets where conversion rate was as high as 96%.

**Keywords:** Orchid, *in vitro*, Germination, Nutrient media

## 1. Giriş

Tür sayısı bakımından çiçekli bitkilerin en geniş familyalarından biri olan *Orchidaceae* familyasının dünya üzerinde yaklaşık 600-800 cins ve 30 000 -35.000 kadar türü vardır [1,2]. Son yapılan araştırmalara göre ise bu sayıya ek olarak familyaya 9 cinse ait 46 türün daha katıldığı bildirilmiştir [3]. Yurdumuzda ise % 13'ü endemik olmak üzere, toplam 150 adet orkide türü olduğu belirtilmektedir [4]. Epifit orkide türleri tropik iklimlerde iri kök sistemleri ile ağaçlara tutunarak yetişmektedirler. Ilıman kuşak veya karasal orkideler olarak bilinen türler ise genellikle yoğun organik madde ve humus barındıran topraklarda yetişmektedirler. Karasal orkidelerin kök yapısı epifit orkidelere benzemekle beraber bazı türleri salep yapımında kullanılan ve vejetatif büyümeyi sağlayan yumrulara sahiptirler. Yumrular genellikle birbirine yapışık ve iki adet olarak bulunur. Gelişen bitki ile beraber çiçeklenme döneminde büyüyen taze yumru salep hammaddesi olarak kullanılır [5].

Orkide türlerinde çimlenmeden sonra yaprak ve yumru oluşumu, uzun yıllar almaktadır. İlk yaprak oluşumu, en kısa ortalama ile 2-4 yıl sürdüğü kaydedilmiştir. İlk yumrunun *Spiranthesaestivalis* türünde 9 yıl, ilk çiçeğin *Neottia* türlerinde 9-12 yılda oluştuğu bildirilmiştir [5]. Çoğalma kapasiteleri son derece sınırlı olan ve endosperm taşımayan salep orkide tohumlarının çimlenebilmesi için uygun sıcaklık, ışık, nem ve oksijenin yanısıra, ortamda uygun bir mikorizalfungusilesim biyotik bir ilişki oluşturabilmesi gerekmektedir [5]. Orkide tohumlarının besin rezervleri içermemelerinden dolayı, dışarıdan bir karbonhidrat kaynağı sağlanmadıkça başarılı bir çimlenme gerçekleşmediği belirtilmektedir [6].

Anadolu'da yetişen iki yumrulu salep orkidesi doğal ortamında yeni sezon vejetasyonuna ergin bir yumruyla başlamakta ve vejetatif sezonunda sonraki sezon için yavru yumruyu geliştirmektedir. Bir ton salep elde edilmek için yumrunun büyüklüğüne göre 625000 ile 4762000 adet arasında yumru kullanılmaktadır [7].

Bu çalışmada *Orchissancta* L. salep orkidesinin *in vitro* ortamda farklı azot kaynağı içeren besiyerlerinde çimlenme, protokorm ve bitkicik oluşumu araştırılmış ve ileride çalışılacak olan mikro-çoğaltım yöntemlerinin altyapısı oluşturulmuştur.

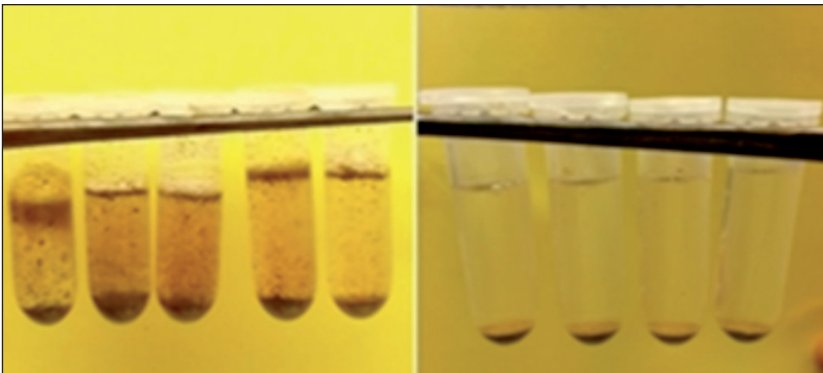
## 2. Gereç ve Yöntem

Araştırmada kullanılan *Orchis sancta* L. salep orkidesi tohumlarının *in vitro* koşullarda kültüre alınması ve bitkicik elde edilmesi aşamalarının tümü 2013-2015 yılları arasında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kullanılan bitki tohumları Ege Tarımsal Araştırma Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

