

Doğu Akdeniz Bölgesinde Yaygın Olarak Yetişen Bazı Salep Orkidelerinin Embriyo Kültürü Kullanılarak *In Vitro* Koşullarda Çoğaltılmaları

Kadriye ÇAĞLAYAN

Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, TÜRKİYE

Ayşe ÖZAVCI, Akif ESKALEN

Sütçü İman Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 26.03.1996

Özet: Bu çalışmada doğada nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olan salep orkidelerinin *in vitro*'da çoğaltılma olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen salep orkidelerinden *Orcis anatolica* Boiss, *Orcis coriophora* L., *Ophrys bornmuelleri* Schulz, *Ophrys phrigra* Fleischm. et Borm, *Serapias vomeraceae* ve *Himantoglossum affine* embriyo kültürü kullanılarak *in vitro*'da kültüre alınmışlardır. Salep embriyolarının kültüre alınmasında 14 farklı ortam kullanılmıştır. En yüksek ortalama çimlenme ve protokormdan bitki oluşum oranları sırasıyla %2.39 ve %1.86 olarak Van Waes Debergh + Domates Ekstraktı + Aktif Karbon (VW&D + DE + AK) ortamında bulunmuştur. *In vitro*'da en yüksek yumru oluşum oranı ise %2.453 ile aynı ortamda saptanmıştır.

***In Vitro* Multiplication of Salep Orchids, Growing Commonly in the East Mediterranean Region of Turkey by Embryo Culture**

Abstract: Possibilities of *in vitro* multiplication of salep orchids, which have a great danger of extinction from nature, was investigated.

Orcis anatolica Boiss, *Orcis coriophora* L., *Ophrys bornmuelleri* Schulz, *Ophrys phrigra* Fleischm. et Borm., *Serapias vomeracea* and *Himantoglossum affine*, which are growing commonly in the East Mediterranean Area, were cultured *in vitro* by using embryo culture. In order to culture salep embryos, 14 different media were used. The highest average germination rate and plant formation from protocorm were found as 2.39% and 1.86%, respectively on Van Waes Debergh + Tomato Ekstrakt + Active Carbon (VW&D + TE + AC) media. The highest average tuber formation under *in vitro* conditions was found also on the same media (2.453 %).

Giriş

Salep orkideleri ülkemizin birçok bölgesinde doğal olarak yetişmekte olup yumrularından gıda ve ilaç hammadesi olarak kullanılan salep elde edilmektedir. Salep orkidelerinin en yaygın bulunduğu bölgeler Kuzey Anadolu (Kastamonu), Güney Anadolu (Muğla, Antalya, Silifke), Güneydoğu Anadolu (Kahramanmaraş, Adıyaman, Malatya) ve Doğu Anadolu (Van, Muş, Bitlis)'dur (1).

Anadolu'da asırlardan beri elde edilen droglardan biri de salebdir. Dondurma yapımında ve kışın sıcak içecek olarak yararlanılan salep maddesi salep bitkilerinin yumrularından elde edilir. Salep bitkilerinin dahil olduğu Ochidacea familyasına ait 24 cins ve 90 kadar tür

saptanmıştır. Doğu Akdeniz Bölgesi bu cins ve türlerin büyük bir çoğunluğunun yayılış gösterdiği bölgelerden biridir (2, 3). Salep yurtiçinde tüketiminin yanısıra özellikle Arap ülkelerine de ihraç edilmektedir.

Salep, yumrulu orkidelerden elde edilmesine karşın tüm yumrulu cinsler bu amaç için uygun değildir. Daha çok *Orcis*, *Anacamptis*, *Ophrys*, *Serapias*, *Himantoglossum*, *Barlia* gibi ovoid yumrulu olanlarla *Dactylorhiza* gibi parçalı yumruya sahip orkidelerin değişik türleri salep elde edilmesinde kullanılmaktadır. Son yıllarda *Platanthera* türlerinden de bazı bölgelerde salep elde edildiğine dair bilgiler vardır (3).

