



SALEP ORKİDELERİNİN MİKROÇOĞALTIMI

Dilek Nur EKİNOĞLU

**Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Nazmi GÜR
AĞUSTOS-2017**

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

SALEP ORKİDELERİNİN MİKROÇOĞALTIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilek Nur EKİNOĞLU

141132105

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 19 Temmuz 2017

Tezin Savunulduğu Tarih : 3 Ağustos 2017

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Nazmi GÜR (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. Aykut TOPDEMİR (F.Ü)

Yrd. Doç. Dr. Cihan ÇİTİL (KA.Ü)

AĞUSTOS-2017

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

SALEP ORKİDELERİNİN MİKROÇOĞALTIMI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ**

DİLEK NUR EKİNOĞLU

Danışman: Doç. Dr. Nazmi Gür

ELAZIĞ-2017

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü laboratuvarlarında yapmış olduğum *Orchis laxiflora* bitkisi yumrusundan mikroçoğaltım prosesiyle alakalı deneysel çalışmaları ve sonuçları sunmaktayım.

Bu çalışmayı hazırlarken geçirdiğim süreçte benden yardımlarını esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Nazmi GÜR' e, Elazığ Orman Bölge Müdürlüğü ve mühendislerine, ayrıca manevi desteğini her an yanımda hissettiğim eşime, anneme ve babama teşekkürü borç bilirim.

Dilek Nur EKİNOĞLU

Elazığ, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	V
TABLolar LİSTESİ.....	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Orkidelerin Kullanım Alanları	4
1.2. Orkideleri Tehdit Eden Faktörler	5
1.3. Salep Orkideleri.....	6
1.3.1. Salebin Kullanım Alanları ve Eldesi	10
1.3.2. Salebin Kimyasal Yapısı	11
1.4. Salep Orkidelerinin Çoğaltılması	12
1.5. Önceki Çalışmalar	14
1.6. <i>Orchis laxiflora</i>	16
2. MATERYAL ve METOT.....	19
2.1. Materyal	19
2.2. Metot	20
2.2.1. Kullanılan MS Besin Ortamı ve Bitki Büyüme Düzenleyicileri.....	20
2.2.2. Besin Ortamının İçeriği ve Hazırlanması.....	21
2.2.3. Sterilizasyon işlemleri	23
2.2.3.1. Ekim Sırasında Kullanılacak Malzemelerin Sterilizasyonu.....	23
2.2.3.2. <i>Orchis laxiflora</i> Bitkisi Yumrularının Ön Sterilizasyon İşlemi	23
2.2.3.3. <i>Orchis laxiflora</i> Bitkisinin Yumrularının Yüzey Sterilizasyonu	23
2.3. <i>Orchis laxiflora</i> Bitkisinin Yumrularının Kültüre Alınması.....	24
2.3.1. BBD'siz MS Besin Ortamında Sürgün Rejenerasyonu.....	24
2.3.2. Sürgün Uçlarından Yumru Rejenerasyonu	25
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	27
3.1. Sonuçlar	27
3.1.1. <i>Ochis laxiflora</i> Bitkisi Yumrularının Sterilizasyon Sonuçları	27

3.1.2.	<i>Orchis laxiflora</i> Bitkisi Yumrusundan Sürgün Rejenerasyonu.....	29
3.1.3.	<i>Orchis laxiflora</i> Bitkisi Filizlerinden Yumru Rejenerasyonu	30
3.2.	Tartışma.....	35
4.	KAYNAKLAR	38
5.	EKLER.....	44



ÖZET

Orkide, Orchidaceae familyasındaki cinslere ait türlerin tümüne verilen genel isimdir. Familya ismini *Orchis* cinsinden almıştır. Orchidaceae familyasının içerdiği tür sayıları ile ilgili farklı veriler bulunmaktadır. Orkideler monokotil, çok yıllık ve otsu bitkilerdir. Kutuplar ve çöller dışında dünyanın hemen her yerinde yetişen türleri bulunmaktadır. Bazı orkide türleri toprak altında bir çift yumruya sahiptir ve bu yumruları salep eldesinde kullanılır.

Bu çalışmada, salep eldesi için bilinçsiz toplama sonucu yok olma tehdidiyle karşı karşıya olan ve mikroçoğaltımı amaçlanan *Orchis laxiflora* bitkisinin yumrularından elde edilen sürgünler eksplant kaynağı olarak kullanılıp in vitro ortamda yumru elde edebilmek amaçlanmıştır. Yumrulardan sürgün elde etmek için Murashige Skoog (MS) besin ortamı kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki yüzey sterilizatörleri farklı sürelerle uygulanarak sterilizasyon işlemi yapılan yumrular MS besin ortamlarına ekildikten 45 gün sonra sürgünler elde edilmiş ve bu sürgünler Benzil Amino Pürin (BAP)'ın iki farklı konsantrasyonu (0,5 mg/L ve 1 mg/L) ile Naftalin Asetik Asit (NAA), Pikloram(P), İndol Asetik Asit (IAA), İndol Bütirik Asit (IBA) ve Diklorofenoksi asetik asit (2,4D) bitki büyüme düzenleyicilerin (BBD) farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının olduğu MS besin ortamlarına ekilerek yumru oluşumu açısından gözlemlenmiştir. Sonuç olarak 30 gün sonra yumru oluşmaya başlamıştır. Yumru oluşumu açısından en etkin konsantrasyon 0,5mg/L BAP ile 0,05mg/L NAA BBD'lerinin birlikte kullanılmasıyla sağlanırken en az etki gösteren BBD'ler ise 2,4D ve IBA olmuştur. Yumru gelişimleri diğer BBD'lerde farklı oranlarda gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Orkide, Orchidaceae, *Orchis laxiflora*, salep, mikroçoğaltım, MS, BAP, NAA, P, IAA, IBA, 2,4D, BBD, in vitro.

SUMMARY

MICROPROPAGATION OF SALEB ORCHIDS

Orchid is a general name given to all of the types belonging to the classes in Orchidaceae family. The family takes its name from the *Orchis* genus. There are different informations about the number of the types that Orchidaceae family has. Orchids are monocotyledon, perennial plant and welwitschia. There are different types almost in all around the world except deserted areas and poles. Some types of the Orchids have a pair of bumps underneath the soil and these bumps help to generate saleb.

The purpose of this study is to produce salebs using *Orchis laxiflora* tubers as a type facing endangeredness through inaccurate micropropagation. To do that, the young shoots are going to be used as explant source for producing new tubers in vitro ambience. In order to produce tubers from the shoots, Murashige Skoog (MS) has been used as nutrition media. Surface sterilizators in varying concentrations have been applied in different time periods. After planting the tubers into the MS nutrition media, the shoots have been produced in the following 45 days. These shoots have been containing PGR at different combinations and concentrations of MS nutrition media with two different concentrations (1 and 0,5 mg/L) of Benzylaminopurine (BAP) with Naphthalene acetic acid (NAA), Picloram(P), Indol acetic acid (IAA), Indole butyric acid (IBA) and 2,4-dichlorop henoxycetic acid (2,4D) and observed in the following days. In the following time period of 30 days, tuber regeneration has been observed. The most effective concentration in tuber generation has been created through combinations of 0,5mg/L BAP and 0,05mg/L NAA plant growth regulation (PGR). Those least effective PGR have been reported as combination of BAP with 2,4D and IBA. Tuber development was observed at different rates in other PGRs.

Key Words: Orchid, Orchidaceae, *Orchis laxiflora*, saleb, micropropagation, MS, BAP, NAA, P, IAA, IBA, 2,4D, PGR, in vitro.

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. <i>Orchidaceae</i> Familyasının Dünyada Yayılım Gösterdiği Alanlar.....	1
Tablo 1.2. Türkiye’de Yetişen <i>Orchidaceae</i> Familyasına Ait Cinsler.....	2
Tablo 1.1.1. Dünya Geneline Orkidelerin Kullanım Alanları.....	5
Tablo 1.3.1. Türkiye’de Salep Elde Etmek İçin Kullanılan Orkide Cins ve Türleri.....	7
Tablo 1.3.2. Ülkemizde Ticari Olarak Salep Elde Edilen Orkide Türlerinin Bulunduğu Bölgeler	8
Tablo 1.3.3. Ticari Saleplerin Ortalama Yumru Ağırlığı İle Birim Ağırlıktaki Yumru Sayıları.....	9
Tablo 1.3.2.1. Bazı Orkide Türlerine Göre Glikomannan ve Nişasta Oranları.....	12
Tablo 2.2.2.1. MS Ortamı İçeriği	21
Tablo 2.2.2.2. Yumru Oluşumu İçin Kullanılan Besiyerlerindeki BBD’lerin Konsantrasyonları.....	22
Tablo 2.2.3.3.1. Yüzey Sterilizasyonunda Kullanılan Maddeler, Uygulama Süreleri ve Konsantrasyonları	24
Tablo 3.1.3.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerine Bağlı Olarak % Yumru Rejenerasyonu	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Türkiye florasında orkidelerin bulunduğu alanlar.....	3
Şekil 1.3.1.1. Salep orkidesi yumrularını taze ve kuru hali.....	11
Şekil 1.6.1. <i>Orchis laxiflora</i> bitkisi.....	17
Şekil 1.6.2. <i>Orchis laxiflora</i> türünün Türkiye’de dağılımı:.....	17
Şekil 2.1.1. Orkidelerin temin edildiği Elazığ ili, Sivrice ilçesi, Başkaynak köyü uydu görüntüsü.....	19
Şekil 2.1.2. <i>Orchis laxiflora</i> yumruları.....	20
Şekil 2.1.3. Temizlenip ayıklanmış yumru.....	20
Şekil 2.3.1.1. BBD’siz MS besin ortamına ekilen yumru.....	25
Şekil 2.3.2.1. Laminer flow kabinde sürgün oluşturmuş yumru.....	26
Şekil 2.3.2.2. Kültüre alınmak için kesilmiş sürgün kısımları.....	26
Şekil 3.1.1.1. <i>Orchis laxiflora</i> bitkisinde denenen farklı sterilizasyon maddelerinin yüzde olarak etkisi: (A) NaOCl, (B) %1 AgNO ₃ , (C) %5 AgNO ₃ , (D) %30 H ₂ O ₂	27
Şekil 3.1.1.2. Farklı sürelerde uygulanan çeşitli konsantrasyonlardaki sterilizasyon maddelerinin uygulanma zamanından sonraki gözlemlenen % kontaminasyon grafiği.....	28
Şekil 3.1.1.3. Farklı sürelerde uygulanan çeşitli konsantrasyonlardaki sterilizasyon maddelerinin uygulanma zamanından sonraki gözlemlenen % hayatta kalan grafiği.....	28
Şekil 3.1.2.1. Sürgün oluşturan <i>Orchis laxiflora</i> yumrusu.....	29
Şekil 3.1.3.1. Ekim yapıldıktan 2 hafta sonraki gelişme.....	31
Şekil 3.1.3.2. Ekim yapıldıktan 3 hafta sonraki gelişme.....	32
Şekil 3.1.3.3. Ekim yapıldıktan 4 hafta sonraki gelişme.....	32

Şekil 3.1.3.4. Ekim yapıldıktan 5 hafta sonraki gelişme.....	33
Şekil 3.1.3.5. Ekim yapıldıktan 6 hafta sonraki gelişme.....	33
Şekil 3.1.3.6. Ekim yapıldıktan 8 hafta sonraki gelişme.....	34
Şekil 3.1.3.7. Ekim yapıldıktan 10 hafta sonraki gelişme.....	35



KISALTMALAR VE SEMBOLLER

Kısaltmalar

MS:	Murashige Skoog
KC:	Knudson C
½ MS:	Yarı kuvvetteki Murashige and Skoog
BAP:	Benzil Amino Pürin
NAA:	Naftalin Asetik Asit
P:	Pikloram
IAA:	İndol Asetik Asit
IBA:	İndol Bütirik Asit
2,4D:	Diklorofenoksi Asetik Asit
BBD:	Bitki Büyüme Düzenleyicisi
GA ₃ :	Giberellik asit
TDZ :	Thidiazuron
HCl:	Hidroklorik asit
NaOH:	Sodyumhidroksit
NaOCl:	Sodyum hipoklorit
AgNO ₃ :	Gümüş nitrat
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit

Semboller

°C:	Celcius derece
cm:	Santimetre
gr:	Gram
mg:	Miligram
l/L:	Litre
mm:	Milimetre
µM:	Mikromolar
dk:	Dakika
sn:	saniye
N:	Normal
pH:	Asitlik derecesi
%:	Yüzde

1. GİRİŞ

Türkiye bitki gen kaynakları açısından oldukça zengin bir ülkedir. Bu kaynaklar doğal olarak var olduklarından dolayı, sınırsız ve hiçbir zaman yok olmayacak gibi görülmüş ve bilinçsiz yapılan tahribatlardan dolayı, yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmışlardır. Orkideler de Anadolu topraklarında yetişen yaklaşık 204 türü ile eşsiz bir güzellik ve zenginlik sunan bu doğal kaynaklardan biridir [1].

Orkide ismi, *Orchidaceae* familyasındaki türlere verilen ortak bir isimdir [2]. Bu familya dünyada çiçekli bitkilerin en büyük ve en çeşitli olanıdır. Bilim adamlarının çeşitli fosiller üzerinde yaptıkları araştırmalar sonucunda orkidelerin 120 milyon yıl öncesine kadar var oldukları görülmüştür [3]. Çeşitli kaynaklara göre değişmekle birlikte, bu familya içinde ortalama 850 cins ve 18,000 kadar tür bulunduğunu ve 100,000 orkide hibridinin tanımlandığı bildirilmektedir [1, 2, 4-8]. Orkideler tüm dünyada yayılış gösteren bir familyadır (Tablo 1.1). Kutuplar ve çöller dışında hemen hemen dünyanın her yerinde yetişebilmektedir ve yetiştiği bölgeye göre de türleri bulunmaktadır [3].

