

***Dactylorhiza urvilleana*'nın *in vitro* asimbiyotik çimlendirilmesi ve fidelerinin oluşturulması**

In vitro* asymbiotic germination and plantlet formation of *Dactylorhiza urvilleana

Ersan BEKTAŞ

Giresun Üniversitesi, Espiye Meslek Yüksekokulu, Giresun, Türkiye

Eser Bilgisi

Araştırma makalesi

DOI:10.17474/acuofd.95225

Sorumlu yazar: Ersan BEKTAŞ

e-mail: ebektas61@yahoo.com

Geliş tarihi: 01.03.2016

Düzeltilme tarihi: 20.04.2016

Kabul tarihi: 21.04.2016

Anahtar Kelimeler:

Dactylorhiza urvilleana

Doku kültürü

In vitro

Protokorm

Asimbiyotik çimlenme

Key words:

Dactylorhiza urvilleana

Tissue culture

In vitro

Protocorm

Asymbiotic germination

Özet

Bu çalışmada Orchidaceae familyasına ait *Dactylorhiza urvilleana* (Steud.) H.Baumann & Künkele'nin doku kültürü yöntemleriyle çoğaltılması amaçlandı. Başlangıç eksplantı olarak türe ait olgunlaşmış tohumlar kullanıldı. Sterilizasyonları ve canlılık testleri yapılan tohumların çeşitli temel besi ortamlarındaki çimlenme, protokorm ve kallus oluşum oranları tespit edildi. Çimlenen tohumlardan oluşan protokormlar, Zeatin'in farklı derişimleri ile desteklenen Orchimax aktif kömürlü besi ortamında (OAM) organogeneze teşvik edildi ve sürgün uzama miktarları ve ortalama kök sayıları belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre, çimlenme, protokorm ve kallus oluşumunda denenen temel besi ortamlarından Orchimax aktif kömürlü besi ortamının daha etkili olduğu görüldü. Bu ortamdaki çimlenme oranı %62,39, protokorm oluşum oranı %73,18 ve kallus oluşum oranı %8,6 olarak belirlendi. Farklı zeatin derişimlerinin sürgün uzaması ve kök sayısı üzerine etkilerine bakıldığında, 1,0 mg/L derişiminin diğerlerinden daha olumlu sonuçlar verdiği görüldü ve bu ortamdan elde edilen ortalama sürgün boyu ve kök sayısı değerleri sırasıyla 36,05 mm ve 3,4 adet olarak hesaplandı.

Abstract

In this study, *in vitro* production of *Dactylorhiza urvilleana* (Steud.) H.Baumann & Künkele by using plant cell and tissue culture techniques were carried out. Mature seeds were used as starting explant. After the surface sterilization and viability tests, seeds were germinated in different basal culture media then germination, protocorm and callus formation rates were determined. Protocorms were encouraged to organogenesis in Orchimax medium including activated charcoal (OAM) and supported with different concentrations of Zeatin and shoot length and root numbers of seedlings were detected. It has been determined that the most effective culture medium for germination, protocorm and callus formation rates of seeds is the OAM. In this medium, germination, protocorm and callus formation rates were determined as 62.39%, 73.18%, 8.6%, respectively. It has been determined that the media including 1.0 mg/L Zeatin were effective on the elongation of shoots and root formation. Shoot length and average root number was measured as 36.05 mm and 3.4, respectively.

GİRİŞ

Orchidaceae familyası, çiçekli bitkilerin tür sayısı bakımından en fazla ve yeryüzünde en geniş yayılışa sahip olan familyalarından biridir. Dünya genelinde 800 civarı cinsi ve yaklaşık 30.000 türü olduğu belirlenmiştir (Arditti ve Ghani 2000). Orkide denildiğinde akla ilk olarak tropikal bölgelerde yetiştirilen ya da yetişen, gösterişli, çeşitli şekil ve renklerde çiçekleri olan, pahalı süs bitkileri gelir. Süs bitkisi olarak bilinen orkidelerin yanı sıra, başta Türkiye olmak üzere çevre ülkelerde doğal olarak yetişen ve salep olarak adlandırılan bir orkide grubu daha bulunur (Gümüş 2009).