### 2.1. Orkide Tohumlarının Hazırlanması, Yüzeysel Sterilizasyonu ve Ekimi

Tohumlar yüzeysel sterilizasyonuna alınmadan önce yüzeysel gerilimlerinin düşürülmesi ve mumsu tohum tabakasından arındırılması için birtakım ön hazırlık işlemlerine tabi tutulmuşlardır. Ön işlem sırasında yaklaşık 4 mg orkide tohumu 2 ml mikrofij tüpü içerisinde muamele edilmiştir.

Bu işlem sırasında öncelikle tohumların üzerine 400 µl %80 (v/v) gliserol eklenmiştir ve bir dakika boyunca tohumlar vortex-mixerde maksimum rpm'de karıştırılmışlardır. Hemen ardından gliserol tohum karışımına 150 µl %70 (v/v) etanol ve 1-2 damla Tween-20 eklenmiştir ve tohumlar bir dakika daha vortex-mixerde maksimum rpm'de karıştırılmışlardır. Daha sonra bu karışımın üzerine 400 µl saf su eklenip anlık olarak yine vortex-mixerde karıştırılmış ve 14000 rpm de 3 dakika santrifüj edilerek tohumlar çöktürülmüştür. Çöken tohumların üzerinden sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra tohumlar 3 kez saf su ile durulanmış ve sterilizasyon için hazır hale gelmişlerdir. Şekil 1'de hiçbir işlem yapılmamış ve sterilizasyona hazır hale getirilmiş tohumların durumları gösterilmektedir.



Şekil 1: Ön işlemden geçirilmiş ve geçirilmemiş tohumlar.

Sterilizasyona hazır haldeki tohumlar % 0,05 (w/v)  $\text{CuSO}_4$  solüsyonunda 5 dakika çalkalandıktan sonra 3 kere durulanmak suretiyle yüzey sterilizasyonu yapılmış ve % 0.02 (w/v)  $\text{AgNO}_3$  içeren besiyerlerine ekilmiştir.

## 2.2. Besiyeri Kompozisyonları

### 2.2.1. Temel Besiyeri

Tüm çalışmalarda kullanılan temel besiyeri ( $M_1$ ) için  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (80 mg/l),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (80 mg/l),  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (80 mg/l) tuzları kullanılmış, karbon kaynağı olarak 20 g/l sükröz ilave edilmiştir. Temel besiyerinin katılaştırılmasında % 0,6 agar kullanılmıştır. Tüm besiyeri pH'ları otoklavlanmadan önce 5.5'e ayarlanmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonu 121 °C sıcaklıkta 1.5atm basınç altında 20 dakika süreyle yapılmıştır. Besiyeri kompozisyonlarında gümüş nitrat sadece orkide tohumlarının çimlendirilmesi sırasında yüzey sterilizasyonundan kaçan kontaminasyonların giderilmesinde protokorm oluşumu ve çimlenme aşamalarında kullanılmış olup bitki büyümebesiyerine eklenmemiştir.

### 2.2.2. Çimlenme Besiyeri

Farklı azot kaynaklarının çimlenme, protokorm oluşumu üzerine etkilerini araştırmak üzere dört farklı azot/aminoasit kaynağı üç farklı kompozisyonda temel besiyerine eklenmek suretiyle denenmiştir. Kullanılan aminoasit/azot kaynaklarının toplam azot oranları ve amino asitlere bağlanmış azot miktarları sırasıyla şöyledir; Tripton (Conda, Cat No:1612) toplam azot içeriği %13.31, amino-azot oranı %4.2; maya-özütü (Conda, Cat No:1702) toplam azot içeriği 10.7%, amino-azot oranı 5.4%; aminoasit solüsyonu (Hepatamine, Cat No:S9371-SS) toplam %8 (w/v) aminoasitlere bağlanmış azot; kazein hidrolizat (Fluka, Cat No:22090) toplam azot içeriği %>11. Araştırmada 1,2,3 g/l tripton eklenen besiyerleri için sırasıyla  $T_1$ ,  $T_2$  ve  $T_3$  kısaltmaları; 1, 2, 3 g/l maya özütü eklenen besiyerleri için sırasıyla  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  kısaltmaları % 0.3, 0.4, 0.5 g/l (w/v) aminoasit çözeltilisi eklenen besiyerleri için sırasıyla  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  kısaltmaları; ve 0.3, 0.4, 0.5 g/l kazein hidrolizat eklenen besiyerleri için sırasıyla  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  kısaltmaları kullanılmıştır.