Tablo 1.1. *Orchidaceae* Familyasının Dünyada Yayılım Gösterdiği Alanlar [9]

Yayılış Alanı	Cins Sayısı (adet)	Toplam Cins Sayıları (adet)
Tropik Amerika	250-270	740-840
Tropik Asya	260-300	
Tropik Afrika	230-270	
Okyanusya	50-70	50-70
Avrupa ve Ilıman Asya	40-60	60-85
Kuzey Amerika	20-25	
	Genel Toplam	850-995

Orchidaceae çok geniş bir familya olduğundan dolayı oldukça ayrıntılı taksonomik bir sınıflandırmaya sahiptir.

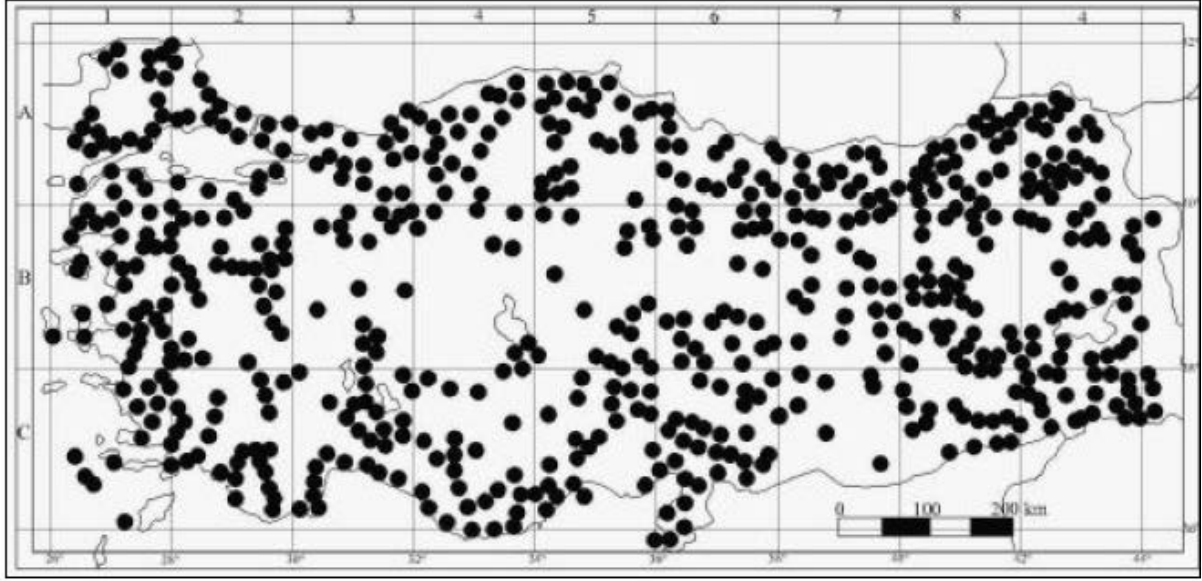
Bu sınıflandırma içerisinde, 5 adet alt familya, 22 adet tribus (oymak), 70 adet alt tribus (alt oymak) ve tanımlanamayan bir grup barındırmaktadır. Ülkemizdeki orkidelere ait sınıflandırma Tablo 1.2’de verilmiştir [10, 11].

Tablo 1.2. Türkiye’de Yetişen *Orchidaceae* Familyasına ait Cinsler [10,11].

	Alt Familya	Tribus	Alt Tribus	Cinsler
1	<i>Apostasioideae</i>			
	<i>Cypripedioideae</i>			
2	<i>Epidendroideae</i>	<i>Neottieae</i>	<i>Limodorinae</i>	<i>Cephalanthera, Epipactis, Limodorum</i>
			<i>Listerinae</i>	<i>Listera</i>
3	Gelişmiş <i>Epidendroideae</i>	<i>Cymbidieae</i>		
		<i>Polystachyeae</i>		
		<i>Vandaeae</i>		
		<i>Maxillarieae</i>	<i>Corallorhizinae</i>	<i>Corallorrhiza</i>
4	<i>Orchidoideae</i>	<i>Diceratosteleae</i>		
		<i>Codonorchideae</i>		
		<i>Cranichideae</i>		
		<i>Diseae</i>		
		<i>Diurideae</i>		
		<i>Orchideae</i>	<i>Orchidinae</i>	<i>Anacamptis, Barlia, Coeloglossum, Comperia, Dactylorhiza, Gymnadenia, Himantoglossum, Neottia, Ophrys, Orchis, Platanthera, Serapias</i>
5	<i>Vanilloideae</i>	<i>Pogoniinae</i>		
		<i>Vanilleae</i>		
6	Tanımlanamayanlar	<i>Triphoreae</i>		
		<i>Wulfschlaegeliae</i>		
7	Herhangi Bir Grup İçinde Yer Almayanlar*			<i>Aceras, Epipogium, Neottiana, Spiranthes, Steveniella, Traunsteinera</i>
	Toplam cins sayısı (adet)			24

* Ülkemizde olduğu bildirilen, ancak bu taksonomik sınıflamada yer almayan cinsler

Türkiye’de 24 cinse ait toplam 204 orkide türünün yetiştiği bilinmektedir [11].



Şekil 1.1. Türkiye florasında orkidelerin bulunduğu alanlar[11].

Doğu Akdeniz Bölgesinde bulunan toplam orkide sayısı Türkiye’deki orkide sayısının %36,8 ini oluşturmaktadır. Bu oran doğrultusunda tür bakımından bölgenin oldukça zengin olduğunu söyleyebiliriz ayrıca, ülkemizin iklim koşullarının elverişliliğinden dolayı bu bölgedeki türlere ülkemizin diğer bölgelerinde de rastlanılmaktadır [12-14].

Orkideler besin alma durumlarına göre şu şekilde gruplandırılabilirler [15-18];

a) Epifitler;

Tüm orkidelerin %70 ini oluşturan bu orkideler, başka bitkiler üzerinde hava kökleriyle tutunup yaşarlar. Fotosentez yapma yeteneğine sahiptirler ve parazit değildirler. Tropikal iklimlerde, doğal alanlarda ya da gerekli iklim koşulların sağlandığı seralarda yetiştirilebilmektedirler. Ayrıca epifitlere gösterişli çiçekleri olduğundan dolayı süs bitkisi olarak da talep oldukça fazladır [19, 20]. Epifit orkideler daha çok tropik orkide adıyla tanınmaktadır [10].

b) Litofitler;

Orkidelerin %5 ini oluşturup taş ve kayalar üzerine tutunarak yaşayan türler olarak bilinirler.

c) Terrestrial;

Orkidelerin %25 ini oluşturun toprakta kök salarak toprağa bağlı olarak yaşarlar. Bu gruptaki orkidelere orta kuşak orkideleri ya da ılıman kuşak orkideleri de denir. Avrupa, Akdeniz havzası, Kafkasya ve Asya'da yayılım gösterirler [2, 10, 21].

Orta kuşak orkideleri, yapısal olarak toprak altı ve toprak üstü organlar taşımaktadır. Toprak altı olarak, kök ve depo organı (yumru veya rizom) bulunmaktadır. Bu orkideler yumru veya rizom taşıdıklarından dolayı otsu olan yapılarına çok yıllık bitki olma özelliği kazandırmışlardır [22].

Türkiye'de bulunan orkideler orta kuşak orkideleri grubuna dâhildir [10]. Bu türlerin çoğunluğu ototrof yani inorganik bileşikler kullanarak organik bileşikler dediğimiz karmaşık ve uzun molekül zincirlerini üretebilen canlılardır yani parazit değildir. Ayrıca bunların %13'ünün endemik, yani sadece Türkiye topraklarında yetişebilen türler olduğu bazı kaynaklar tarafından söylenmektedir [23].

d) Çürükçüller ya da saprofitler;

Bunlar ölü ya da çürüyen maddeler üzerinde büyüyen ve yeşil renge sahip olmayan orkidelerdir [21].

1.1. Orkidelerin Kullanım Alanları

Dünya'da orkideler gıda alanında, hoş koku elde etmek için parfüm alanında ve tıbbi alanlarda (ilaç hammaddesi olarak) kullanılmaktadır. Ayrıca güzel görüntülerinden dolayı süs bitkisi olarak da bu sektörde değerli bir yere sahiptir [4].

Tablo 1.1.1. Dünya Geneline Orkidelerin Kullanım Alanları [10]

Sıra	Kullanım Alanı	Önemli Bazı Türler	Açıklama
1	Gıda	<i>Aceras, Anacamptis, Cephalanthera, Barlia, Dactylorhiza, Comperia, Coeloglossum, Epipactis, Gymnadenia, Himantaglossum, Limodorum, Listera, Neotinea, Neottia, Ophrys, Orchis, Platanthera, Serapias, Spiranthes, Traunsteinera</i>	vanilya, salep, dondurma, yoğurt, pasta yapımı
2	Parfüm-Koku	<i>Orchis punctulata</i>	
3	Tıbbi	<i>Vanda parviflora</i>	antikanserojen ve antiviral
4	Süs Bitkisi	<i>Dendrobium, Phalaenopsis, Vanda, Cymbidium, Paphiopedilum, Oncidium Phalaenopsis, Cattleya</i>	kesme çiçek, saksı bitkisi

1.2. Orkideleri Tehdit Eden Faktörler

Doğal ortamlarından orkidelerin tahribi doğrudan ve dolaylı yollarla yapılmaktadır. Doğrudan yapılan yok etme işlemi sökümünün şiddetli olmasından kaynaklanmaktadır. Dolaylı yok etme ise bitki henüz çiçeklenme aşamasında iken sökümünün yapılması nedeniyle tohum meydana gelmeden hayatının son bulmasıdır. Ayrıca orkideler yumrularıyla da ürerler, ancak ana yumru insanlar tarafından alındığı için bu imkân da ortadan kaldırılmış olmaktadır [24].

Doğadan yumru sökümünün tahribat boyutlarına ulaşmasının ardından Tarım Bakanlığı, yapılan uyarılar ve şikâyetler sonucunda 11 Ağustos 1974 yılında 14973 sayılı Resmi Gazetede bir genelgeyle yumru ihracatını yasaklamıştır [10, 25].

Yaygın kullanım alanlarından dolayı orkide yumrusu insanoğlu tarafından her zaman çok fazla talep görmüştür. Gerek kullanım alanlarının fazlalığı ve gerekse de türün azalmasından dolayı yapılan yasaklamalar sonucunda yumru ihracatında tüccarlar yeni ticaret kapıları bulmaya çalışmışlardır. Sonuçta, yumru olarak değil de toz halinde ihraç etmeye başlamışlardır. Yeni açılan bu ticaret kapısıyla da tür sayısına verilen zarar gün geçtikçe artmış ve bakanlık tarafından yapılan yasa düzenlemesiyle orkide yumrularına ilaveten yumruların tozunun da ihracatı 19 Temmuz 1998 yılında 23407 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan tebliğ ile yasaklanmıştır [26].

Doğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan incelemeler sonucunda Van ili ve çevresinde toplanan orkide yumrularının kilosunun yaklaşık 100 TL olduğu ve bu nedenle çok cazip bir gelir kaynağı olarak görüldüğü bildirilmektedir [27]. Kazanç olanağı bu kadar yüksek olan bir bitkinin doğadan sökülmesi ve ihracatı tüm yasaklara rağmen önlenememiştir. Bu nedenle 2004'te de her türlü soğanlı bitkinin doğadan sökülmelerini sınırlandıran “Doğal Çiçek Soğanlarının Sökümü, Üretimi ve Ticaretine İlişkin Yönetmelik” yürürlüğe girmiştir [28].

Bu yasal hükümlere rağmen her yıl 30-50 milyon adet arasında orkidenin yasal olmayan bir şekilde sökülmesinin yapıldığı bilinmektedir. Bu sökümün sebebi, orkidelerin halkın geçim sıkıntısını hafifletmede yararlanılacak doğal bir gelir kaynağı olmasından dolayıdır [10].

Kullanım alanları çok fazla olan orkideler Dünya'da da bulundukları bölgelerde çoğunlukla tehlike altındadır. Örneğin, Brezilya'da doğadan kontrolsüz bir şekilde toplandığından dolayı türler yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır. Avustralya'da 1100 orkide türünün yaklaşık %20 sinin tehlike altında olduğu bildirilmiştir. Hindistan'da 1141 türün bağlı olduğu 166 cins içinde *Cymbidium*, *Dendrobium* ve *Vanda* gibi cinslerin aşırı otlatma, yol-köprü ve baraj yapımı ve orman yangınları gibi nedenlerden dolayı tehlike altında olduğu bildirilmiştir [29]. Ayrıca Borneo'da da 2500-3000 orkide türünün ormanların bozulması ve orman yangınlarının yanı sıra insanoğlunun çok fazla miktarda yasa dışı toplama yapmasından dolayı tehlike altında olduğu bildirilmiştir [30].

1.3. Salep Orkideleri

Ülkemizde yaygın olarak yetiştiği ve hatta bazı türlerin endemik olduğu bilinen orkidelerin önemli kullanım alanlarından birisi de, süs bitkisi olarak kullanılmalarının yanı sıra, bazı orkide türlerinden elde edilen saleptir [15]. Salep elde edilen orkideler salep orkideleri olarak adlandırılmaktadır [31].

Türkiye de bulunan orkide cinslerinden 9 cinse ait 30 orkide türü salep eldesi için kullanılmaktadır [15, 18, 32].