Doğada tohumlarından çimlenmeleri çok güçtür ve uzun zaman alır. Bütün çiçekli bitkiler arasında en küçük tohuma sahip bitkilerdir (Mitchell 1989). Gevşek ve şeffaf bir hücre tabakasından oluşan ince bir tohum kabuğuyla

kaplanmış ve bu tohumların endospermi (besin dokusu) yoktur. Tohum kabuğu içinde sadece embriyo yer alır. Bu tohumların çimlenebilmesi için sıcaklık, ışık, nem ve oksijen gibi tüm diğer tohumların ihtiyaç duyduğu uygun ekolojik koşulların yanı sıra bir de "mikorizal fungus" ile bir ortalık kurma ihtiyacı bulunmaktadır. Orkide türlerinin tuber ve yapraklarının oluşması için uzun yıllar gerekir. Ayrıca uygulanabilir vejetatif yollarla çoğaltım olanakları sınırlı ya da hiç yoktur. Bu nedenlerden dolayı, salep orkidelerinin tarımı yapılamamaktadır.

Salep, yumrulu (kök tuberi) orkidelerden elde edilir. Önceleri değişik amaçlarla ilaç yapımında kullanılan salep, günümüzde daha çok gıda katkısı olarak değerlendirilmektedir. Salep üretiminde kullanılan orkidelerin yapılarında glukomannanlar (%7-61), nişasta (%1-36), şekerler (%2-3) ve azotlu maddeler (%0,5-1)

bulunur. Salebin etken maddesi glukomannanlardır (Sezik 1984).

Ekonomik değer taşıyan bu orkidelerin tuberlerinin kontrolsüz ve aşırı toplanması, tohumlarının olgunlaşmasına fırsat vermeden bitkilerin sökülmesi bu türlerin sayılarında azalmaya ve hatta bazılarının yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmasına neden olmaktadır. Bu türlerin tarımının yapılamaması ve vejetatif olarak çoğaltılamamaları, var olanı sökmek yerine bitkiyi üretmeye yönelik hızlı ve kontrollü çoğaltım yöntemlerinin geliştirilerek kullanılmasını zorunlu hale getirmektedir. Ticari amaçlarla doğadan toplanan bitkilerin korunması amacıyla uygulanabilecek en ideal alternatif yöntemin "üretim" olduğu tüm dünyada kabul edilmektedir. Doku kültürü teknikleri kullanılarak bitki üretilmesi (mikroçoğaltım), birçok bitki türünde olduğu gibi orkidelerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir. Eğer bitkilerin uygun besin maddesi ihtiyaçları, hormon ve kültür istekleri yeterince karşılanırsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Hartman ve Kester 1975; Mansuroğlu ve Gürel 2001). Bu amaçla değişik bitki eksplantları, besin ortamları, hormon kombinasyonları, agar ve şeker düzeyleri ve yetiştirme koşulları kullanılarak Orchidaceae familyasına ait bazı bitkilerin *in vitro* simbiyotik ve asimbiyotik koşullarda üretimi için doku kültürü sistemlerini geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır (Crafts ve Miller 1974; Arditti vd. 1981; Hadley 1982; Malmgren 1992; Stewart ve Kane 2006; Yamazaki ve Miyoshi 2006; Bektaş vd. 2013). *D. urvilleana* türü Türkiye florasında doğal olarak yetişmektedir ve düşük glukomannan içeriği nedeniyle doğrudan salep eldesinde kullanılsa da glukomannan içeriği yüksek salep türlerinden elde edilen toz salep ile karıştırılarak kullanılabilir. Bu tür, diğer *Dactylorhiza* türlerinin *in vitro* üretimini gerçekleştirmek için bu çalışmada model bitki olarak değerlendirildi. Bu yüzden, bu çalışmada, farklı temel besin ortamlarının ve bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenen *in vitro* koşullarda, *D. urvilleana* bitkisinin tohumlarının çimlenebilme ve çimlenen tohumlardan oluşan protokormların, bitkiye dönüşebilme kabiliyetleri araştırıldı.