### 2.2.3. Bitki Büyüme Besiyeri

Değişik azot kaynaklarında protokorm oluşumu sağlanan orkideler bitki büyüme besiyerine aktarılmıştır. Bitki büyüme besiyeri 1 gr/l tripton, % 2 (v/v) ananas suyu, % 6 (w/v) patates ve 1 gr/l aktif kömür katılmış  $M_1$  (temel) besiyerinden oluşmaktadır.

## 3. Araştırma Bulguları ve Tartışma

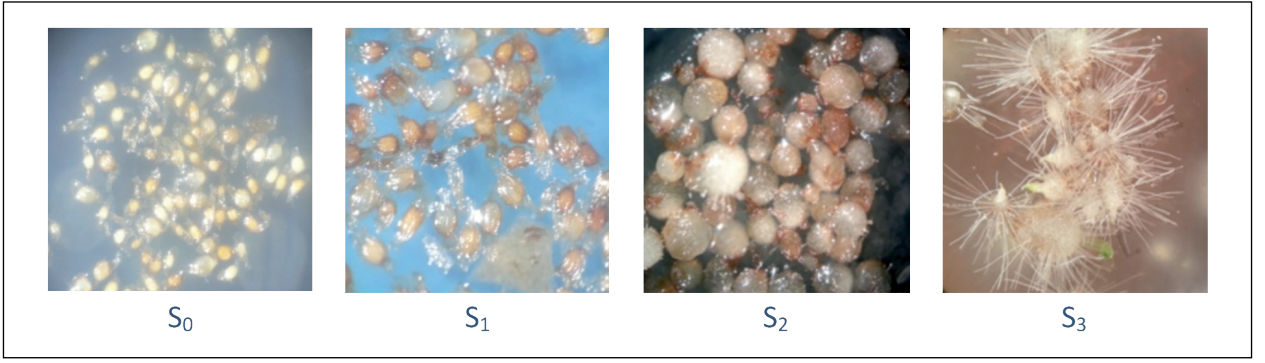
Çalışma süresince bitki materyalleri 25°C sıcaklıkta 16 saat gündüz foto periyodunda ve ortalama 10.000 lükslük ışık şiddetinde inkübasyona tabi tutulmuştur. Salep tohumlarının çimlenme ve protokorm oluşturma oranları 10, 30 ve 50. günde değerlendirilmiştir. Tohumlar imbibisyon dan protokorm oluşumuna kadar görsel olarak ( $S_0$ - $S_3$ ) dört grupta toplanmıştır.  $S_0$ , imbibisyonunu tamamlamamış tohum,  $S_1$  imbibisyonunu tamamlamış fakat çimlenme sürecine geçmemiş tohum,  $S_2$  imbibisyon dan sonra tüycük (kılçık) oluşumuna başlamış tohum,  $S_3$  ise tüycük çıkışıyla beraber ilk sürgününü oluşturacak meristem oluşumunu tamamlamış ergin protokorm yapısındaki tohum olarak tanımlanmıştır [8].  $S_0$ - $S_3$  olmak üzere tüm fazların verileri alınmış olmakla beraber değerlendirme, çimlenme başlangıcı ( $S_2$ ) ve protokorm oluşumu ( $S_3$ ) verileri üzerinden yapılmıştır. Şekil 2'de  $S_0$  -  $S_3$  aşamaları gösterilmektedir