Tablo 1.3.1. Türkiye’de Salep Elde Etmek İçin Kullanılan Orkide Cins ve Türleri [2, 17, 18, 33]

	Cins	Türler
1	<i>Aceras</i>	<i>A. anthropophorum</i>
2	<i>Anacamptis</i>	<i>A. pyramidalis</i>
3	<i>Barlia</i>	<i>B. robertiana</i>
4	<i>Dactylorhiza</i>	<i>D. iberica, D. osmanica, D. romana</i>
5	<i>Himantoglossum</i>	<i>H. affine</i>
6	<i>Neotinea</i>	<i>N. maculata</i>
7	<i>Ophrys</i>	<i>O. bombyliflora, O. ferrumequinum, O. Fusca, O. holoserica, O. transhyrcana, O. reinholdi</i>
8	<i>Orchis</i>	<i>O. anatolica, O. coriophora, O. italica, O. laxiflora, O. morio, O. pallens, O. palustris, O. pinetorum, O. provincialis, O. purpurea, O. sancta, O. simia, O. spitzelii, O. tridentata, O. collina</i>
9	<i>Serapias</i>	<i>S. vomeracea</i>

Ülkemizde yetişen salep orkidelerinin bulunduğu bölgeler ve ticari olarak bilindikleri isimleri 6 bölgede gruplandırılabilir (Tablo 1.3.2).

1. Bölge; Kuzey Anadolu Bölgesi, Kastamonu salebi olarak piyasada yer almıştır.
2. Bölge; Güney Batı Anadolu Bölgesi, Muğla ve çevresinden elde edilir ve piyasada Muğla salebi olarak bilinir.
3. Bölge; Güney Anadolu Bölgesi, Elmalı’dan Silifke- Gülpınar civarına kadar olan bölgeden elde edilir, Antalya ve Silifke Salebi olmak üzere 2 cinsi vardır.
4. Bölge; Güney Doğu Anadolu Bölgesi, Maraş, Adıyaman ve Malatya civarlarından elde edilir. Maraş Salebi ve Çayır salebi olarak 2 cinsi bulunmaktadır
5. Bölge; Doğu Anadolu Bölgesi, Van, Muş, Siirt, Hakkari ve Bitlis civarından elde edilir. Piyasa da Van Salebi olarak bilinir ve Dağ Salebi ve Çayır Salebi olmak üzere 2 cinsi mevcuttur.
6. Bölge; İç Anadolu Bölgesi, Yozgat ve Akdağ madeni civarından elde edilir ve Akdağ madeni salebi olarak bilinir.

Tablo 1.3.2. Ülkemizde Ticari Olarak Salep Elde Edilen Orkide Türlerinin Bulunduğu Bölgeler [2, 18, 21, 32, 34-38]

BÖLGE		TÜRLER
Kastamonu Salebi	Araç	<i>Orchis pinetorum</i> , <i>O. purpurea</i> , <i>Dactylorhiza romana</i>
	Azdavay	<i>Orchis pinetorum</i> , <i>O. purpurea</i> , <i>O. pallens</i> , <i>Dactylorhiza romana</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i>
	Daday	<i>O. simia</i> , <i>O. tridentata</i> , <i>Dactylorhiza romana</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i>
	Devrekani	<i>Orchis pinetorum</i> , <i>O. purpurea</i> , <i>O. simia</i> , <i>O. tridentata</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i>
	Tasköprü	<i>Orchis pinetorum</i> , <i>O. purpurea</i> , <i>Dactylorhiza romana</i>
	İlgaz	<i>Orchis pinetorum</i> , <i>O. pallens</i> , <i>Dactylorhiza romana</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i>
Muğla Salebi	Milas civarı	<i>Barlia robertiana</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i> , <i>Dactylorhiza romana</i> , <i>Orchis italica</i> , <i>O. tridentata</i> , <i>O. anatolica</i> , <i>O. morio</i> , diğer <i>Orchis</i> ve <i>Ophrys</i> Türleri
	Muğla civarı	<i>Orchis anatolica</i> , <i>O. tridentata</i> , <i>O. pinetorum</i>
	Yerkesik civarı	<i>Orchis anatolica</i> , <i>O. tridentata</i> , <i>O. simia</i>
Maras Salebi	K. Maras ve civarı	<i>Anacamptis pyramidalis</i> , <i>Dactylorhiza romana</i> , <i>Himantoglossum affine</i> , <i>Ophrys holoserica</i> , <i>Orchis anatolica</i> , <i>O. morio</i> , <i>O. pinetorum</i> , <i>O. spitzelii</i> , <i>O. tridentata</i> , <i>O. laxiflora</i>
Van Salebi	Van civarı	<i>Dactylorhiza romana</i> ssp. <i>georgia</i> , <i>Orchis pinetorum</i> , <i>O. anatolica</i> , <i>O. coriophora</i> , <i>O. simia</i> , <i>O. tridentata</i> , <i>O. spitzelii</i> , <i>O. collina</i> , <i>Ophrys transhyrcana</i> , <i>Ophrys reinholdi</i> ssp. <i>strausii</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i>
	Siirt civarı	<i>Dactylorhiza romana</i> ssp. <i>Georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>Orchis anatolica</i> , <i>O. simia</i> , <i>O. pinetorum</i> , <i>O. tridentata</i> , <i>O. coriophora</i> , <i>O. palustris</i> , <i>Ophrys reinholdi</i> ssp. <i>strausii</i> , <i>Ophrys transhyrcana</i> , <i>Ophrys holosericea</i> , <i>Ophrys phrygia</i> , <i>Ophrys schulzi</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i>
	Hakkari civarı	<i>Dactylorhiza romana</i> ssp. <i>georgica</i> , <i>D. umbrosa</i> , <i>Orchis pinetorum</i> , <i>O. tridentata</i> , <i>O. palustris</i> , <i>O. pseudolaxiflora</i> , <i>Ophrys papilionacea</i> , <i>Ophrys reinholdi</i> ssp. <i>strausii</i> , <i>Comperia comperiana</i> ,
Akdağ Madeni Salebi	Yozgat Akdağ Madeni Civarı	<i>Dactylorhiza romana</i> ssp. <i>romana</i> , <i>D. romana</i> , <i>Platanthera chlorantha</i> , <i>Orchis pinetorum</i> , <i>O. purpurea</i> , <i>O. tridentata</i> , <i>Anacamptis pyramidalis</i> , <i>Comperia comperiana</i> , <i>Himantoglossum affine</i>

Yapılan araştırmalardaki ölçümler sonucunda, Türk ticari salep yumrularının ortalama ağırlıklarının Tablo 1.3.3'deki gibi olduğu belirlenmiştir [10].

Tablo 1.3.3. Ticari Saleplerin Ortalama Yumru Ağırlığı İle Birim Ağırlıktaki Yumru Sayıları [10].

Ticari Salepler	Ortalama yumru Ağırlığı (gr)	1 kg'daki yumru Sayısı	1 ton'daki yumru Sayısı
Muğla Salebi	0,23	4348	4348000
Kastamonu Salebi	0,5	2000	2000000
Silifke Salebi	0,35	2857	2857000
Antalya Salebi	0,21	4762	4762000
Maraş Salebi	1,6	625	625000
Van Salebi	1	1000	1000000

Ticari salep çeşitleri arasında Muğla, Maraş ve Kastamonu saleplerinin kalitesinin en iyi olduğu belirlenmiştir [39].

Yumrular topraktan söküldükleri zaman ortalama 0,2-2 gr arasındadır ve 1 kg salep üretebilmek için yaklaşık 1000-5000 yumruya ihtiyaç vardır [10].

Orkide, yumrularının bir yandan insan ihtiyaçlarının giderilmesi için toplanması bir yandan da hızlı şehirleşmenin bir sonucu olarak yok edilmesinden dolayı, Anadolu'nun doğal bitki örtüsü olmaktan çıkmış, çok seyrek rastlanabilen hatta bazı bölgelerde rastlanılamayan bitkilerinden biri olmuştur [39].

Bazı Avrupa kaynaklarında yer alan bilgilere göre; 1700'lü yıllarda adından sıkça bahsedilen ve özel bir salep türü olarak bilinen Levant Salebi'nin özellikle İzmir'den ihraç edildiği yazılmış olup yine aynı kaynaklarda; Muğla, Milas ve Kastamonu bölgelerinden de salep ihracatı yapıldığına yer verilmiştir. Türkiye ekonomisinde salep ihracatının yerinin oldukça geniş bir yer kapladığı ve bu ihracat miktarının yıllık yaklaşık 5000 okka yani 6,5 ton (1 okka 1,283 kg) olduğu da aynı kaynaklarda bulunmaktadır. İhracat büyük oranda Arap ülkelerine yapılmaktadır ve bunun yanı sıra Yunanistan, İsrail ve Kıbrıs gibi ülkelere de yapılmıştır. İhracat miktarı yıldan yıla dalgalanma gösterse de bazı yıllar 15 tona kadar çıkmış olduğu gözlenmiştir [10].

Osmanlı Devleti döneminde de her yıl yaklaşık olarak 6,5 ton salebin ihraç edildiğine dair tutulan kaynaklar göz önünde bulundurulursa, orkidelerinin tahribinin asırlardır devam

ettiği ve giderek arttığı ortaya çıkmaktadır. Tahribin bu denli hızlı artması orkidelerin bulunma yoğunluğu üzerine olumsuz etki göstermiştir ve bazı bölgelerde artık rastlanmaz hale gelmiştir [40].

Bu kaybın daha ileri noktalara gitmemesi için sadece izin verilen türlerin, belli yerlerden, belli miktarda toplanmasının sağlanması için halkın bilinçlendirme çalışmalarının yapılması, doğadan toplanmadan üretiminin yapılabilmesi için araştırma ve geliştirme çalışmalarının desteklenmesi ya da ilgili hammaddenin muadilinin kullanılması gibi alternatiflere destek verilmesi gerekmektedir.

1.3.1. Salebin Kullanım Alanları Ve Eldesi

Türkiye’de sıcak içecek ve dondurma hammaddesi olarak kullanılan salep, orta kuşak orkidelerinin yumrulu türlerinden elde edilir ve Tubera Salebi olarak ya da kısaca salep olarak adlandırılır [2]. Orta kuşak orkideleri iki yumruya sahiptir. Bunlardan bir tanesi daha küçük, kahverengi ve büzüşmüş bir yapıdır. Bu yumru bir önceki yıla ait olup, içerisindeki besin maddeleri yeni yumru ve bitki gövdesini oluşturmak için bitki tarafından kullanılmıştır. Diğer yumru ise, daha büyük, şişkin ve parlak görünümlü olup bir sonraki sene yeni bitki oluşumu için ve de salep üretimi için kullanılmaktadır. Sert, şeffaf ve daha canlı görünümlü olan bu yumru türden türe değişiklik gösterse de yaklaşık 5-30 mm genişliğe ve 10-40 mm uzunluğa sahip oval bir yapıdadır [15, 17, 18].

Salep, halk arasında tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. İnsanlarda mukoza zarının korunmasına yardımcı olduğundan dolayı, solunum yollarının temizlenmesinde katkı sağlamasının yanı sıra bronşit ve mide ülseri gibi hastalıklara da yarar sağladığı bilinmektedir [13]. Bazı yörelerde de salep, göğüs yumuşatıcı kullanımına ilaveten öksürüğün azaltılmasında ve hatta çocuklardaki ishalin kesilmesinde bile yardımcı olmak amacıyla kullanılır. Ayrıca bazı kaynaklara göre İbn-i Sina, salebin iştah açıcı ve felç giderici etkisinden de bahsetmiştir [2, 10].

Salep elde etmek için çoğunlukla bitki çiçek açtığı zaman ya da taban yaprakları belirgin hale geldiği zaman özel çubuklar ya da bahçe aletleriyle çıkarılarak yumrular alınır ve geri kalan kısmı ise kullanılmamak üzere atılır.

Topraktan çıkarılan yumrular üzerlerindeki toprak kalıntılarından arındırılmak için bol su ile yıkanır. Bu yıkama işlemi sırasında salebe karıştırılan yabancı ve eski yumrular su üzerine çıkarılarak ayıklanır. Temizlenen yumrular ayran, bulunamazsa süt ya da suyla,

yaklaşık 10-15 dakika kaynatılır daha sonra soğuk su ile soğutma işlemi yapılarak ya beton üzerine ya da kilimlerin üzerine serilerek dış ile kırılmayacak kadar sertliğe ulaşana dek kurutma işlemi yapılır. Kaynatma işleminin amacı yumruların içindeki gelişimi durdurmaktır. Eğer kaynatma işlemi gerçekleştirilmezse yumrularda ki enzimatik faaliyetler başlar ve yeni bir yumru meydana getirmek için çimlenmeler oluşur. Ayrıca kaynatma işlemi salebin kendine has aroması için de oldukça önemlidir. Salep kaynatma ve kurutma işlemleri yöreden yöreye farklılık gösterebilir. Salep yumrusunun elde edildiği bölgenin şehre uzaklık ve yakınlığa göre bile değişmektedir. Örneğin şehre yakın olan bölgelerde kaynatma işlemi yapılmaksızın tüccarlara yumrular, üzerlerindeki toprak kalıntıları alındıktan sonra bile satılabilir. Kurutma işlemi ise, bazı yörelerde yumruları çeşitli zeminlere sererek yapılabildiği gibi, bazı yörelerde de yumruları boncuk gibi iğne yardımıyla iplere dizerek yapılmaktadır [2, 10, 21]



Şekil 1.3.1.1. Salep orkidesi yumrularını taze ve kuru hali

1.3.2. Salebin Kimyasal Yapısı

Piyasada bulunan salep içerisinde; glikomannan, nişasta, şeker ve proteik yapıdaki maddeler bulunur. Bu maddelerin oranları bitkinin yetiştiği yere göre değişmektedir. Yaklaşık olarak %11-44 glikomannan, %8-19 nişasta, %2-3 şeker ve %1 proteik yapıdaki maddeler bulunmaktadır. Kalitesi iyi olan bir salepte glikomannan oranı %40 civarında olmalıdır.