Salep bitkisinin yumruları her yıl tek bir yavru yumru

meydana getirmekte ve yeni yumru geliştikçe eski yumru kendi kendine bozulup yok olmaktadır. Türkiye’de yetişen orkidelerin yumrularından asırlarca salep elde edilmiş, hem yurt içinde kullanılmış hem de ihraç edilmiştir. Tahribatın çok yüksek düzeyde olmasından dolayı 1974 yılında Tarım Bakanlığı ihracatı yasaklamıştır. Fakat yumru olarak ihracatı yasak olan salep, salep unu olarak işlenmiş şekilde ihraç edilmektedir.

Dünyada ve Türkiye’de salep orkideleri ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Ülkemizde bu konu ile ilgili çalışmalar salep yetişen bölgelerdeki türlerin saptanması ve bazı kültüre alma çalışmalarıyla sınırlı kalmıştır (1, 4, 5, 6, 7).

Bu çalışma ile Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen salep orkidelerinin *in vitro* koşullarda çoğaltılmaları ve yumru oluşturma oranları araştırılarak doğal koşullarda çoğaltılması oldukça sınırlı olan bu bitkinin üretilebilmesinde alternatif bir yöntem belirlenmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Survey çalışmaları sonucu toplanan salep orkideleri yayınlanmış flora çalışmaları ve monograflar yardımıyla tanılanmıştır. Çiçekli dönemdeki bitkiler doğadan toprakları ile birlikte sökülerek saksılara dikilmiş ve yapay tozlama ile üretimde kullanılacak embriyolar elde edilmiştir.

In vitro çalışmalarda embriyo kültürü kullanılarak oldukça küçük olan bu embriyolar steril kurutma kağıdında paketlenildikten sonra yüzey sterilizasyonu uygulanmıştır. Kültür ortamları olarak Knudson C(KC) (8) ve Van Waes & Debergh (VW&D) (9) kullanılmış, bu temel ortamlara %10 oranında patates (PE), domates (DE) ve salep yumrularından elde edilen ekstraktlar (SE) eklenmiştir. Ayrıca fenolik bileşiklerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için her ortama 1 g/l oranında aktif karbon (AK) ilave edilerek farklı ortam kombinasyonları kullanılmıştır. 10 ml ortam içeren her bir tüpe 0.6 mg embriyo (yaklaşık 2880 embriyo/tüp) homojen bir şekilde yayılmıştır. Embriyo ekimleri 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Kültürler 24°C sıcaklık, 2500 lux 16 saat/gün ışık rejimine sahip iklim odalarında inkübe edilmişlerdir. Gözlemler stereoskopik mikroskop altında haftalık gelişmeler şeklinde kaydedilmiştir.

Kültür ortamında 5-6 cm uzunluğa erişen bitkiciklerin kökleri çeşme suyu ile dikkatlice yıkandıktan sonra fungusit ile muamele edilmiş torf ortamına dikilmişlerdir. Bu bitkiler 10 gün süre ile polietilen örtü ile kapatılarak %100 nem 25±2°C sıcaklık ve 16 saat/gün ışıklandırma

sistemine sahip bitki büyütme dolaplarında bekletilmiştir. Daha sonra polietilen örtünün yavaş yavaş açılmasıyla bitkilerin doğal ortama adaptasyonları sağlanmıştır.