### 3.1.1. Çimlenme Besiyerinde $\text{AgNO}_3$ Kullanılması

*O. sancta* tohumlarının aseptik koşullarda çimlendirilmesi sırasında özellikle ekimi yapıldıktan 3-4 gün sonra açığa çıkan kontaminasyonlar yüzey sterilizasyonunda yüksek konsantrasyonda sterilizasyon ajanları ile muamele yapmaya teşvik etmiştir. Bu durum ise tohumların canlılığının yitirilmesine sebep olmuştur. Sterilizasyonu yapılan tohumların çimlenmeye alınmasını takiben 3-4 gün içerisinde belirginleşen kontaminasyonlara engel olmak için çimlenme besiyerine farklı dozlarda  $\text{AgNO}_3$  eklenmiş ve çimlenmeye etkileri bakılmıştır. Kontaminasyon ve tohumların canlılığı göz önüne alındığında en etkili  $\text{AgNO}_3$  dozunun %0.02 (w/v) olduğu görülmüş ve çalışmamızda sadece çimlenme besiyerinde %0.02 (w/v)  $\text{AgNO}_3$  kullanılmıştır.

### 3.1.2. Farklı Azot Kaynakları İçeren Temel Besiyerinde Tohumların Çimlendirilmesi

Çimlenme, tüysü yapılarını ortaya çıkartmaya başlamış,  $S_2$  fazına ulaşmış tohumların şişerek beyaz renk alması ve en az 2 tüysü yapının oluşması şeklinde tanımlanmıştır (Şekil 2). Tüm azot kaynaklarında,  $S_2$  fazına ulaşma oranı kontrol ( $M_1$  besiyeri) grubuna göre en az iki kat artış gözlenmiştir. Nitekim Rasmussen [8], orkidelerin gelişiminde pek çok makro ve mikro bileşiklerin kullanıldığını ancak en etkili olanının azot olduğunu bildirmiştir. Maya özütü içeren  $Y_2$  ve  $Y_3$  besiyerlerinde kültür süresince  $S_2$  fazına ulaşma oranı artan bir eğilim göstermekle birlikte  $Y_1$  besiyerinde ise 30 gün sonrasında  $S_2$  fazına giren tohum sayısında azalma



**Şekil 2:** Tohumların imbibisyon ve protokorm oluşturma süreci, S<sub>0</sub>; Sterilizasyon sonrası henüz imbibisyon sağlamamış tohumlar, S<sub>1</sub>; imbibisyon sonrası metabolik aktivite sağlayarak beyaz renk alan tohumlar, S<sub>2</sub>; imbibisyon sonrası beyaz tüycük çıkartan protokorm oluşturacak olan tohumlar, S<sub>3</sub>; protokorm oluşturmuş tohumlar.

görülmektedir (Şekil 3B). Aynı durum kazein hidrolizat eklenen besiyerlerinde görülmekte olup, S<sub>2</sub> fazına ulaşma oranı kültür süresince artmaktadır (Şekil 3D). En yüksek oranda tüycük oluşumu, (S<sub>2</sub> fazına giren tohum) aminoasit solüsyonu içeren A<sub>1</sub> konsantrasyonunda gözlemlenmiş olup bu oran %67 olarak gerçekleşmiştir. A<sub>2</sub> ve A<sub>3</sub> konsantrasyonlarında ise bu oran nispi olarak A<sub>1</sub>'den biraz daha düşüktür (Şekil 3E). Fakat tüm azot kaynakları kıyaslandığında, S<sub>2</sub> fazındaki tüycük oluşumuna başlamış tohum sayısı bakımından en yüksek değerler, aminoasit solüsyonu içeren besiyerlerinden elde edilmiştir.

### 3.1.3. Farklı Azot Kaynaklarında Çimlendirilen Tohumların Protokorm Oluşumları

Protokorm oluşturma fazında (S<sub>3</sub>) tohumlar tüysü yapıları oluşturmayı tamamlamış, sürgün oluşumunun başlayacağı meristem belirgin hale gelmiştir (Şekil 2). A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> ve A<sub>3</sub> besiyerlerinde, S<sub>2</sub> fazında elde edilen başarının aksine protokorm oluşumu (S<sub>3</sub> fazı) son derece zayıf kalmış, bu oran A<sub>1</sub> besiyerinde %8, A<sub>2</sub> besiyerinde %3 ve A<sub>3</sub> besiyerinde %2 oranında gerçekleşmiştir (Şekil 4E). Protokorm oluşumu aşamasında, tüm azot kaynakları arasında sadece tripton içeren besiyerlerinde kültür süresi boyunca artan oranda protokorm oluşumu gözlemlenmiş, en yüksek oran %48 ile T<sub>1</sub> besiyerinde gerçekleşmiştir (Şekil 4C). Diğer tüm azotlu besiyerlerinde 30 günden sonra protokorm oluşum oranı azalmaya başlamıştır. Tripton ve diğer azot kaynaklarının protokorm oluşumu sırasında meydana getirdikleri bu etkinin, kontrol gurubu da (M<sub>1</sub>) değerlendirmeye alındığında, azot kaynağına bağlı toksisite olması muhtemeldir. Elde edilen veriler ışığında *O. sancta* doku kültüründe çimlenme için A<sub>1</sub> protokorm oluşumu için T<sub>1</sub> besiyerlerinin uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