Salebi içtiğimiz zaman koyu kıvamını ve Maraş dondurmasının geç erimesini ve sertliğini sağlayan madde de glikomannandır [10].

Salep yapımında kullanılan ve ülkemizde doğal olarak yetişen orkidelerin kimyasal yapıları üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda türlere bağlı olarak glikomannan ve nişasta oranları Tablo 1.3.2.1. deki gibi belirlenmiştir [2].

Tablo 1.3.2.1. Bazı Orkide Türlerine Göre Glikomannan ve Nişasta Oranları [2].

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

Salep, yumrulu orkidelerden elde edilmesine karşın tüm yumrulu orkide cinsleri salep elde etme amacı için uygun değildirler. *Orchis*, *Anacamptis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Himantoglossum*, *Barlia* ve *Dactylorhiza* gibi yumrulu orkidelerin çeşitli türleri bu amaca uygundur [10].

1.4. Salep Orkidelerinin Çoğaltılması

Orkideler hem egzotik görüntülerinden hem de uzun raf ömürlerinden dolayı hem kesme çiçek hem de süs bitkisi olarak çok tercih edilirler. Orkidelerin önemli bir kullanım alanı da, salep orkidelerinde elde edilen saleptir. Her geçen gün artan salep talebini karşılamak için daha fazla orkideye ve yumruya ihtiyaç duyulmaktadır [41]. Bu ihtiyaç gün

geçtikçe artmakta ve doğal ortamlardaki tahribatlarının da artmasından dolayı salep orkideleri yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadır.

Orkidelerin doğal yolla tohumlarının oluşumu ve çimlenmeleri oldukça zor ve uzun zamana ihtiyaç duymaktadır. Orkide tohumları toz gibi bir yapıdadır ve tek bir tohumun gözle görülmesi bile güçtür [24]. Tek zorluk küçük tohuma sahip olması değildir, bu tohumların çimlenebilmeleri için ihtiyaçları olan besin dokusu yani endospermli yoktur, yani diğer tohumlar gibi çimlenebilmek için gerekli olan ısı, ışık, nem ve sıcaklık gibi faktörler en uygun düzeyde ayarlanmış olsa bile orkideler bir de mikoriza funguslarına ihtiyaç duyar. Çeşitli kaynaklara göre bu fungusların bitkideki görevleri değişmektedir. Bazı kaynaklarda, orkide embriyolarının çimlenmek için ihtiyaç duydukları enerjiyi bu funguslarla işbirliği sonucunda elde ettiğinden bahsedilirken, bazı kaynaklarda da orkide türlerinin yaşamlarının en azından bir bölümünün bu funguslarla işbirliği içinde olmak zorunda olduğunu belirtmektedir [10, 42].

Bazı kaynaklarda bitki çimlenme sonrasında yeşil yapraklarında barındırdığı kendi klorofili sayesinde fotosentez yaparak kendi besinini üretmeye başladıktan sonra bile, bu fungusa bağımlılığı bir yaşam boyunca simbiyotik olarak yani sürekli beraber yaşayarak devam eder [10]. Bu simbiyotik yaşam sonucu tohum çeşitli bölünmelerle oluşturacağı çivi şeklindeki mikorizom ya da yumru adı verilen yapıları oluşturabilmek için öncelikle kendisine uygun bir yere tutunur, su alır ve ilk sürgününü verir [43]. Sürgünler oluşuktan sonra bu çivi şeklindeki yapıların tutunmasına yardımcı olabilmek için grup halinde kök tüyler oluşturur. Bir iki yıl süre ile bu simbiyotik yaşam biçimi devam eder ve apikal meristemden ilk yaprağını vererek bitki gelişmeye başlar [10]. Fungus bulunduğu ortamdaki organik humusun parçalanması sonucu oluşan nişasta ve benzeri diğer bileşikler şeker haline çevirerek genç orkide bitkisine yönlendirmektedir [43]. Ayrıca fungus çok miktarda hif üreterek bitkinin kökünün yüzey alanının büyümesini sağlayıp kökten çok uzak bölgelerde bulunan besinlerin alınmasına yardım etmektedir [44, 45]. Bu funguslara daha çok humuslu topraklarda rastlanır. Kayın, huş, meşe ve çam gibi pek çok ağacın köklerinde yaşarlar. Orkidelerin de çoğunlukla o bölgelerde bulunmasının temel sebeplerinden biri de budur [10].

Bir orkide tohumundan ergin bir orkide bitkisinin oluşması için yaklaşık 2-16 yıl arasında beklemek gerekmektedir [31]. Ayrıca bitki tohumlarıyla çoğaltım yapılması sonucunda daha çok heterozigot yani farklı genler taşıyan bitkiler elde edilmiştir. Bu istenilmeyen bir durumdur. Gerek sürenin fazlalığı ve gereksede tohumların çok küçük olup çimlenmelerinin

çok zor olmasından dolayı in vitro üreme orkidelerin çoğaltılması için uygun alternatif bir yöntemdir [46-48].

Doku kültür teknikleri, orkidelerin tehlike altında olan türlerinin ve temel olarak nadir rastlanan hibritlerinin büyük ölçekli çoğaltılmasına imkan sağlayabilecek bir metottur [41]. Orkidelerin kök, yaprak, kök ucu, nod, tomurcuk, çiçek, rizom ve yumru gibi çeşitli kısımlarını eksplant kaynağı olarak kullanarak yapılmış olan pek çok in vitro çoğaltım çalışmaları vardır [49-58]. Yapılan bu çalışmalarda, saçak kök ya da tohumdan gelişen yeni bitkilerde yapılan karşılaştırmada, yumrularla yapılan çalışmaların verimliliğinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir çünkü yumru katı ya da sıvı kültür ortamlarında hızlıca üreyebilir ve kısa süre içerisinde büyük oranda gelişme sağlanır [59].

Orkide yumrusunun eksplant kaynağı olarak kullanıldığı mikroçoğaltım proseslerini geliştirmek için önemli çalışmalar yapılmıştır [60, 61]. Yapılan mikroçoğaltım çalışmalarında daha etkili sonuçlar almak ve gelişmeyi arttırmak için kültür ortamına bitki büyüme düzenleyicileri eklenmektedir [62, 63]. Yumruların etkili bir şekilde çoğaltımı için kültür ortamına Benzil amino pürin (BAP), Naftalin Asetik Asit (NAA), indol asetik asit (IAA) ve giberellik asit gibi bitki büyüme düzenleyicileri eklenir [64-68]. Sitokininler yumrudan bitki gelişmesi aşamasında oldukça etkilidirler [59, 62, 69].

1.5. Önceki Çalışmalar

Bir orkide türü olan *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr bitkisi tohumlarından yapılan kültürde MS besin ortamına 2 mg/L BAP ve 2 mg/L NAA ekleyerek en iyi sonucu almışlardır. Yine aynı çalışmada kök sisteminin gelişmesi için ise %3 sükröz içeren MS besin ortamına 1 mg/L IAA ya ilaveten %0,1 aktif karbon ilavesinin yapılmasıyla başarı elde edilmiştir [49].

Süs bitkisi alanında yaygın kullanımlı *Phalaenopsis* bitkisinin sürgün ucu dokularından yumru elde etmeyi amaçlayan bu çalışmada, sürgün ucundan alınan ince hücre kesitinden yumru oluşumunu arttırmak için ortama 2,75 µM NAA eklemesi yapılmasının ardından gelişmelerde başarılı sonuçlar alınmıştır [70].

Eksplant kaynağı olarak *Vanilla planifolia* bitkisinin yaprak ve nod kısımlarının kullanıldığı çalışmada, yaprak eksplantları nod eksplantlarından daha iyi bir şekilde kallus

oluşturmuştur. Bu kallus oluşumu için MS besin ortamına 2,4D ve BAP eklenmiştir, kalluslar oluştuktan sonra BAP ve NAA içeren MS besin ortamına transferinden 40 gün sonra sürgünler oluşmuş ayrıca bu sürgünler NAA ve IAA içeren ortamlara transfer edilince de kök oluşumu gözlenmiştir [51].

Vanilla planifolia bitkisiyle yapılan bir başka çalışmada ise; bitki tomurcuklarının sterilizasyonu için %7 lik etanol de 30 sn ve %0,12 lik cıva klorürde 10 dk bekletip birkaç defa steril sudan geçirilerek yıkanmasıyla sterilizasyon protokolü oluşturulmuştur. Bu çalışmada steril edilen tomurcuklar 30 gr/L süktroz, %0,8 agar, 1mg/L BAP ve 150 ml/L Hindistan cevizi suyu eklenmiş MS besin ortamında sürgünlerinin köklendiği ve yumrularının oluştuğu gözlenmiştir [52].

Juliana ve arkadaşlarının, *Oncidium flexuosum*'in yapraklarını materyal kaynağı olarak kullandıkları ve yumru üretimi yaptıkları çalışmalarında, MS besin ortamına 1,5µM TDZ ilave edilerek ekimler yapılmış ve kültür kapları karanlık ortamda bekletilerek en iyi sonuçlar alınmıştır. Aynı kültür kapları aydınlık ortama konulunca ölümler meydana gelmiştir [55].

NAA ya da NAA ve Kinetin bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarının bulunduğu MS besin ortamına, *Dendrobium huoshanense* bitkisinin yumrularının ekimleri yapıldıktan sonra kök hücreleri üretilmiş. Aynı kültür şartlarında sıvı MS besin ortamına ekilen eksplantlarda kök hücrelerinin gelişmesi 4. haftada başlamıştır [59].

Dendrobium formosum bitkisinin yapraklarından kallus ve yumru oluşumu üzerinde bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisinin araştırıldığı çalışmada ise, kallus oluşumunun 1 mg/L 2,4D BBD içeren MS ortamında en iyi sağlandığını ve yumrulardaki gelişimin ise 2,5 mg/L BAP ile 1ve 2 mg/L NAA içeren MS besin ortamında en iyi olduğunu bulmuştur [69].

Subramaniam ve arkadaşları, *Phalaenopsis violacea* bitkisinin nod kısımlarını farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BBD içeren MS besin ortamına ekmiş ve en iyi sonucu BAP olan MS besin ortamında gözlemlemişlerdir (0,8µM ve 1µM BAP içeren besin ortamlarında da %100 sürgün) [68].

MS, yarı kuvvetteki MS (1/2 MS), VanWaes&DeBergh ve Knudson C (KC) besin ortamlarına GA₃ ' ün farklı dozları (0, 0.1, 0.5 mg/l)' nın ilave edilmesiyle kurulan bu çalışma ortamında *Orchis laxiflora* türüne ait tohumların asimbiyotik olarak *in vitro* koşullarda çimlendirilmesi ve bitkiye dönüşümü amaçlanmış ve en yüksek çimlenme oranı, protokorm

oranı ve bitki gelişme oranı KC ile VanWaes&DeBergh besin ortamından elde edilmiştir. GA₃ uygulamaları çimlenmeyi engelleyici etkide bulunmuştur [71].

Ocrhis anatolica Boiss, *Orchis coriophora* L., *Ophrys bornmuelleri* Schulz, *Ophrys phrigra* Fleischm. et Borm, *Serapias vomeraceae* ve *Himantoglossum affine* bitkileri embriyo kültürü kullanılarak in vitro'da kültüre alınmışlardır. Orkide embriyolarının kültüre alınmasında 14 farklı ortam kullanılmış ve en yüksek çimlenme ve protokormdan bitki oluşum oranları sırasıyla %2.39 ve %1.86 olarak domates ekstratı ve aktif karbon ilaveli Van Waes& DeBergh besin ortamında bulunmuştur. In vitro'da en yüksek yumru oluşum oranı ise %2.453 ile aynı ortamda saptanmıştır [72].

1.6. *Orchis laxiflora*

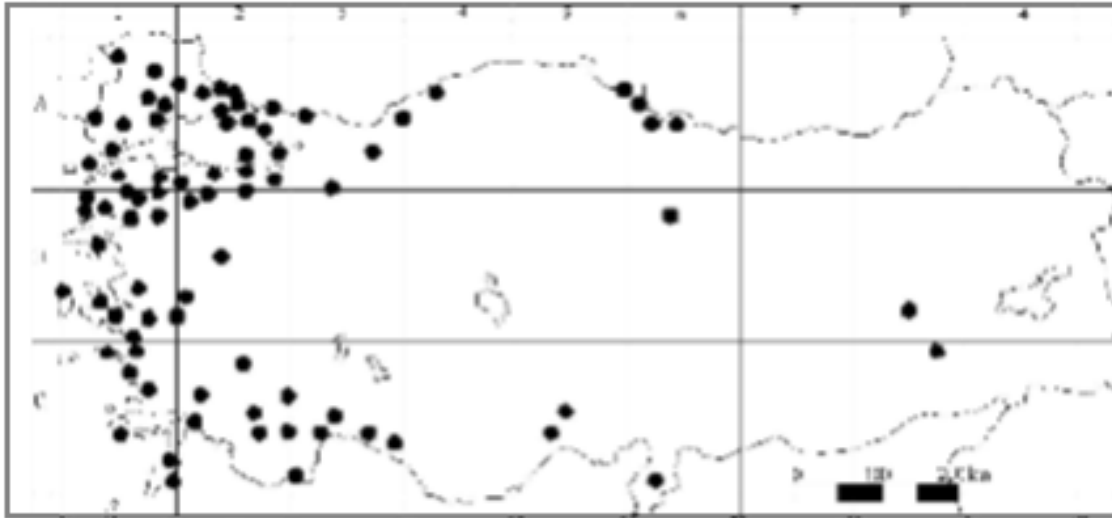
Orchis laxiflora nemli topraklarda, ıslak ve bataklık alanlarda, 13-19 °C sıcaklıklarda, yarı kuru ve yarı nemli hava koşullarında yetişmektedir. Boyu 30-60 cm e kadar uzayabilen, otsu yapılı, çok yıllık bir bitkidir. Morumsu bir çiçek yapısı bulunup, keskin ve kötü bir kokuya sahiptir. Bitki her yıl Mayıs ve Haziran aylarında çiçeklenmektedir.