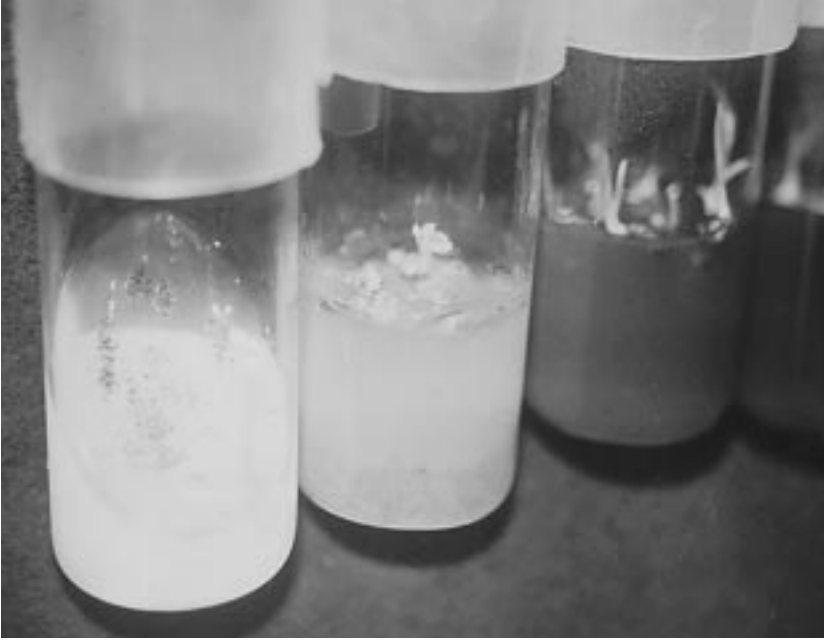
Bulgular

Doğu Akdeniz Bölgesinde yaygın olarak yetişen *Himantoglossum affine*, *Orchis anatolica*, *O. coriophora*, *Ophrys bornmuelleri*, *Ophrys phrigra* ve *Serapias vomeracea* türlerinin embriyo kültürü kullanılarak *in vitro*’da çoğaltma çalışmalarında *H. affine* dışındaki tüm orkideler embriyo kültürü ile çoğaltılmış ve bu tür ile *O. bornmuelleri* dışındaki tüm türlerin protokormdan bitkicik haline dönüşmesi gerçekleşmiştir (Şekil 1).

Bu orkide türlerinin farklı besin ortamlarında çimlenme ve bitki oluşum oranı üzerine olan etkileri ise Tablo 1’de verilmiştir.

Tablodan da görüldüğü gibi denemeye alınan besi ortamlarından %2.39 ile en iyi çimlenme oranı VW&DE+AK ortamında, en düşük çimlenme ise %0.05 oranında VW&D+PE ortamında görülmüştür. Çimlenen bu embriyolardan bitkicik oluşturabilenler incelendiğinde yine en yüksek oran %1.86 ile VW&D+DE+AK ortamında gözlenmiş ve VW&D+SE, KC ve KC+SE+AK ortamlarında çimlenme gerçekleşirken bu protokormlardan bitkicik meydana gelmemiştir. Denenen salep türlerinde farklı besi ortamlarında en yüksek çimlenme oranı %2.22 ile *Orchis coriophora*’da en düşük oran ise hiç bir ortamda çimlenemeyen *Himantoglossum affine* türünde saptanmıştır. Yine *O. coriophora* türünde çimlenen embriyolardan %1.11’i bitkicik oluşturarak en yüksek orana sahip olmuştur. Bu türü %0.16 ile *O. anatolica*, %0.03 ile *Oph. phrigra* ve %0.01 ile *Serapias vomeraceae* izlemiştir. Gerek embriyoların çimlenmesi gerekse protokormlardan bitki oluşumu açısından en iyi sonuç *O. coriophora* orkidelerinin VW&D+DE+AK ortamında büyütüldüğü koşullarda elde edilmiştir. Temel ortama ilave edilen domates ekstraktı çimlenme ve büyümeyi teşvik ederken aktif karbon ilavesi ile bazı inhibitörlerin etkisi ortadan kaldırılabilmiştir (Şekil 2).

Çimlenme oranı yüksek bulunan *O. anatolica* ve *O. coriophora* türlerinde en başarılı sonuç veren VW&D+DE+AK ve KC+DE+AK ortamlarında çimlenme zamanları tesbit edilmiştir. *O. anatolica* türü VW&D+DE+AK ortamında 149 günde çimlenip 357 günde bitkicik oluştururken KC+DE+AK ortamında da bu süreler sırasıyla 150 ve 357 gün olarak saptanmıştır. *O. coriophora* türü ise daha kısa zamanda gelişerek birinci ortamda 58 günde çimlenip 156 günde bitkicik haline dönüşmüştür.



Şekil 1. *O. anatolica* türünde soldan sağa doğru embriyo, protokorm ve bitkiciklerin oluşumu.