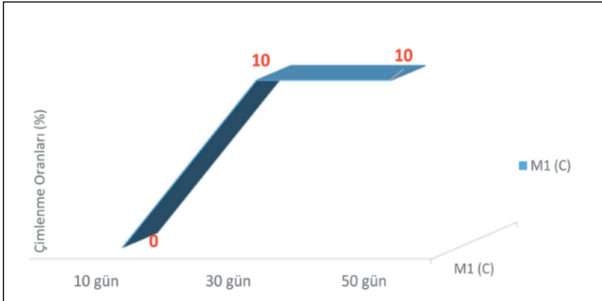
### 3.1.4. Protokormlardan Bitkicik Oluşumu

Çalışmada elde edilen protokormlar, 1 g/l tripton, 1 g/l aktif kömür, 60 g/l patates ve %2 ananas suyu eklenmiş M<sub>1</sub> bitkicik oluşum besiyerine alınmışlardır. *O. sancta*'nın bitkicik oluşum besiyerine aktarılan 356 protokormundan 341 tanesinde yaprak ve kök oluşumu gözlemlenmiş, 9 tanesinde sadece sürgün oluşumu görülmüş, 6 tane protokormda ise hiçbir gelişme kaydedilmemiştir. Bu veriler göz önüne alındığında *O. sancta* protokormları %96 verimle bitkicik haline dönüşmüştür. Protokormların bitkicik oluşum besiyerine alınmasından yaklaşık 1 ay sonra 5-7 cm boylarında bitkicikler elde edilmiştir. Şekil 5'de bitkicik oluşumu besiyerinde gelişen *O. sancta* bitkileri gösterilmiştir.

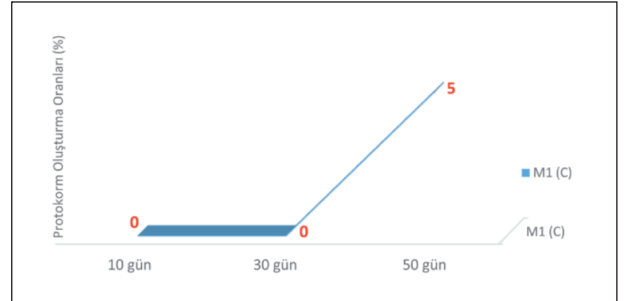
## 4. Sonuç

Bu çalışmada tohumlar için basit besiyeri tarifi yeniden yorumlanmış, maya özütü, kasein hidrolizat, aminoasit çözeltisi ve tripton'un farklı miktarlarının *O. sancta* türü tohumlarında *in vitro* çimlenme ve protokorm oluşumuna etkilerine bakılmıştır. Ortamlarda kullanılan basit besiyeri tarifi tohumlar üzerinde olumlu etki yapmıştır. Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan geleneksel besiyerlerin karasal orkideler için çok yoğun konsantrasyonda olduğu ve 2-10 kez seyreltilmiş ortamların kullanılması gerektiği bildirilmiştir [8,9,10,11]. Yine karasal orkideler için büyüme besiyerinin 0.25 g/l den daha az inorganik tuzlar içermesi gerektiği yorumunda bulunulmuştur [12]. Kullanılan inorganik tuzların bu oranlarda yer alması, kullanılan basit besiyeri tarifinin tohumların çimlenmesi ve bitki büyümesinde olumlu etkiler göstermiş olması bu görüşü destekler niteliktedir.