Tür henüz kırmızı kitapta herhangi bir kategoride bulunmamaktadır. Ancak yumrularından salep elde etmek için bitkinin yasal olmayan şiddetli sökümlerinden dolayı tür gittikçe azalmakta ve kırmızı kitaptaki kategorilere girmeye aday bir bitki konumunda olmaktadır.



Şekil 1.6.1. *Orchis laxiflora* bitkisi

Tür, toprak minerali açısından, potasyum (60.6 kg/da), organik madde(%2.7), kireç değeri çok yüksek olan tınlı topraklarda yetişmektedir. *Orchis laxiflora* türünün Türkiye’de dağılımı Şekil 1.6.2’de verilmiştir.



Şekil 1.6.2. *Orchis laxiflora* türünün Türkiye’de dağılımı

Ülkemizde salep eldesinde yaygın olarak kullanılan *Orchis laxiflora*, diğer birçok orkide türü gibi yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır. Bu çalışma ile *Orchis laxiflora* bitkisi yumrularından elde edilen sürgünler eksplant kaynağı olarak kullanılarak in vitro ortamda yumru oluşturmak üzere çeşitli çalışmalar yapılacak ve BBD lerin yumru oluşumu üzerine olan etkileri araştırılacaktır. Çalışmalar sonunda etkin bir protokol oluşturulup, in vitro

ortamda oluşturulan bu yumrular sayesinde ülkemizdeki salep üretimine katkı sağlanması da amaçlarımız arasındadır.



2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

Bu çalışmadaki orkide (*Orchis laxiflora*) yumruları, Elazığ ili Sivrice ilçesi Başkaynak (Keydan) Köyü (38°22'37.68''K, 39°22'04.96''D)'nden temin edilmiştir.



Şekil 2.1.1. Orkidelerin temin edildiği Elazığ ili, Sivrice ilçesi, Başkaynak köyü uydu görüntüsü

Bölgeden temin edilen yumrular için Elazığ Orman Bölge Müdürlüğü ve Tarım İl Müdürlüğü'nden alınan izinler kapsamında (Eklerde) doğadan toplanılmıştır. Orkidelerin bulunduğu bölgeye yetkili kişilerle beraber farklı zamanlarda geziler yapılmış (Mayıs 2015 ve Haziran 2015), uygun yumruların toplanabilmesi için yeterli olgunluğa ulaşması beklenmiştir. Bölge ve tür koruma altında olduğundan dolayı çok sayıda materyal alınamamış sadece alınan izinler doğrultusunda belirli sayılarda (20 adet yumru) söküm yapılabilmektedir.



Şekil 2.1.2. *Orchic laxiflora* yumruları



Şekil 2.1.3. Temizlenip ayıklanmış yumru

2.2. Metot

2.2.1. Kullanılan MS Besin Ortamı ve Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Besin ortamının hazırlanması için, temel besiyeri olarak Murashige and Skoog (MS) (Duchefa), karbon kaynağı olarak sükroz (Carlo Erba), jelleştirici olarak, plant agar (Duchefa) kullanıldı. Bitki büyüme düzenleyicilerinden ise; Benzil Amino Pürin (BAP) (Roth), Naftalin Asetik Asit (NAA) (Caisson), İndol Bütirik Asit (IBA) (Merck), İndol Asetik Asit (IAA)

(Merck), Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) (Acros) ve Pikloram (P) (Duchefa)' dan kullanılmak üzere besin ortamı için stok solüsyonları hazırlandı.

2.2.2. Besin Ortamının İçeriği ve Hazırlanması

Tablo 2.2.2.1. MS Ortamı İçeriği

Bileşenler	mg/L
Amonyum nitrat	1.650.0
Borik asit	6.20
Kalsiyum klorit	332.20
Kobalt klorit hegzahidrat	0.0250
Sülfirik sülfat penta hidrat	0.0250
Disodyum EDTA dihidrat	37.26
Demir sülfat heptahidrat	27.80
Glisin	2.0
Magnezyum sülfat	180.70
Magnezyum sülfat monohidrat	16.90
Myo-inisitol	100.0
Nikotinik asit	0.50
Potasyum iyodür	0.830
Potasyum nitrat	1.900.0
Mono potasyum fosfat	170.0
Piridoksin hidroklorit	0.50
Sodyum molibdat dihidrat	0.250
Tiamin hidroklorit	0.10
Çinko sülfat heptahidrat	8.60

Besin ortamı hazırlanmasında öncelikle; 1 litrelik ortam için, % 3 sukroz ve 4,4 gr MS hassas terazi (SHIMADZU TXB622L)'de tartıldı ve manyetik karıştırıcı (JEIO TECH TM-14S ve ISOLAB MS-010)'da karıştırılarak homojen bir karışım elde edildi. Ardından pH-metre (THERMO SCIENTIFIC ORION STAR A111) yardımıyla pH ölçümü yapılarak, pH; 1N HCl veya 1N NaOH ile 5.7-5.8'e ayarlandı. pH ölçümünün ardından % 0,8'lik plant agar tartılarak karışıma eklendi. Hazırlanan bu besin ortamı yüksek sıcaklık ve basınca dayanıklı magenta kaplarına döküldü. Bitki büyüme düzenleyicisiz MS besin ortamı, yumrulardan sürgün rejenerasyonu için hazırlandı.

Filizlerden yumru eldesi için ise, MS' li besin ortamına plant agar eklendikten sonra son olarak farklı konsantrasyonlarda BAP, NAA, IAA, IBA, 2,4-D ve Picloram olmak üzere farklı bitki büyüme düzenleyicileri uygun mikropipetler (BRAND) aracılığıyla eklendi (Tablo 2.2.2.2).

Bitki büyüme düzenleyicileri de eklendikten sonra besin ortamları 121°C'de 15 dak otoklavlandı (JEIO TECH ST-85G). Otoklavlanan besin ortamları Laminer Flow kabin (THERMO SCIENTIFIC S2020 1.2)'e koyularak soğuyup katılaşması için beklenildi.

Tablo 2.2.2.2. Yumru Oluşumu İçin Kullanılan Besiyerlerindeki BBD'lerin Konsantrasyonları

Grup	BAP	2,4D	IBA	IAA	NAA	P
1	1	0,5				
	1	0,25				
	1	0,1				
	0,5	0,52				
	0,5	0,25				
	0,5	0,1				
2	1		0,5			
	1		0,25			
	1		0,1			
	0,5		0,5			
	0,5		0,25			
	0,5		0,1			
3	1			0,5		
	1			0,25		
	1			0,1		
	0,5			0,5		
	0,5			0,25		
	0,5			0,1		
4	1				0,5	
	1				0,25	
	1				0,1	
	0,5				0,5	
	0,5				0,25	
	0,5				0,1	
5	1					0,5
	1					0,25
	1					0,1
	0,5					0,5
	0,5					0,25
	0,5					0,1

2.2.3. Sterilizasyon işlemleri

İn vitro doku kültürü çalışmalarında sterilizasyon işlemleri çok önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada da toprak altı organı olan yumrular materyal olarak kullanıldığı ve mikroorganizma bakımından oldukça zengin oldukları için çalışmaya başlamadan önce sterilizasyon işleminin yapılıp, yumruların mikroorganizmalardan arındırılması ve ekim sırasında kullanılacak malzemelerin sterilizasyonunun iyi yapılması gerekmektedir.

2.2.3.1. Ekim Sırasında Kullanılacak Malzemelerin Sterilizasyonu

Ekim sırasında ön sterilizasyon işleminden sonra Laminer Flow kabinde yapılacak olan yüzey sterilizasyonu ve ekim işlemi için gerekli olan; beher, bistüri, pens, fayans (materyallerin kesimi için) gibi malzemelerin sterilizasyonu 200°C’de Kuru Hava Sterilizatörü (JEIO TECH ON-21E)’nde yapıldı.

2.2.3.2. *Orchis laxiflora* Bitkisi Yumrularının Ön Sterilizasyon İşlemi

Ön sterilizasyon işleminde topraktan toplanan yumru üzerindeki toprak kalıntılarını uzaklaştırmak için öncelikle musluk suyu ile yıkanır. Ardından 2-2,5 saat akan musluğun altında bekletildi.

2.2.3.3. *Orchis laxiflora* Bitkisi Yumrularının Yüzey Sterilizasyonu

Orkide bitkisi yumrularının yüzey sterilizasyonu için birçok farklı sterilizasyon protokolü uygulandı. Bunlar arasında sterilizasyonun en yüksek düzeyde sağlandığı protokol belirlenmeye çalışıldı.

1. 2 dakika %70 lik etanol + 2 defa steril saf su + 20’şer dakika birkaç damla tween 80 içeren %5, %10, %30 luk sodyum hipoklorit + 5’er dakika 3 defa steril saf su
2. Sırasıyla 5, 10, 20 dakika %1 ve %5 lik gümüş nitrat çözeltisi + 5 er dakika 3 defa steril saf su
3. 5 dakika %70 lik etanol + 2 defa steril saf su + 10, 20 dakika %30 luk hidrojen peroksit + 5 er dakika 3 defa steril saf su

Protokolleri uygulandı.

Tablo 2.2.3.3.1. Yüzey Sterilizasyonunda Kullanılan Maddeler, Uygulama Süreleri ve Konsantrasyonları

	Sterilizatör	Konsantrasyon(%)	Zaman (dakika)
T1	Sodyum hipoklorit (NaOCl)	5	20
T2	Sodyum hipoklorit (NaOCl)	10	20
T3	Sodyum hipoklorit (NaOCl)	30	20
T4	Gümüş nitrat (AgNO ₃)	1	5
T5	Gümüş nitrat (AgNO ₃)	1	10
T6	Gümüş nitrat (AgNO ₃)	1	20
T7	Gümüş nitrat (AgNO ₃)	5	5
T8	Gümüş nitrat (AgNO ₃)	5	10
T9	Gümüş nitrat (AgNO ₃)	5	20
T10	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	30	10
T11	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	30	20

2.3. *Orchis laxiflora* Bitkisinin Yumrularının Kültüre Alınması

2.3.1. BBD'siz MS Besin Ortamında Sürgün Rejenerasyonu

Doku kültürü çalışmalarında kullanılacak olan sürgün eksplantlarının temini için sterilize edilen yumrular tüm bir şekilde MS besin ortamı bulunan magenta kaplarında, 24 (±2) °C sıcaklık (18000 ve 12000 BTU luk klimalar ile sağlanan) ve 3000 lux şiddetinde ışık ile sağlanan 16/8 ışıklandırma periyodundaki kültür koşullarında kültüre alındı. Uygun sürgün uzunluğu (en az 2,5 cm) elde edilene kadar bu besin ortamında kültüre devam edildi.



Şekil 2.3.1.1. BBD'siz MS besin ortamına ekilen yumru

2.3.2. Sürgün Uçlarından Yumru Rejenerasyonu

Uygun sürgün uzunluğu elde edildikten sonra sürgünlerden küçük parçalar (1-2 cm) halinde kesilip alınan eksplantlar Tablo 2.2.2.2'de ki BBD konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamında, yumru oluşumu için 24 (± 2) °C sıcaklık ve 3000 lux şiddetinde ışık ile sağlanan 16/8 ışıklandırma periyodundaki kültür koşullarında kültüre alındı.



Şekil 2.3.2.1.Laminer flow kabinde sürgün oluşturmuş yumru



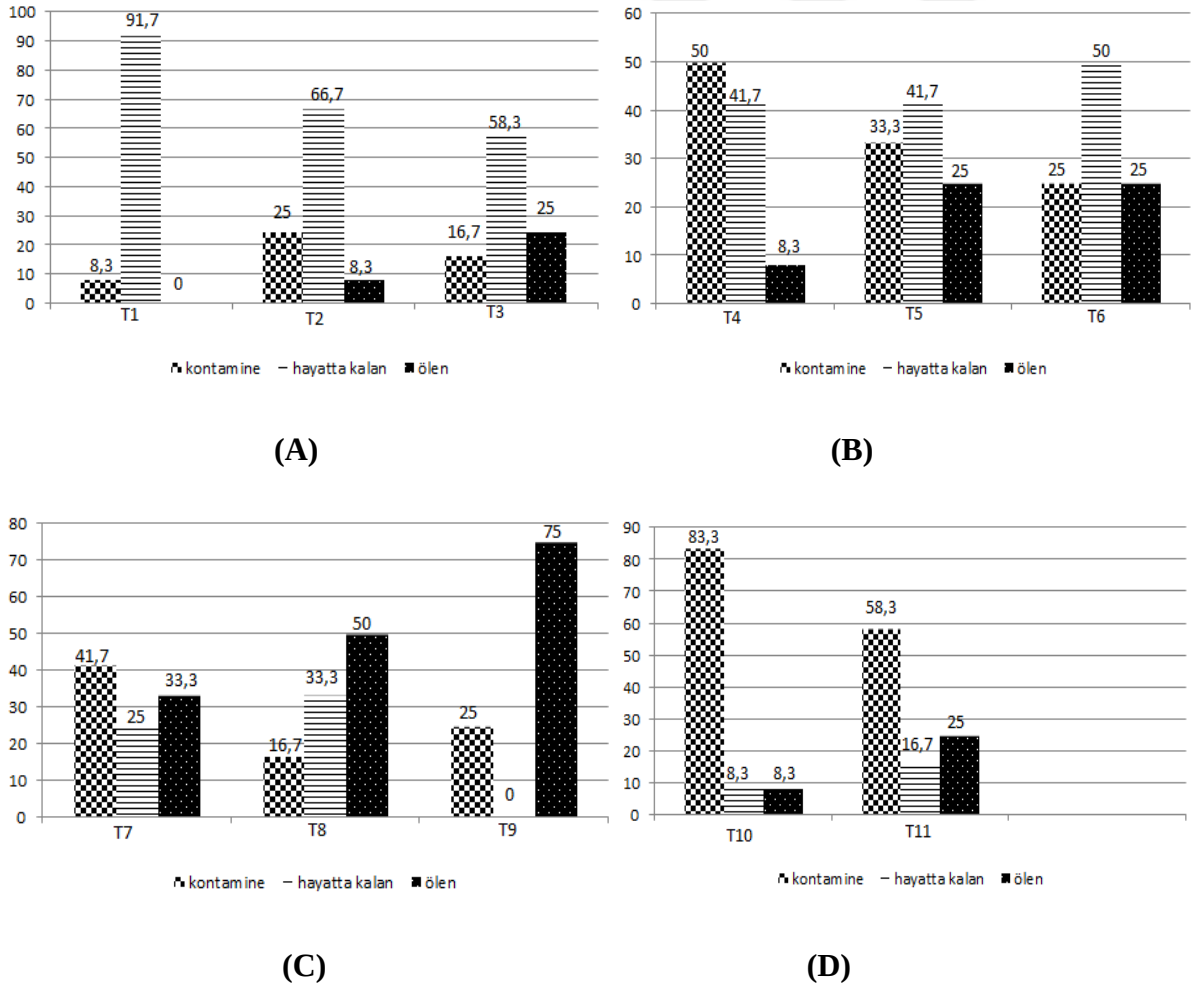
Şekil 2.3.2.2. Kültüre alınmak için kesilmiş sürgün kısımları