MATERYAL ve YÖNTEM

Eksplant kaynağı ve sterilizasyon

Eksplant olarak *D. urvilleana* türünün olgun tohumları kullanıldı. Tohumların nemi 2 hafta $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de silika jel bulunan desikatörlerde tutularak uzaklaştırıldı ve sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ve karanlıkta ekim yapıncaya kadar saklandı. Eksplant olarak kullanılacak olan olgun tohumların yüzey sterilizasyonları, uygun sterilizasyon yönteminin belirlenebilmesi için iki farklı sterilizasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlerde (%5, 10, 20 ve 30) hazırlanan ticari çamaşır suyu ile 10 dakika (Domestos, %4.5 NaOCl içerir) ve H_2O_2 (%35'lik stok) ile 30 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulan tohumların, sterilizasyon öncesi ve sonrası canlılık testleri 2,3,5-Trifeniltetrazolyumklorür ile yapılarak, uygulanan yöntemin canlılık üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca sterilize edilen tohumlar besi ortamlarına ekilerek, ortamlardaki kontaminasyon oluşumları gözlenmiştir. Kontrol grubu olarak ise çalışılan türlere ait, herhangi bir sterilizasyon uygulaması yapılmamış olgun tohumlar kullanılmıştır. Oluşan kontaminasyonların dış etmenlerden kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemek için tohum ekimi yapılmayan ve aynı besi ortamını ihtiva eden kültür kaplarının, tohum ekimi yapılanlarla aynı koşullarda inkübe edilmesiyle belirlenmiştir.

Tohumların *in vitro* asimbiyotik çimlendirilmesi

4 farklı besi ortamının (Tablo 1), tohum çimlenmesi ve protokorm ve kallus oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Tüm temel besi ortamları %2 sukroz ile desteklendi. Besi ortamları %0,8 Phytoagar kullanılarak katılaştırıldı. Steril besi ortamları 9 cm çapındaki petri kaplarına döküldü. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar besi ortamı üzerine yayıldı. Her bir besi ortamı için 10 petri kabına ekim yapılmıştır. Ekim yapılan ve parafilmle kaplanan petriler $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığa sahip ve 16/8 aydınlık/karanlık fotoperiyoda ayarlanmış iklim dolaplarında 10 hafta boyunca saklandı. 10 hafta sonunda, tohumların canlılık yüzdelerine göre, çimlenme oranları tespit edildi. 12 hafta sonunda tekrar sayım yapılarak protokorm oluşturma yüzdeleri tespit edilmiştir.

Sürgün oluşturma çalışmaları

Sitokin grubu bitki büyüme düzenleyicilerinden Zeatin'in (ZEA), *in vitro* koşullarda yetiştirilen *D. urvillanana* fidelerinin sürgünlerinin oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Zeatin derişimi olarak 0.25; 0.5; 1.0 ve 2.0 mg/L konsantrasyonları kullanılmıştır. Çimlendirilmiş tohumlardan oluşturulan protokormlar eksplant olarak kullanılmıştır. Fidelerin ekim yapıldıktan

sonra 60 (2 ay) gün sonundaki sürgün boyları belirlenmiştir. 90 gün (3 ay) sonunda da fidelerin kök oluşturma durumları belirlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortamlardan elde edilen veriler kontrol olarak değerlendirilmiştir. Her bir deneme 3 tekerrür ve ortalama 20'şer örnek olacak şekilde tasarlanmıştır ve ortalamaları alınmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan besi ortamları ve kimyasal içerikleri