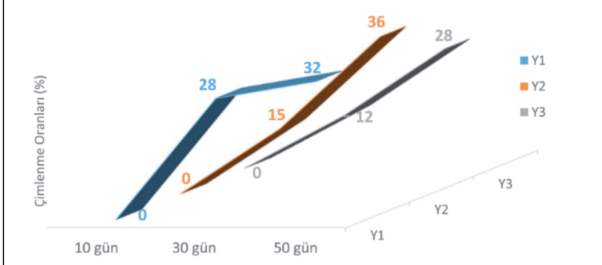
İnorganik azotun özellikle NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ün yüksek konsantrasyonlarının çimlenmeyi negatif yönde



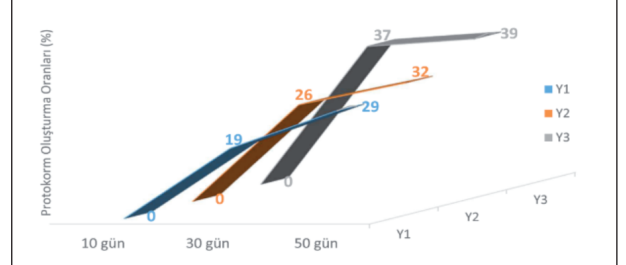
a) Temel besiyerine (M1) alınan *O. Sancta* tohumlarının çimlenme yüzdeleri



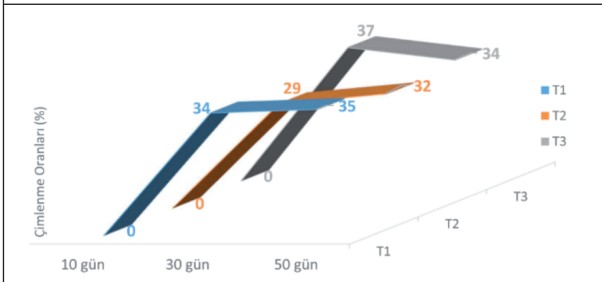
a) Temel besiyerine (M1) alınan *O. sancta* tohumlarının protokorm oluşturma yüzdeleri



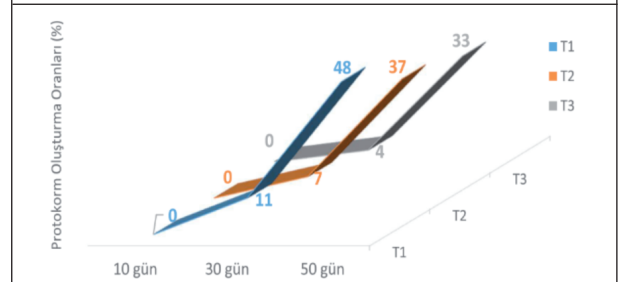
b) Maya özütü katılan temel besiyerinde *O. sancta* tohumlarının çimlenme yüzdeleri



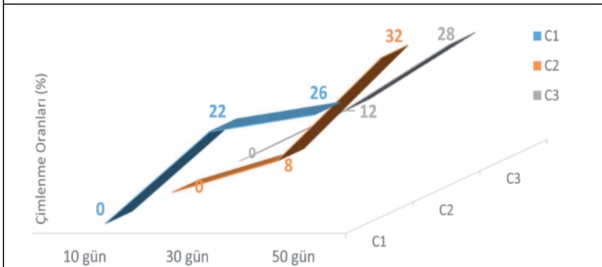
b) Maya özütü katılan temel besiyerinde *O. sancta* tohumlarının protokorm oluşturma yüzdeleri



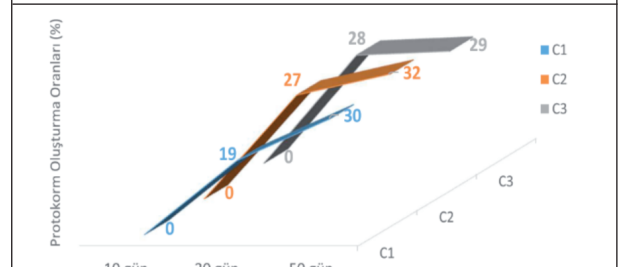
c) Tripton katılan temel besiyerinde *O. sancta* tohumlarının çimlenme yüzdeleri