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Sonuçlar

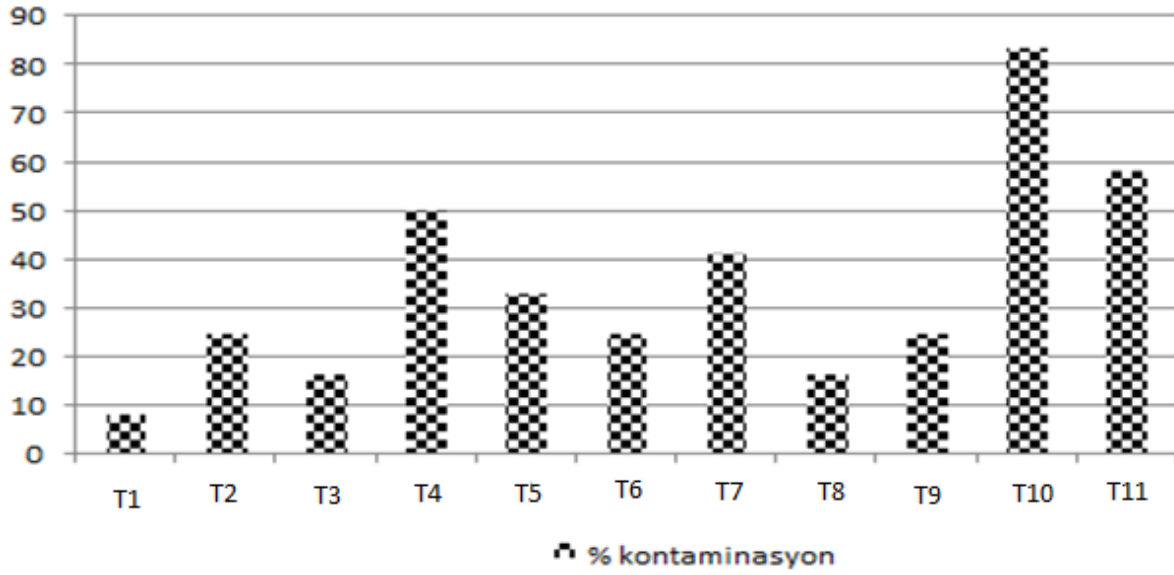
3.1.1. *Ochis laxiflora* Bitkisi Yumrularının Sterilizasyon Sonuçları

Farklı süre ve konsantrasyonlarda kullanılan yüzey sterilizatörleri ile muamele edilen materyaller ekim gününden sonra ilk iki hafta her gün, sonraki haftalarda iki günde bir olmak üzere kontrolleri yapıldı ve kontaminasyonları kaydedildi.

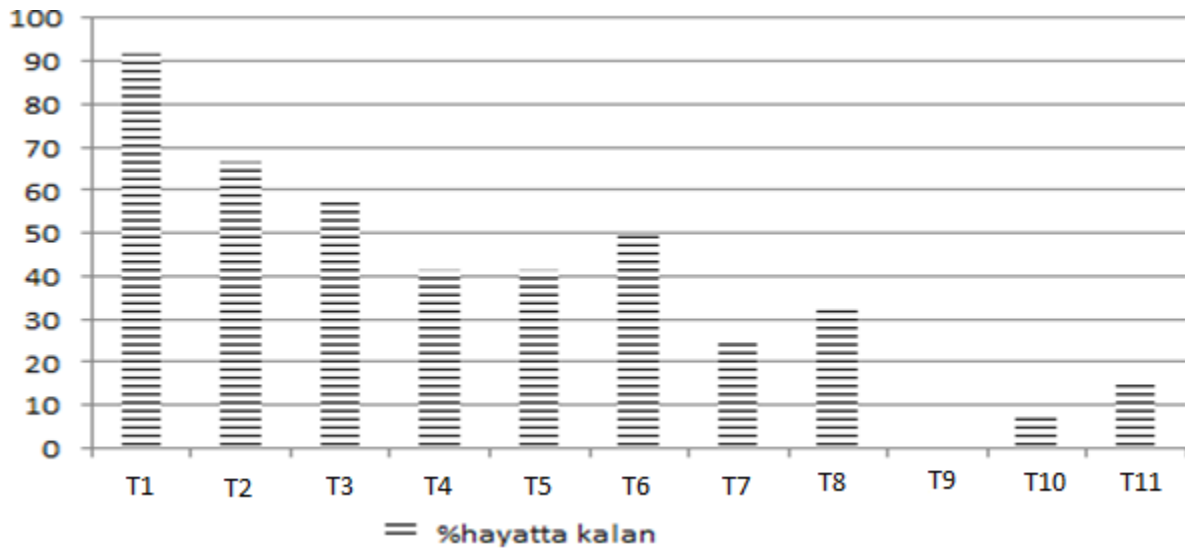


Şekil 3.1.1.1. *Ochis laxiflora* bitkisinde denenen farklı sterilizasyon maddelerinin yüzde olarak etkisi: (A) NaOCl, (B) %1 AgNO₃, (C) %5 AgNO₃, (D) %30 H₂O₂

Şekil 3.1.1.1’de de görüldüğü üzere sterilizasyon ile ilgili yapılan uygulamalar arasında T1 uygulaması % 91,7 hayatta kalan eksplant ile % 8,3 kontamine olmuş eksplant içerdiğinden dolayı en iyi uygulama olmuştur. Bunun yanında T2 ve T3 uygulamalarında da iyi sonuçlar gözlemlenmiştir. Ancak diğer uygulamalarda oldukça yüksek kontaminasyon ve ölüm oranları gözlenmiştir..



Şekil 3.1.1.2. Farklı sürelerde uygulanan çeşitli konsantrasyonlardaki sterilizasyon maddelerinin uygulanma zamanından sonraki gözlemlenen % kontaminasyon grafiği



Şekil 3.1.1.3. Farklı sürelerde uygulanan çeşitli konsantrasyonlardaki sterilizasyon maddelerinin uygulanma zamanından sonraki gözlemlenen % hayatta kalan grafiği

Şekil 3.1.1.2 ve Şekil 3.1.1.3’ deki sonuçlar değerlendirildiğinde, en kötü sterilizasyonun ise T9 ve T10 uygulamalarında olduğu gözlemlenmiştir.

3.1.2. *Orchis laxiflora* Bitkisi Yumrusundan Sürgün Rejenerasyonu

BBD’siz MS besin ortamına ekilen yumrular 45 gün içinde sürgünlerini oluşturarak yumru rejenerasyonu için istenilen uzunluğa gelmiştir.



Şekil 3.1.2.1. Sürgün oluşturan *Orchis laxiflora* yumrusu

3.1.3. *Orchis laxiflora* Bitkisi Sürgünlerinden Yumru Rejenerasyonu

BBD içeren MS besin ortamına aktarılan sürgün parçalarında, 30 gün sonra yumru oluşumu gözlenmeye başlanmıştır. Besin ortamına eklenen BBD'lerin kombinasyon ve konsantrasyonundaki değişikliklere bağlı olarak yumru rejenerasyonunda farklılıklar gözlenmiştir (Tablo 3.1.3.1).

Tablo 3.1.3.1. Bitki Büyüme Düzenleyicilerine Bağlı Olarak % Yumru Rejenerasyonu

Bitki Büyüme Düzenleyicileri						% Yumru Rejenerasyonu
BAP(mg/L)	2,4D(mg/L)	IBA(mg/L)	IAA(mg/L)	NAA(mg/L)	P(mg/L)	
1	0,5					16,67
1	0,25					8,33
1	0,1					-
0,5	0,5					-
0,5	0,25					-
0,5	0,1					8,33
1		0,5				16,67
1		0,25				-
1		0,1				16,67
0,5		0,5				-
0,5		0,25				-
0,5		0,1				-
1			0,5			41,67
1			0,25			-
1			0,1			16,67
0,5			0,5			41,67
0,5			0,25			25
0,5			0,1			-
1				0,5		41,67
1				0,25		25
1				0,1		-
0,5				0,5		91,67
0,5				0,25		-
0,5				0,1		16,67
1					0,5	41,67
1					0,25	25
1					0,1	8,33
0,5					0,5	16,67
0,5					0,25	33,33
0,5					0,1	66,67

Tablo 3.1.3.1’de de görüldüğü üzere en iyi gelişme %91.67 oranla 0,5mg/L BAP ile 0,5mg/L NAA kombinasyonunun olduğu MS besin ortamı içerisinde gerçekleşmiştir. Bu besin ortamı içerisindeki sürgün parçalarından yumru oluşumu 30 gün içinde gözlenmeye başlanmıştır ve yumru oluşumu tam olarak 60. günde gözlenmiştir. 0,5mg/L BAP ile 0,1mg/L Pikloram kombinasyonunun olduğu besin ortamında ise ikinci en iyi gelişim (%66.67) gözlemlenmiştir.



Şekil 3.1.3.1. Ekim yapıldıktan 2 hafta sonraki gelişme



Şekil 3.1.3.2. Ekim yapıldıktan 3 hafta sonraki gelişme



Şekil 3.1.3.3. Ekim yapıldıktan 4 hafta sonraki gelişme



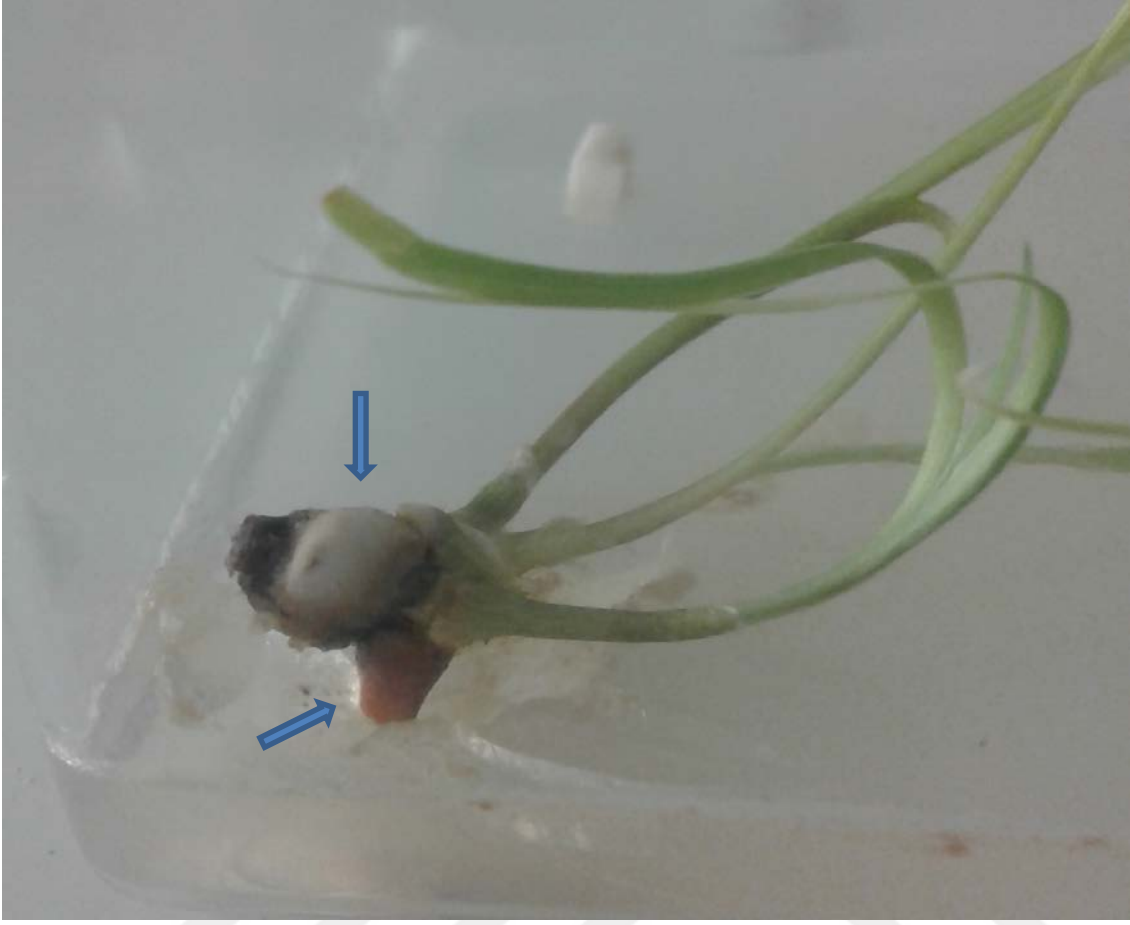
Şekil 3.1.3.4. Ekim yapıldıktan 5 hafta sonraki gelişme



Şekil 3.1.3.5. Ekim yapıldıktan 6 hafta sonraki gelişme



Şekil 3.1.3.6. Ekim yapıldıktan 8 hafta sonraki gelişme



Şekil 3.1.3.7. Ekim yapıldıktan 10 hafta sonraki gelişme

3.2. Tartışma

Belli bir sıra ile ilerleyen çalışmamızda öncelikli olarak uyguladığımız sterilizasyon programında çeşitli sonuçlar elde ettikten sonra en uygun olan protokolü ilerleyen aşamalar için kullandık. Bu sterilizasyon protokolleri arasından en iyi sonuç aldığımız yani kontaminasyonun en az olduğu protokol T1 (%5'lik NaOCl de 20 dakika)'dır (%8,3 kontaminasyon). T9 (%5'lik AgNO₃ 20 dk) ve T10 (%30'luk H₂O₂ 10 dk) protokollerinde ise kontaminasyon çok fazla olmuştur (T9' da %75, T10 da %88,3). T9 protokolünde ise hayatta kalan materyal olmamıştır.