| | | OM* | KCM* | LM* | OAM* |
|-----------------------|--|--------|--------|---------|--------|
| Makro elementler mg/L | CaCl ₂ | 166.00 | - | - | 166.0 |
| | KH ₂ PO ₄ | 85.00 | 250.00 | 135.00 | 85.00 |
| | KNO ₃ | 950.00 | - | - | 950.0 |
| | MgSO ₄ | 90.35 | 122.15 | 58.98 | 90.35 |
| | NH ₄ NO ₃ | 825.00 | 500.00 | - | 825.00 |
| | Ca(NO ₃) ₂ | - | 241.30 | 347.20 | - |
| | KCl | - | 250.00 | 1050.00 | - |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | - | 500.00 | 1000.00 | - |
| Mikro elementler mg/L | FeSO ₄ .7H ₂ O | - | 25.00 | - | - |
| | MnSO ₄ .H ₂ O | 8.45 | 5.68 | - | 8.45 |
| | AlCl ₃ .6H ₂ O | - | - | 0.56 | - |
| | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.0125 | - | 0.02 | 0.0125 |
| | FeSitrat | - | - | 4.40 | - |
| | H ₃ BO ₃ | 3.10 | - | 1.01 | 3.10 |
| | KI | 0.415 | - | 0.10 | 0.415 |
| | MnSO ₄ .H ₂ O | 8.45 | - | 0.05 | 8.45 |
| | NiCl ₂ .6H ₂ O | - | - | 0.03 | - |
| | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 5.30 | - | 0.57 | 5.30 |
| | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.0125 | - | - | 0.0125 |
| | FeNaEDTA | 36.70 | - | - | 36.70 |
| | Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O | 0.125 | - | - | 0.125 |
| Vitaminler mg/L | Miyo-inositol | 100.00 | - | - | 100.00 |
| | Nikotinik asit | 1.00 | - | - | 1.00 |
| | Piridoksin HCL | 1.00 | - | - | 1.00 |
| | Tiyamin HCL | 10.00 | - | - | 10.00 |
| Organikler g/L | Glisin | - | - | - | - |
| | Sukroz | 20.0 | - | - | 20.0 |
| | Tripton | 2.0 | - | - | 2.0 |
| | Aktif Kömür | 2.0 | - | - | - |
| | MES (mg/L) | 1000.0 | - | - | 1000.0 |

*OM: Orchimax aktif kömürsüz besi ortamı, KCM: Knudson C besi ortamı, LM: Lindemann besi ortamı, OAM: Orchimax aktif kömürlü besi ortamı.

İstatistik analizleri

Verilerin istatistiksel analizleri Microsoft Excel (Office 2007, ToolPack Analyser) ve SPSS, Versiyon 17,0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılıklar ve farklılıkların önem dereceleri One-way ANOVA değişken analizi Duncan testi ile 0.05 olasılık seviyesinde hesaplanmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

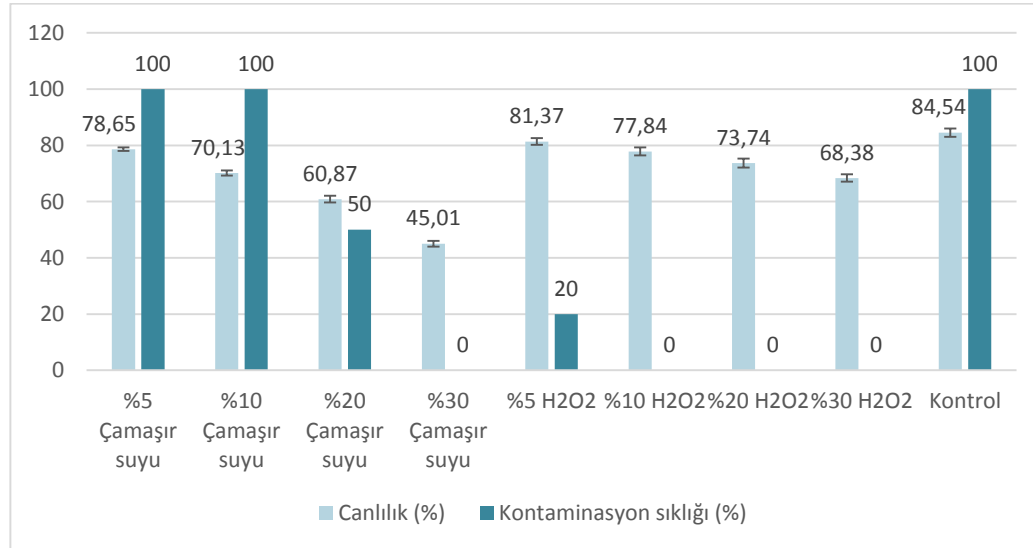
Tohumların canlılık testleri ve sterilizasyonu