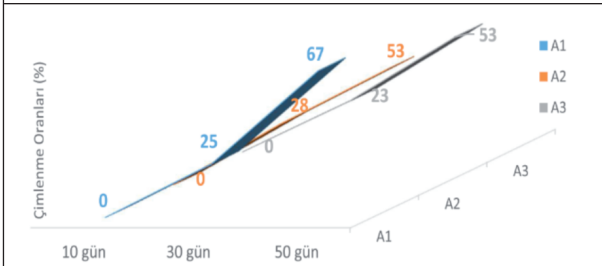
c) Tirpton katılan temel besiyerinde *O. sancta* tohumlarının protokorm oluşturma yüzdeleri



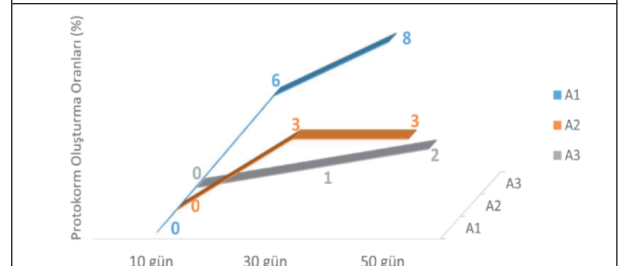
d) Kazein hidrolizat katılan temel besiyerinde *O. sancta* tohumlarının çimlenme yüzdeleri



d) Kazein hidrolizat katılan temel besiyerinde *O. sancta* tohumlarının protokorm oluşturma yüzdeleri



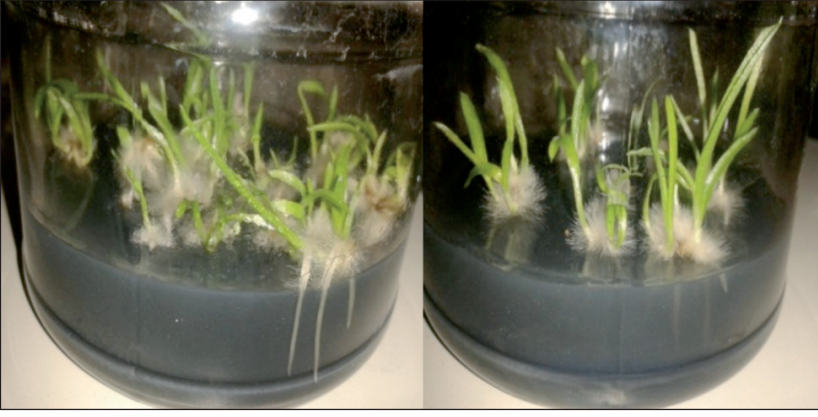
e) Aminoasit solüsyonu katılan temel besiyerinde *O. sancta* tohumlarının çimlenme yüzdeleri



e) Aminoasit solüsyonu katılan temel besiyerinde *O. sancta* tohumlarının protokorm oluşturma yüzdeleri

Şekil 3: Çimlenme oranları.

Şekil 4: Protokorm oluşturma oranları.



**Şekil 5:** Alt kültüre alınan *O. sancta* tohumlarında 35 gün sonra bitki oluşumu.

etkilediği bildirilmektedir [13,14]. Yapılan denemelerde farklı azot kaynaklarının protokorm oluşumuna etkisi farklı olmuştur.  $T_1$  ortamı, en yüksek protokorm ( $S_3$ ) oluşumunun gerçekleştiği ortam olurken, aminoasit içeren  $A_1$ ,  $A_2$  ve  $A_3$  ortamları çimlenme ( $S_2$ ) oranının yüksek olduğu ortamlar olarak belirlenmiştir.

Ananas suyunun Avrupa orkidelerinin *in vitro* kültüre alınmasında başarılı olduğu yorumu yapılmıştır [14]. Besiyeri ortamlarında kullanılan ananas suyunun, kültürlerde fenolik asit eksudasyonunu düşürdüğü, karasal orkidelerde kök gelişimini desteklediği bildirilmiştir [15,16]. Yapılan çalışmada 85 gün sonunda kök gelişiminin 5-7 cm uzunluğunda olduğu görülmektedir. Yine besiyerine eklenen aktif kömürün besiyeri içinde fenolik bileşiklerinin birikimini engellediği bildirilmiş olup [17], çalışmamızda fenolik eksudasyon birikimi hiçbir bitkide olmamıştır.