Çalışmamızın ilerleyen basamaklarında T1 protokolü kullanılarak steril edilen yumrular MS ortamında sürgün oluşturulduktan sonra bu sürgün parçalarının BBD'li MS besin ortamına ekilmesi sonucunda da yumru oluşumları gözlemlendi. Bu yumru oluşumları sırasında ortamdaki BBD miktarları ve çeşitleri önemli derecede değişikliklere sebep oldu. Yapılan çalışmada en iyi gelişme 0,5 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA BBD'lerinin olduğu besin

ortamlarındaki sürgünlerde gözlenmiştir. Bu besin ortamındaki sürgünler 30 gün sonra yumru oluşturmaya başlamış ve yumru oluşum oranı en yüksek olmuştur. En kötü gelişme ise, BAP ile kombine edilmiş 2,4D ve IBA BBD'lerinde olmuştur.

Çalışmamızda kullanılan orkide türü ve diğer orkide türleri üzerinde önceki yıllarda farklı araştırmacılar tarafından yapılmış araştırmalar bulunmaktadır.

Vanilla planifolia bitkisinin tomurcuklarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada olumlu sonuç alınan sterilizasyon maddesi (civa klorür)olmasına rağmen, *Orchis laxiflora* bitkisi yumrularının sterilizasyonunda aynı maddeden olumlu sonuç alınamamıştır [52].

Bitkinin nod kısımlarının materyal olarak kullanıldığı çalışmada, sürgün oluşumu MS besin ortamına eklenen BAP yardımıyla olmuşken, bizim çalışmamız da sürgün oluşumu BBD' siz MS besin ortamında gerçekleşmiştir [68].

Dendrobium formosum bitkisinin yumrularından sürgün oluşumu üzerine BBD lerin etkilerinin araştırıldığı çalışmada 2,5 mg/L BAP ile 1 ve 2 mg/L NAA BBD'lerinin olduğu besin ortamlarında en iyi sürgün oluşumu gözlemlenmiştir. Oysa bizim sonuçlarımız yumrulardan sürgün oluşumu için BBD'siz MS ortamının yeterli olduğunu göstermiştir [69].

Geodorum densiflorum bitkisinin tohumlarının materyal olarak kullanıldığı çalışmada sürgün rejenerasyonu açısından en iyi sonuç 2mg/L BAP ve 2mg/L NAA BBD'lerinin kombinasyonundan elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda tohum yerine sürgünler eksplant kaynağı olarak kullanılmasına rağmen, aynı hormonların farklı konsantrasyonları (0,5mg/L BAP ve 0,5mg/L NAA) ile en iyi sonuç elde edilmiştir[49] .

Orchis laxiflora bitkisinin sürgünlerini eksplant olarak kullandığımız çalışmamızda sürgünden yumru oluşumu 30. günden sonra başlamıştır. Bir başka orkide türü olan *Vanilla planifolia* bitkisinin hem yaprakları hem de nod kısımlarının materyal olarak kullanıldığı çalışmada yaprak eksplantlarından kallus oluşturulmuş ve bu kalluslar BBD' li (BAP ve NAA) besin ortamına aktarıldıktan 40 gün sonra sürgünler oluşmaya başlamıştır [51].

Kültür ortamında ışık kaynağının olup olmaması sonuç almada etkilidir . Örneğin, *Oncidium flexuosum* bitkisi yapraklarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada, en iyi sonuçlar karanlık ortamda yapılan denemelerde alınırken, bizim çalışmamızda ise 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyodu ile yapılan ışıklandırma ile olumlu sonuçlar alınmıştır [55].

Sıvı besin ortamı (MS) kullanılan çalışmada *Dendrobium huoshanense* bitkisinin yumrularından kök hücrelerinin gelişimi 4. haftadan itibaren başlamıştır. Bizim çalışmamızda

da agarlı yani yarı katı besin ortamında (MS) sürgünlerden yumru gelişmelerin gözlenmesi 4. haftadan itibaren başlamıştır [59].

Orchis laxiflora bitkisinin tohumlarının materyal olarak kullanıldığı çalışmada TDZ (Thidiazuron) BBD'sinin olduğu ortamda olumlu gelişmeler gözlenmiştir. Aynı türün sürgünlerini eksplant olarak kullandığımız çalışmamızda ise bu BBD yi kullanmadık [71].

Yapılan bir diğer çalışmada, besin ortamı olarak bizim çalışmamızdan (MS besin ortamı) farklı olarak Van Waes Deberg besin ortamının kullanılmış, *Ocrhis anatolica* Boiss, *Orchis coriophora* L., *Ophrys bornmuelleri* Schulz, *Ophrys phrigra* Fleischm. et Borm, *Serapias vomeraceae* ve *Himantoglossum affine* bitkilerinin in vitro embriyo kültürü yapılmıştır. Besin ortamına eklenen domates ekstraktı ve aktif karbonun olumlu etkileri gözlenmiştir [72].

Erodium somanum bitkisinin tohumlarının çimlendirilmesiyle elde edilmiş olan yaprak ve yaprak saplarının materyal olarak kullanıldığı çalışmada, BAP ve bizim çalışmamızda iyi gelişim göstermeyen IBA kombinasyonunun bitki büyüme düzenleyicisi olarak bulunduğu ortamlarda gelişmeler gözlenmiştir [73].

Çalışmamızda kullanılan eksplant kaynağından(sürgün) farklı olarak *Rhynchoctylis retusa* bitkisinin anterlerinin kullanıldığı çalışmada, zenginleştirilmiş Sharma besin ortamı kullanılmış ve en iyi sonuçlar ise yine bizim çalışmamızdan farklı olarak 24 saat boyunca 4°C de karanlık ortamda bekletilen kültürlerden alınmıştır [74].

Çalışmamızdaki MS besin ortamından farklı olarak aktif karbon ilaveli Orchimax besin ortamının kullanıldığı çalışmada, *Orchis coriophora* bitkisinin olgunlaşmış tohumlarında 1mg/L IAA'nın bulunduğu ortamda en iyi çimlenme gözlemlenmiştir [75].

Orchis laxiflora bitkisi sürgünlerini eksplant olarak kullandığımız çalışmamızda yumru rejenerasyonu başarıyla gerçekleştirildi. Yaptığımız çalışma, daha sonra diğer orkide türlerinde de yapılacak olan çalışmalara yüzey sterilizasyon protokolü ve yumru gelişimi protokolü açısından kaynak sağlayabilecektir. Çalışmamız referans alınarak yapılacak çalışmalarda, farklı bitki büyüme düzenleyici kombinasyon ve konsantrasyonları, ortam faktörleri, besin ortamları kullanılarak salep orkideleri için etkin protokoller geliştirilebilecektir. Bu sayede ekonomik değere sahip ve yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olan salep orkidelerinin hem nesillerinin devamı sağlanacak hem de ülkemize ekonomik açıdan fayda sağlanmış olacaktır.

4. KAYNAKLAR

1. **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.
2. **Sezik, E.**, 1967. Türkiye'nin salepgilleri, ticari salep çeşitleri ve özellikle Muğla salebi üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. 76.
3. **Ramírez, S.R., et al.**, 2007. Dating the origin of the *Orchidaceae* from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*. 448(7157): p. 1042-1045.
4. Anonim, www.news.independent.co.uk/sci_tech/article. 2009a.
5. Anonim, www.sbs.com.au/worldfeast/glossary.php?archive. 2009b.
6. **Gabel, R.**, 2005 The role of cites in orchid conservation. *Endanger. Sp. Bull.* **30**: p. 14-15.
7. **Nicoletti, B.**, 2003. Number of Orchids. *Physics factbook. An Encyclopedia of Scientific Essays*. New York.
8. **Arditti, J. and A.K.A. Ghani**, 2000. Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*: p. 367-421.
9. Anonim, www.en.wikipedia.org/wiki/Taxonomy_of_the_orchidaceae. 2009c. .
10. **Sezik, E.E.**, 1984. Orkidelerimiz: Türkiye'nin orkideleri: Sandoz Kültür Yayınları.
11. Anonim, www.kew.org/scihort/orchids/whatareorchids.html. 2008a.
12. **Davis, P.H.**, 1965. *Flora of Turkey and the east Aegean islands*. Vol. 10: Edinburgh University Press.
13. **Güner, A., et al.**, 2000. *Flora of Turkey and the east Aegean islands, Vol. 11. Second Supplement*, Edinburgh.
14. **Ekim, T., et al.**, 2000. Türkiye bitkileri kırmızı kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler).
15. **Kasperek, M. and U. Grimm**, 1999. *European trade in Turkish salep with special reference to Germany*. *Economic Botany*, 53(4): p. 396-406.
16. **Kreutz, C. & BJ Seckel Verlag**. 1998. *Die orchideen der Türkei*.

17. **Sezik, E. and T. Baykal**, 1991. Maraş Salebinin Menşei. Tübitak Doğa-Tr. J. of Pharmacy, 1: p. 10-16.
18. **Sezik, E. and B. Özer**, 1983. Kastamonu Salebinin Menşei ve Kastamonu Civarının Orkideleri. Tübitak Research Project, Temel Bilimler Araştırma Grubu Projesi, TBAG, 424.
19. **Arditti, J.**, 1980. Aspects of The Physiology of Orchids. Advances in Botanical Research, 7: p. 421-655.
20. **Renz, J. and G. Taubenheim**, 1984. *Orchidaceae in PH Davis*. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 8.
21. **Sezik, E., et al.**, 2007. Salep ve Orkidelerin Tahribi, Tübitak Araştırma Projesi Raporu. TBAGÇ-SEK/23 (103T008), Ankara.
22. **Deniz, İ.**, 2009. Antalya ilinde yayılış gösteren *Ophrys L.* (Orchidaceae) cinslerine ait türler üzerinde taksonomik bir araştırma. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Antalya.
23. **Erdem, H.E.**, 2004. *Biyolojik çeşitliliğin ekonomik değerinin belirlenmesi*. Ege Üniversitesi.
24. **Arditti, J.**, 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. The Botanical Review, 33(1): p. 1-97.
25. T.C. Resmi Gazete,yumru ihracatının yasaklanmasıyla ilgili genelge (14973 mükerrer), 11.8.1974.
26. T.C. Resmi Gazete,yumru tozlarının ihracatının yasaklanmasıyla ilgili tebliğ (23407 mükerrer), 19.07.1998
27. **Tekinşen, K.**, 2006. *Salep*. Bilim ve Teknik Tübitak Aylık Popüler Bilim Dergisi, 463: p. 76-77.
28. T.C.Resmi Gazete,Doğal çiçek soğanlarının sökülmesi, üretimi ve ticaretine ilişkin yönetmelik genelge (25563 mükerrer), 24.8.2004.
29. **Joshi, G., et al.**, 2009. Diversity of orchids in Uttarakhand and their conservation strategy with special reference to their medicinal importance. Report and Opinion, 1(3): p. 47-52.
30. Anonim, Saving the wild orchids of Borneo. Biology and Nature July 17. 2008b.
31. Anonim, www.ogm.com.tr, Orman genel müdürlüğü Salep Eylem Planı. 2014.
32. **Sezik, E.**, 1991. Unknown Side of Turkey- An Orchids Paradise, Imagine, 12, 11-15..