Orkide tohumları sert bir tohum kabuğuyla örtülüdürler. Tohumun çimlenebilmesi için bu sert tohum kabuğunun zayıflatılması büyük önem arz etmektedir. Tohumların yüzey sterilizasyonlarında kullanılan kimyasalların türü, derişimi ve muamele edilme süreleri, hem yüzey

sterilizasyonunun hem de tohum kabuğunun zayıflatılması ve daha kolay çimlenmesi için önemlidir. Bu çalışmada, olgun *D. urvilleana* tohumları için, ticari çamaşır suyu ve H₂O₂'nin farklı derişimleri kullanılarak, en uygun yüzey sterilizasyon yöntemi belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, çamaşır suyu ile yapılan yüzey sterilizasyonunda artan derişimlerin tohumların canlılıklarını yitirmelerine neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Derişimleri %5, %10, %20 ve %30 çamaşır suyu olan deneme gruplarında; canlılık oranlarının sırasıyla %78,65; %70,13; %60,87 ve %45,01 olduğu tespit edilmiştir. Farklı derişimlerdeki çamaşır suyu ile sterilize edilen tohumların kültüre alınmasıyla, kültür ortamlarındaki kontaminasyon sıklıklarına bakıldığında artan derişimin kontaminasyonu engellediği görülmüştür. Çamaşır suyunun %5 ve %10'luk derişimleri ile yapılan yüzey sterilizasyonunda kültür kaplarının tamamında kontaminasyon tespit edilmiştir. %20'lik derişimde ise

kültür kaplarının %50'sinde kontaminasyon görülürken, %30'luk derişimde bu olumsuzluğa rastlanmamıştır. Herhangi bir sterilizasyon işlemi uygulanmayan kontrol grubunda ise canlılık oranının %84,54 olduğu ve kontaminasyon sıklığının %100 olduğu gözlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, kontaminasyon oluşumunun dış etmenlerden ziyade tohum kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır. H₂O₂ ile sterilizasyonun araştırıldığı çalışmalarda ise tohumların canlılık oranlarının artan derişime bağlı olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 1). H₂O₂ derişimlerinin %5, %10, %20 ve %30 olduğu durumlarda canlılık oranları sırasıyla %81,37, %77,84, %73,74 ve %68,38 olarak bulunurken, sterilize edilmeyen kontrol grubunda bu oran %84,54 olarak bulunmuştur. %5'lik H₂O₂ ile muamele edilen tohumlarda, besi ortamlarına ekildikten sonra, %20 kontaminasyon oluşumu gözlenmiştir. Buna karşın; denenen diğer H₂O₂ derişimlerinde herhangi bir olumsuzluk gözlenmemiştir.



Şekil 1. Tohumların sterilizasyon sonrası canlılık oranları ve kontaminasyon sıklıkları

Bu sonuçlara göre, Hidrojen peroksitle yapılan denemelerden elde edilen canlılık oranlarının çamaşır suyu ile yapılan denemelerden elde edilenlere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hidrojen peroksitle yapılan çalışmalarda, %5'lik derişim dışındaki derişimlerle muamele edilip kültüre alınan tohumlarda kontaminasyona rastlanmamıştır. Bektaş ve arkadaşları (2013), *Orchis coriophora* türünün yüzey sterilizasyonunu 30 dakika % 20'lik H₂O₂ ile muamele ederek gerçekleştirmiş ve tohumların yüzey sterilizasyonu

sonrası canlılık oranını %54 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmamızda da, *D. urvilleana* olgun tohumlarına uygulanabilecek en uygun yüzey sterilizasyonu için kullanılan kimyasalın H₂O₂ ve derişiminin %10 olduğu belirlenmiştir.