Sterilizasyon aşamasından önce orkide tohumlarının, tohum yüzeyindeki mumsu hidroforik tabakanın erişilebilir hale gelmesi gerekmektedir. Ayrıca tohumla karışık halde gelen toprak taş ve böcek artıkları gibi partiküllerin varlığı ve sterilizasyonun tüm tohumlarda etkili olmaması, aseptik kültür için problem teşkil etmektedir. Bu sebeplerden dolayı sterilizasyon öncesinde tohumlar birtakım kimyasallarla ön işleme tabi tutulmuşlardır. Yapmış olduğumuz ön araştırmalar neticesinde, orkide tohumlarının aseptik koşullarda *in vitro* kültüre alınması için geliştirilmiş benzer bir protokolün mevcut olmadığı belirlenmiştir.

Tohum sterilizasyonu sonrası maksimum canlılığın elde edilmesi ve sterilizasyon sonrası ekimlerde kontaminasyon sorununu ortadan kaldırmak için çimlenme besiyerinde, farklı azot kaynakları ile birlikte uygulanan gümüş nitrat, genel olarak tohum çimlenmesini engelleyici bir etki oluşturmamıştır.

## Kaynaklar

1. T. Aytaş, (1994). Bazı *Ophrys* L. (Orchidaceae) Türlerinden Simbiyotik Fungusların İzolasyonu ve *Ophrys* sp. Hudson Tohumlarının Asimbiyotik ve Simbiyotik Ortamlarda Çimlendirilmesi Üzerine Bir Araştırma, Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
2. İ. Özkoç, (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.
3. C.A.J Kreutz, (2000). Flora of Turkey and East Aegan Islands. Vol:11, University Press, Edinburgh, 656.
4. H.E. Erdem, (2004). Biyolojik Çeşitliliğinin Ekonomik Değerinin Belirlenmesi: Yabani Orkide Örneği, yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
5. E. Sezik, (1984). Orkidelerimiz, Sandoz Kültür Yayınları. No:6, 166s.
6. C.T. Ingold, H.J. Hudson, (1993). The biology, Sixth Edition (Chapman Hall). London, 224.
7. A. Özavcı, (1995). Kahramanmaraş Bölgesinde Doğal Yayılış Gösteren Bazı Salep Orkidelerinin *In Vitro*'da Yumru Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması, Yüksek lisans tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
8. H.N. Rasmussen, (1995), Terrestrial orchids – from seed to mycotrophic plant, Cambridge University Press, New York, 444.
9. G. Harvais, (1974). Notes on the biology of some native orchids of Thunder Bay, their endophytes and symbionts, Canadian Journal of Botany, 52: 451-460
10. G. Fast, (1980), Vermehrung und Anzucht, In: Orchideenkultur. Botanische Grundlagen, Kulturverfahren, Pflanzenbeschreibungen, ed: Fast, G., Ulmer, Stuttgart, p. 207-23.
11. J. Van Waes, (1984), *In vitro* studie van de kiemingsfysiologie van Westeuropese orchideeën, Thesis, Rijkuniversiteit Gent

12. G. Fast, (1978), Über das Keimverhalten europäischer Erdorchideen bei asymbiotischer Aussaat, *Die Orchidee*, 29: 270-274.
13. E. Dijk, (1988), Mykorrhizen der Orchideen. III. Physiologische Aspekte bezüglich Kohlenstoff und Stickstoff, *Die Orchidee*, 39: 196-200.
14. S. Malmgren, (1989), Asymbiotisk förökning från frö av gullkärl, flugblomma, brun kull och några andra svenska orkidéarter, *Svensk Botanisk Tidskrift*, 83 (6): 347-354.
15. S. Malmgren, (1988), Fröförökning av *Dactylorhiza* i stor skala – en kort manual, *Svensk Botanisk Tidskrift*, 82 (3): 61-66.
16. S. Malmgren, (1993), Asymbiotisk fröförökning i stor skala av *Anacamptis*, *Ophrys*, *Orchisochandra* orkidéer med rund arotknölar, *Svensk Botanisk Tidskrift*, 87 (4): 221-234.
17. J. Van Waes, (1987), Effect of activated charcoal on in vitro propagation of western European orchids, *Acta Horticulturae*, 212: 131-138.