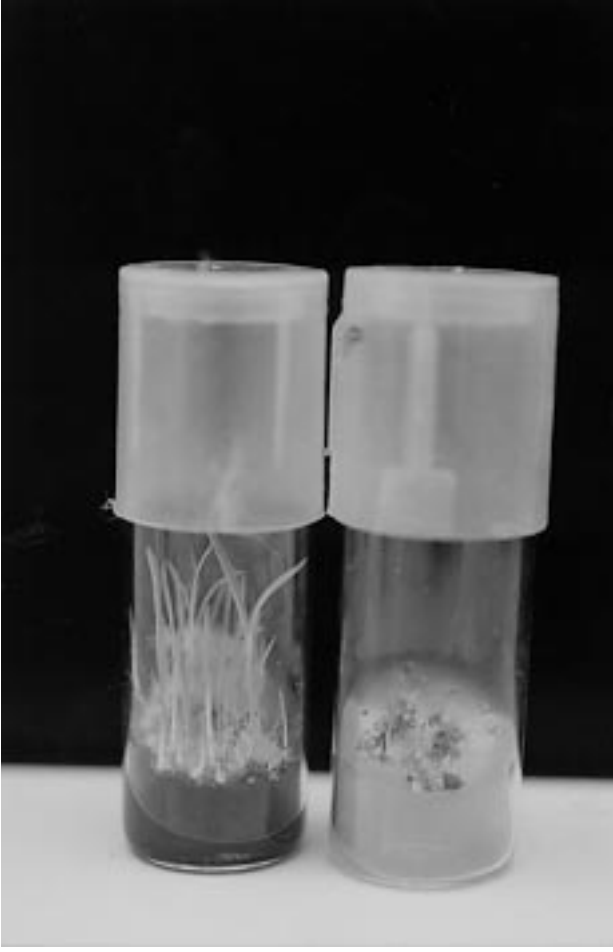
Tablo 1. Farklı salep türlerinde embriyoların çimlenme ve bitki oluşum oranları

Besi Ortamları	Salep Türlerinde Çimlenme ve Bitki Oluşum Oranları (%)													
	O.anatol		O.coriof.		Oph.bor		Oph.phring.		S.vomer		H.affine		Ortalama	
	Ç	B.O	Ç	B.O	Ç	B.O	Ç	B.O	Ç	B.O	Ç	O	Ç	B.O
VW&D	2,50	1,57	0,35	0,35	0	0	0,55	0	0	0	0	0	0,57	0,32
VW&D+AK	1,55	0,35	4,01	0,50	0	0	0,46	0,06	0,02	0,02	0	0	1,01	0,16
VW&D+PE	0	0	0	0	*	0	0,21	0	-	-	0	0	0,05	0,01
VW&D+PE+AK	0	0	3,38	0,27	-	0	0,63	0	-	-	0	0	1,00	0,05
VW&D+DE	0,50	0	6,81	5,71	0	0	0	0	-	-	0	0	1,46	1,14
VW&D+DE+AK	1,88	0,36	9,24	8,72	0,08	0	0,73	0,21	-	-	0	0	2,39	1,86
VW&D+SE	0	0	1,22	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0,24	0
VW&D+SE+AK	0	0	1,66	0	0	0	1,98	0	-	-	0	0	0,73	0
KC	0,61	0	0,05	0	0	0	0,06	0	0,05	0	0	0	0,13	0
KC+AK	0,25	0	1,20	0	0	0	0,58	0	0,07	0	0	0	0,13	0
KC+DE	0,31	0	0,53	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0,17	0
KC+DE+AK	1,20	0,02	0,86	0,02	0	0	0,42	0,14	-	-	0	0	0,50	0,04
KC+SE	0	0	0,88	0	0	0	0,68	0	-	-	0	0	0,31	0
KC+SE+AK	0	0	0,90	0	0	0	2,81	0	-	-	0	0	0,74	0
ORTALAMA	0,63	0,16	2,22	1,11	0,01	0	0,65	0,03	0,05	0,01	0	0		

VW&D= VanWaes&Debergh Ortamı, KC= Knudson C Ortamı, AK= Aktif Karbon, PE= Patates Ekstraktı, DE= Domates Ekstraktı, SE= Salep Yumrusu Ekstraktı *= Kontaminasyon nedeniyle tüm kültürler kaybedildi.