Tohumların *in vitro* asimbiyotik çimlendirilmesi

Orkide tohumları endosperm bulundurmazlar ve bu yüzden doğal ortamlarda çimlenebilmek için mikorizal funguslarla simbiyotik ilişki kurarlar. Funguslar

embriyonun çimlenebilmesi için enerji sağlarlar. *In vitro* koşullarda orkide tohumların çimlenebilmek için gereksinim duydukları besinler ortama eklenerek bu zorunluluk ortadan kaldırılmış olur. Çalışmamızda, *D. urvilleana* olgun tohumları farklı içeriğe sahip temel besi ortamlarında çimlendirilmiş ve bu ortamlardan, OAM ortamında daha yüksek oranda (%62,39) çimlendikleri görülmüştür. Denenen besi ortamlarında KCM ve LM ortamları benzer etki göstermiştir ve sırasıyla %21.41 ve %21.23 oranlarında çimlenme elde edilmiştir. Doğal ortamlarında orkide tohumlarının %5'ten daha azı çimlenebilmektedir ve çimlenebilmek için en azından uygun iklim koşulları oluşuncaya kadar beklemektedirler. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda denenen besi ortamlarının tümünde özellikle de OAM besi ortamından hem çimlenme oranı hem de çimlenme süresi bakımından çok yüksek değerler alınmıştır. Bektaş ve arkadaşlarının (2013) *Orchis coriophora* türünde yaptıkları çalışmada da bizim çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilmiş ve en yüksek çimlenme oranını Orchimax aktif kömürlü besi ortamından (OAM) elde etmişlerdir.

Çalışma kapsamında denenen besi ortamlarından OM ve OAM ortamları inorganik azot kaynağının yanı sıra organik azot kaynağı da (tripton) ihtiva etmektedir. Bu ortamlardaki çimlenme oranlarının diğer ortamlardan daha yüksek olmasının nedeni olarak ihtiva ettikleri organik azot kaynağı gösterilebilir. Daha önce yapılan çalışmalarda inorganik azot kaynağı içermeyen besi ortamlarında ya da inorganik azot kaynağının yanında organik azot kaynağı içeren besi ortamlarında orkide tohumlarının daha yüksek oranlarda çimlendiği bildirilmiştir (Stewart ve Kane 2006). Hatta çeşitli kaynaklarda, inorganik azotun varlığı orkide tohumlarının çimlenmesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Raghavan ve Torrey 1964; Van Waes ve Debergh 1986; Malmgren 1992).

En yüksek çimlenme oranının tespit edildiği OAM ortamı, organik azot kaynağının yanı sıra OM ortamından farklı olarak 2 mg/L aktif kömür içermektedir. Bu iki ortam arasındaki çimlenme oranlarının farklılık, OAM ortamının ihtiva ettiği aktif kömürden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Aktif kömürün, kültür ortamına ekilen tohumlar için karanlık bir ortam sağladığı ve bunun

sonucu olarak ta çimlenmeyi artırdığı düşünülmektedir. Paek ve Murthy (1977), aktif karbonun ortama ışık girişini engelleyerek köklenmeyi artırdığı tespit bildirmişlerdir. Ayrıca aktif karbon ilavesinin kültür ortamındaki pH seviyesini artırdığı ve pH seviyesinin kültüre alma süresince sabit kalmasını sağladığı, azot alınımını artırarak büyümeyi teşvik ettiği tespit edilmiştir (Eymar vd. 2000).