33. **Butler, K.**, 1986. *Orchideen*. Die Wirlwdwachsenden Arten und Unterarten Europas, Vorderasiens und Nordafrikas. Gesamtherstellung Mohndruck Graphische Betriebe GmbH, Gütersloh, Germany. 287p,
34. **E., S.**, Trakya’da yetişen *Orchidaceae* türleri, Trakya florası sempozyumu bildiri özetleri, 5, *Edirne*. 1988a.
35. **Sezik, E.**, 1969 c. Muğla Salebi’nin Mensei ve Kalitesi, Tübitak 2. Bilim Kongresi, 17-19 Kasım, Ankara.
36. **Sezik, E.**, 1969b. *Orchidaceae* Familyası Bitkilerinin Türkiye’deki Yayılışı, Tübitak 2. Bilim Kongresi, 17-19 Kasım, Ankara.
37. **Sezik, E.**, 2002. Türkiye’nin orkideleri ve salep, *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44, 151- 157.
38. **Sezik, E.**, 1969. Muğla civarında salep elde edilen bitkilerin mahalli isimleri. Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University, 5: p. 77-79.
39. **Baytop, T. and E. Sezik**, 1968 Türk salep çeşitleri üzerine araştırmalar. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Mec., 4: p. 61-68.
40. **Sezik, E.**, 2002. Turkish orchids and salep. *acta pharmaceutica turcica*, 44: p. 151-157.
41. **Chugh, S., S. Guha, and I.U. Rao**, 2009. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 122(4): p. 507-520.
42. **Ingold, C. and H. Hudson**, 1993. The Biology. *Chapman Hall*. London.
43. **Gönülşen, N., et al.**, 1996. *Ege ve Doğu Akdeniz Bölgelerinde doğal yayılış gösteren Orchidaceae* familyasına ait bazı türlerin in vitro ve in vivo koşullarda üretimleri üzerinde araştırmalar. Proje Sonuç Raporu. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Menemen, İzmir.
44. **Allsopp, N. and W. Stock**, 1992. Mycorrhizas, seed size and seedling establishment in a low nutrient environment. Mycorrhizas in ecosystems. CAB International, Wallingford, UK: p. 59-64.
45. **Morton, J.B.**, 1990. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia*: p. 192-207.
46. **Geetha, S. and S.A. Shetty**, 2000. In vitro propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Current science*, 79(6): p. 886-889.

47. **Park, S., H. Murthy, and K. Paek**, 2003. Protocorm-like body induction and subsequent plant regeneration from root tip cultures of *Doritaenopsis*. *Plant Science*, **164**(6): p. 919-923.
48. **Park, S., et al.**, 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Reports*, **21**(1): p. 46-51.
49. **Bhadra, S. and M. Hossain**, 2003. In vitro germination and micropropagation of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr., an endangered orchid species. *Plant Tissue Cult.* **13**(2): p. 165-171.
50. **Da Silva, J.A.T.**, 2003. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, **2**(12): p. 683-691.
51. **Janarthanam, B. and S. Seshadri**, 2008. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. **44**(2): p. 84-89.
52. **Kalimuthu, K., R. Senthilkumar, and N. Murugalatha**, 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr.–a tropical orchid. *Current Science*, p. 1401-1403.
53. **Ket, N., et al.**, 2004. Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biologia Plantarum*. **48**(3): p. 339-344.
54. **Kuo, H.-L., J.-T. Chen, and W.-C. Chang**, 2005. Efficient plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Phalaenopsis* 'Little Steve'. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, **41**(4): p. 453-456.
55. **Sheela, V., et al.**, 2004 Effect of growth regulators on development and multiplication of protocorm like bodies in *Dendrobium* cv 'Sonia'. *J Orchid Soc Ind.* **18**: p. 21-23.
56. **Wu, I.-F., J.-T. Chen, and W.-C. Chang**, 2004. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant cell, tissue and organ culture*, **77**(1): p. 107-109.
57. **Zhou, W.L.R.S.Y. and R.H. Jianhua**, 2004. The induction and cultivation of cell-derived regenerates of *Dendrobium huoshanense* Cz Tang Et Sj Cheng [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, **4**: p. 002.

58. **Gonokbari, S.**, 2007. Efficient micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. cv. 'Cool Breeze' using inflorescence axis thin sections as explants. *Propagation of Ornamental Plants*, **7**(1): p. 9-15.
59. **Luo, J.-P., X.-Q. Zha, and S.-T. Jiang**, 2003. Suspension culture of protocorm-like bodies from the endangered medicinal plant *Dendrobium huoshanense*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*= *Zhongguo Zhongyao Zazhi*= *China Journal of Chinese Materia Medica*, **28**(7): p. 611-614.
60. **Luo, J.-P., C. Wawrosch, and B. Kopp**, 2009. Enhanced micropropagation of *Dendrobium huoshanense* CZ Tang et SJ Cheng through protocorm-like bodies: the effects of cytokinins, carbohydrate sources and cold pretreatment. *Scientia Horticulturae*, **123**(2): p. 258-262.
61. **Shimura, H. and Y. Koda**, 2004. Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebutense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **78**(3): p. 273-276.
62. **Nayak, N.R., et al.**, 2002. Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Scientia Horticulturae*, **94**(1): p. 107-116.
63. **Nge, K.L., et al.**, 2006. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science*, **170**(6): p. 1185-1190.
64. **Malabadi, R.B., G.S. Mulgund, and N. Kallappa**, 2005. Micropropagation of *Dendrobium nobile* from shoot tip sections. *Journal of Plant Physiology*, **162**(4): p. 473-478.
65. **Prakash, L., C. Lee, and C. Goh**, 1996. In vitro propagation of commercial orchids: an assessment of current methodologies and development of a novel approach thin section culture. *J. Orchid Soc. India*, **10**(1-2): p. 31-41.
66. **Roy, A., et al.**, 2011. 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): p. 325-331.
67. **Saiprasad, G., et al.**, 2004. Effect of various polyamines on production of protocorm-like bodies in orchid—*Dendrobium 'Sonia'*. *Scientia Horticulturae*, **100**(1): p. 161-168.
68. **Subramaniam, G. and R. Taha**, 2003. Morphogenesis of *Cymbidium atropurpureum* in vitro. *Malays J Sci*, **22**: p. 1-5.

69. **Nasiruddin, K., R. Begum, and S. Yasmin,** 2003. Protocorm like bodies and plantlet regeneration from *Dendrobium formosum* leaf callus. Asian J. Plant Sci, **2**(13): p. 955-957.
70. **Lakshmanan, P., C.-S. Loh, and C.-J. Goh,** 1995. An in vitro method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid *Aranda deborah* using thin section culture. Plant cell reports, **14**(8): p. 510-514.
71. **Gümüş, c.,** 2009. Bati Karadeniz Bölgesi'nde salep elde edilmesinde kullanılan bazı orkide türlerinin (orchidaceae) çoğaltım yöntemleri üzerinde araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü: p. 221.
72. **Ayşe Özavci, A. Eskalen, and K. Çağlayan,** 1998. Dogu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetisen bazı salep orkidelerinin embriyo kültürü kullanılarak in vitro kosullarda çoğaltılmaları. Tr. J. of Agriculture and Forestry, **22**: p. 187-191.
73. **Poyraz, H.,** 2012. Endemik *Erodium somanum*"un bitki doku kültürü yöntemi ile mikroçoğaltımı. Dumlupınar Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi: p. 53.
74. **Sharma, V.,** 2012. Orchid micropropagation: regeneration competence of anther culture. sharma, J Biotechnol Biomater. **2**:**6**: p. 4.
75. **E. Bektaş, M. Cüce and A. Sökmen,** 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**: p. 336.

5. EKLER



04.02.2016 - 2062
BÜYÜK

T.C.
GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI
Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü

Sayı : 53231444-110.05
Konu : Araştırma İzin Talebi

10819

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
(Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü)
ELAZIĞ

İlgi : 25.01.2016 tarihli ve 3269 sayılı yazınız.

İlgi yazıda, Üniversiteniz Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Nazmi GÜR'ün, "Yüksek lisans ve araştırma projesi" kapsamında, araştırma materyali olarak kullanılacak ekteki listede yer alan farklı salep türlerini doğadan toplamak için izin talebinde bulunulmuştur.

Doğal çiçek soğanları ile ilgili 19/7/2012 tarihli ve 28358 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Doğal Çiçek Soğanlarının Üretimi, Doğadan Toplanması ve İhracatına İlişkin Yönetmeliğin 7. maddesine göre, ihracat yönünden yapılan sınıflandırmada belirtilen tüm çiçek soğanları için bilimsel araştırma amacıyla doğadan araştırma materyali toplanması Bakanlığın iznine tabidir. Buna göre; ilgi yazı ekindeki talep formunda belirtilen türlerin talep formunda adı geçen toplama yerlerinden, her bir tür için 20 adet toplanmasına Bakanlığımızca izin verilmiştir.

Proje tamamlandıktan sonra, sonuçlarının Bakanlığımıza gönderilmesi hususunda; gereğini rica ederim.

Ek: Form (1 adet)

Mevlüt GÜMÜŞ
Bakan a.
Genel Müdür

Eskişehir Yolu 9. Km Lodumlu ANKARA
Telefon No: (312) 2873360 Faks: (312) 258 84 35
e-posta: <http://www.tohum.gov.tr>

Bilgi için: Mustafa SARI
Ziraat Mühendisi
Telefon No: (0312) 2588435

(Ek-17)

BİLİMSEL ARAŞTIRMA AMAÇLI DOĞAL ÇİÇEK SOĞANI TOPLAMA VE İHRACATI İÇİN TALEP FORMU

A. PROJENİN TANIMI

Proje adı	Salep Orkidelerinin Mikroçoğaltımı
Projeyi yapan kurum/lar ve/ya proje ortak/ları	Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü
Proje yürütücüsü	Yrd.Doç.Dr.Nazmi Gür
Proje Özeti	Süs bitkisi olarak tanınan orkidelerden başka; Türkiye'de doğal alanlarda yetişen bir başka orkide grubu vardır ki; bunlar daha çok kullanım amacı ve şekli doğrultusunda anıldığı ismiyle "salep" bitkisi olarak bilinirler. İlman kuşak veya karasal orkidelerin toprak altı organları; yumru (tuber), kök ve rizom olarak farklılık göstermektedir. Yumrular genellikle iki tane olup bunlar birbirine yapışık durumdadır. Birisi yetiştiği yıla ait olan genç yumru, diğeri ise bir önceki yıla ait yumru olup bu bitkiler çiçekli haldeyken kazılıp topraktan çıkarılmakta, toplanıp salep elde etmek amacıyla kullanılmaktadır. 1 kilogram kuru salep elde edebilmek için yaklaşık 2600 adet orkide sökülmetedir. Bu durum salep orkidelerinin doğadaki varlığını tehdit etmektedir. Çalışmamızda doğal yollardan yetiştirilmesi zor olan salep orkidelerinin doku kültürü yöntemleri kullanılarak laboratuvar ortamında yetiştirilmesine çalışılacaktır.

B. TOPLANACAK DOĞAL ÇİÇEK SOĞANLARININ:

Tür adı ve Familyası	Toplanacak miktar ¹	Toplamanın yapılacağı yer	Toplama zamanı	Toplamayı yapacak kişi
Orchis sancta	20 adet	Menemen, İzmir	Mayıs, 2016	Nazmi Gür
Serepias vomeracea	20 adet	Menemen, İzmir	Mayıs, 2016	Nazmi Gür
Orchis laxiflora	20 adet	Gezin,Sivrice, Elazığ	Mayıs, 2016	Nazmi Gür
Orchis mascula	20 adet	Kızıldamlar,dereköy, K.Maraş	Mayıs, 2016	Nazmi Gür
Dactylorhiza iberica	20 adet	Kızıldamlar,Dereköy, K.Maraş	Mayıs, 2016	Nazmi Gür

C. TOPLANACAK DOĞAL ÇİÇEK SOĞANLARININ BİLİMSEL ARAŞTIRMA AMAÇ İLE YURT DIŞINA İHRACATI*:

Bilimsel araştırma amacıyla toplanan materyalin ihracatı isteniyor mu?	Hayır
İhracatın yapılacağı ülke	
Karşı Ülkedeki Proje Ortağı	
Bilimsel Araştırma amaçlı ihracatı yapılacak türün Adı	Miktar ¹

ASLI GİTTİR
Mehmet SİĞİRCİ
Daire Başkanı

¹ Bitkinin birey, soğan ya da yumrusunun toplanması durumunda miktar adet olarak belirtilmelidir.



T.C.
ORMAN VE SU İŞLERİ BAKANLIĞI
XV. Bölge Müdürlüğü - Kahramanmaraş Şube Müdürlüğü

Sayı: 98946140-488.04-121434
Konu: Araştırma İzinleri

09.06.2016

Yrd. Doç. Dr. Nazmi GÜR
(Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü)
ELAZIĞ

İlgi : Doğa Koruma ve Sulak Alanlar Şubesi'nin 01.06.2016 tarihli ve 87576010-488.04-115341 sayılı yazısı

"Salep Orkidelerinin Mikroçoğaltımı" simli Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Bakanlığımız Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüş olup, izin belgesi İl Şube Müdürlüğümüze gönderilmiştir.

Söz konusu proje kapsamında, Kahramanmaraş Şube Müdürlüğümüz görev alanında, yapmayı planladığınız arazi çalışmalarında; arazi çalışma öncesinde ve arazide yapılacak her türlü çalışma ilgili İl Şube Müdürlüğümüze bilgi verilmesi hususunda; Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Hacı KALINKÜTÜK
Şube Müdürü

Hayati KASIMOĞLU
Tekniker
Güvenli Elektronik İmza
Aşıl ile Aynıdır.
09 Haziran 2016

Bu evrak 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na göre elektronik olarak imzalanmıştır.
Evrak doğrulama adresi: <http://ebys.ormansu.gov.tr/Dogrulama.aspx?d=e1fr>

Adres : Hacı Bayram Veli Mah. Sait Zarifoğlu Bulvarı No: 221
/ KAHRAMANMARAŞ
Telefon : 0 344 234 20 99
e-posta : ogulnar@cevreorman.gov.tr

Ayrıntılı Bilgi : Özlem GÜLNAR Biyolog
Fax : 0 344 234 21 93
Elektronik Ağ: <http://bolge15.ormansu.gov.tr>

ÖZGEÇMİŞ

Dilek Nur EKİNOĞLU 1991’de Elazığ’da doğdu; ilk ve orta öğretimini de Elazığ’da tamamladı. Elazığ Korgeneral Hulusi Sayın Lisesi’nden mezun olduktan sonra 2010 yılında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü’ne girdi; 2014 yılında mezun olduktan sonra 2014 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans’a başladı; halen Fırat Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programını sürdürmektedir.