Embriyo kültürü sonucu en iyi sonucu veren *O. anatolica* ve *O. coriphora* orkidelerinin *in vitro*'da yumru oluşturma potansiyelleri incelenmiştir. *O. anatolica* türü

sadece VW&D ortamında %0.433 oranında yumru oluştururken *O. coriphora* türü 8 farklı ortamda yumru oluşturmuştur (Tablo 2).



Şekil 2. VW&D+DE ortamına aktif karbon (AK) eklenmemiş (sağda) ve AK ilavesi ile hazırlanmış ortamda (solda) çimlenme ve bitkicik oluşturma durumları.

In vitro'da çoğaltılan *O. coriophora* salepleri torf ortamına dikildiklerinde 8 hafta içinde tamamen doğal ortama adapte olarak küçük saksılara aktarılmıştır (Şekil 3). *In vivo* koşullara aktarılan bitkilerde yaşama oranı ortalama %20 olarak saptanmıştır.

Tartışma

Bu çalışmada Doğu Akdeniz Bölgesininin değişik ekolojik özelliklerine sahip yörelerinde 4 farklı cinse ait salep orkidelerinde *in vitro* da kültüre alma olanakları araştırılarak alternatif bir üretim yöntemi belirlenmeye çalışılmıştır. Bu türler ülkemizin değişik yörelerinde bulunan ve salep üretiminde büyük öneme sahip olanlardır (1, 3).

Orkide tohumları endosperm içermemektedir ve

Tablo 2. Farklı salep türlerinde, farklı besi ortamlarının yumru oluşumu üzerine etkileri.

Besin Ortamı	Yumru Oluşum Oranı (%)		
	<i>O.anatolica</i>	<i>O.coriphora</i>	Ortalama
VW&D	0.433	0.023	0.228
VW&D+AK	0	0.948	0.474
VW%D+PE	0	0	0
VW%D+PE+AK	0	0.022	0.011
VW&D+DE	0	2.163	1.082
VW%D+DE+AK	0	4.906	2.453
VW&D+SE	0	0	0
VW&D+SE+AK	0	0.103	0.052
KC	0	0	0
KC+AK	0	0	0
KC+DE	0	0.127	0.064
KC+DE+AK	0	0.358	0.179
KC+SE	0	0	0
KC+SE+AK	0	0	0
Ortalama	0.031	0.618	

embriyoları farklılaşmamış 80-100 hücreden meydana gelmiştir (10). Bu nedenle doğada çimlenebilmeleri için simbiyotik yaşam kurabilecekleri funguslara gereksinim duyarlar (11). Ancak *in vitro* üretim yöntemlerinin kullanılmasıyla mikorizal funguslara gereksinim duymadan da çoğalabilirler (12). Bu çalışmada kullanılan *Orchis anatolica* ve *Orchis coriophora* türlerinde embriyolar başarılı bir şekilde kültüre alınırken *Ophrys phryga*, *Ophrys bornmuelleri* ve *Serapias vomeracea* türlerinde oldukça düşük oranlarda çimlenme ve bitkicik oluşumu elde edilmiştir. *Himantoglossum affine* türü ise hiç bir ortam kombinasyonunda çimlenme göstermemiştir. Arditti ve ark. (13) araştırmalarında bir tür için başarılı olarak bulunan bir yöntemin diğer türlere uygulanmadığını hatta bir bölgeden toplanan orkide tohumlarına uygulanan yöntemlerin başka bölgelerden toplanan aynı türe ait tohumlara uygulandığında bile aynı sonucun alınmadığını bildirmişlerdir. Ponchet ve ark.'da (14) *Orchis* ve *Ophrys* cinsine ait salep orkidelerinin *in vitro*'da başarılı çoğalmalarına dikkat çekmiştir.

Bu çalışmada özellikle *Orchis coriophora* yüksek oranda ve hızlı çoğalabilme performansı nedeniyle *in vitro* çoğaltmanın alternatif üretim yöntemi olarak kullanılabilmesi bir tür olarak görülmektedir.

Biyolojik özellikleri diğer bitkilerden oldukça farklı olan salep bitkisinin doğal koşullarda embriyolarının çimlenip bitkicik oluşturması türden türe değişmekle birlikte en kısa ortalama süre-4 yıl olarak bildirilmektedir



Şekil 3. *In vivo* koşullara aktarılan *Orchis coriophora* orkideleri.

(3). Bu çalışmada görüldüğü gibi bu süre *in vitro* çalışmalar ile oldukça kısaltılmış ve *O. coriophora* türünde 5 ayda bitkicik elde edilmiştir.

Bu çalışma nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olan gıda ve ilaç hammaddesi olarak son derece önemli bir

ürün durumundaki salep orkidelerinin üretimine olanak sağlayacak bulguları yansıtmaları açısından önemlidir. Bu tür çalışmaların devam etmesi, hatta uzun bir zaman diliminde pratiğe aktarılan sonuçların alınması ülke ekonomisine büyük ölçüde katkıda bulunacağı gibi doğanın korunması açısından da önemlidir.

Kaynaklar

1. Baytop, T. ve Sezik, E., 1968. Türk salep çeşitleri üzerine araştırmalar. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Mec. 4: 61-68. 1968.
2. Sezik, E., 1967. Türkiye'nin Salepgilleri, Ticari Salep Çeşitleri ve Özellikle Muğla Salebi Üzerine Araştırmalar. İst. Üniv. Ecz. Fak. Doktora Tezi, İstanbul, 1967.
3. Sekiz, E., 1984. Orkidelerimiz, Sandoz Kültür Yayınları No:6. 166pp. 1984.
4. Cönülşen, N., 1983, Salep bitkilerinden *Orchis anatolica* Boiss.'in doku kültürleri ile üretimi. E.B.Z.A.E. Yayınları No:28. 1983.
5. Özkoç, I. ve Dalcı, M., 1991. Bazı orkide türlerine ait tohumların çimlenmesi üzerine yüzeysel sterilizasyonda kullanılan sodyum hipokloritin etkisi. Ondokuz Mayıs Üniv., Fen Dergisi 3, (1), 116-122. 1991.
6. ———., 1992a. İki farklı kültür ortamında *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Brig. Subsp. *Laxiflora* (500) Gözl et. Reinhard (Orchidaceae) tohumlarının çimlenme ve gelişmesi üzerine bazı fungusların etkisi. Doğa-Tr.J. of Biology 16, 158-164.
7. ———., 1992 b. İki farklı kültür ortamında *Orchis laxiflora* Lam. (Orchidaceae) tohumlarının çimlenme ve gelişmesi üzerine bazı fungusların etkisi. Doğa Tr.J. of Biology 17, 23-28.
8. Kundson, L., 1951. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. Amer. Orchid. Soc. Bull. 14, 214-217. 1951.
9. Vanwaes, J.M., and Debergh, P.C., 1986. In vitro germination of some Western European orchids. Physiol. Plant. 67: 253-261. 1986.
10. Arditti, J., 1967. Factors affecting of orchid seeds. Bot. rev. 33, 1-97. 1967.
11. Ingold, C.T. and Hudson, H.J. 1993. The Biology. Sixth edition Chapman Hall. London, 224 pp. 1993.
12. Rublup, A., Chavez, V. and Martinez, A., 1989. In vitro seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (Orchidaceae) in its natural habitat.
13. Arditti, J., Michaud, J.D. and Oliva, A.P. 1981. Seed germination of North American Orchids. I. native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera* Bot. Gaz. 142: 4, 442-453. 1981.
14. Ponchet, M., Beck, D. and Popupet, A., 1985. Vegetative propagation in vitro, by shoot proliferation, of two species of *Serapias*: *S. Albia verguin* and *S. pseudocordigera* Maric. (Orchidaceae). Bull. Soc. Fr., 132, Letters bot., 4: 5, 289-300. 1985.