Çimlenen orkide tohumları daha sonra gelişerek protokorm olarak adlandırılan yapılara dönüşürler. Protokormlar da farklılaşarak kök ve sürgün kısımlarını meydana getirirler. *In vitro* ortamda çimlenen tohumların tamamı protokorma dönüşmemekte ve bunun sonucunda yeni orkide fidelerinin oluşumu gerçekleşmektedir. Çalışmamızda, *D. urvilleana* türüne ait tohumların farklı besi ortamlarında çimlendikten sonra protokorma dönüşme kabiliyetleri belirlenmiştir. Buna göre, en yüksek protokorm oluşum oranı, en yüksek çimlenme oranının tespit edildiği OAM ortamında gözlenmiştir (%73.18). Tespit edilen bu oran, çimlenen tohumların ne kadarının bitkiye dönüşebileceğinin göstergesidir. KCM, LM ve OM besi ortamlarından elde edilen protokorm oluşturma yüzdeleri ise sırasıyla %50.75, %50.81 ve %65.15 olarak belirlendi.

Yaptığımız çalışmalar göstermektedir ki, oluşan her protokorm bitkiye dönüşme de, herhangi bir olumsuz koşul oluşmadığı sürece, her protokorm yeni bir (nadiren birden fazla) bitki oluşturma kapasitesine sahiptir. Çalışmamızda, protokormların tamamının bitkiye dönüştüğü belirlenmiştir (bulgu olarak verilmedi). Literatürde, *D. urvilleana*'nın protokorm oluşturma kabiliyetlerine dair herhangi bir rapora rastlanmamıştır. Kallus oluşum oranlarına bakıldığında, KCM ve LM ortamlarında çimlenen tohumlardan kallus oluşumunun söz konusu olmadığı görülmüştür. En yüksek kallus oluşumuna yine OAM ortamında rastlanmıştır. Bu sonuçlara göre incelenen parametreler bakımından *D. urvilleana* türünün *in vitro* asimbiyotik çimlendirilmesinde en etkili temel besi ortamının OAM olduğu görülmüştür.

Tablo 2. *D. urvileana* tohumlarının farklı besi ortamlarındaki çimlenme, protokorm ve kallus oluşturma yüzdeleri

| % | KCM | LM | OM | OAM |
|--------------------|------------|------------|------------|------------|
| Çimlenme * | 21.41±1.5c | 21.23±1.6c | 41.98±1.8b | 62.39±1.6a |
| Protokorm oluşumu* | 50.75±3.6c | 50.81±2.3c | 65.15±1.2b | 73.18±1.2a |
| Kallus oluşumu | 0±0c | 0±0c | 6.2±1.3b | 8.6±1.2a |

* Çimlenme, protokorm oluşturma oranları ve kallus oluşum oranları % olarak hesaplandı ve ± standart sapmaları ile birlikte verildi. Aynı satırdaki benzer harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre (P<0,05) farklı değildirler

Sürgün oluşturma çalışmaları

Temel besi ortamları bitki dokularını canlı ve sağlıklı tutacak şekilde tasarlanır. Kültüre alınan eksplantların gelişimsel programını yönlendirmek için bitki büyüme düzenleyicilerine ihtiyaç duyulur. Büyüme düzenleyicileri, doku kültürü şartlarını iyileştirmek adına üzerinde en çok durulan parametredir. Bitki dokularından organ farklılaşmasında oksin ve sitokininler önemli rol oynamaktadır. Bilindiği gibi sitokinin/oksin oranının yüksek olması sürgün oluşumunu, oksin/sitokinin oranının yüksek olması kök oluşumunu, oksin ve sitokinin oranlarının eşit olması ise kallus oluşumunu desteklemektedir (Werbrouck ve Debergh 1994). Doku kültürü çalışmalarında kullanılan oksin ve sitokinin etkileri, üzerinde çalışılan türlere göre değişmektedir. Bu çalışmada, *in vitro* ortamlarda çimlendirilen *Serapias vomeracea* tohumlarından meydana gelen protokormlar kullanılarak fideler oluşturuldu. Fide oluşumunda, tek başlarına 0.25, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/L derişimlerdeki Zeatin'in 3 aylık inkübasyon sonundaki sürgün oluşumu üzerindeki etkileri belirlenmiştir (Tablo 3).

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre ZEA'nın denenen tüm derişimleri kontrole göre olumlu etki göstermiştir (Tablo 3). ZEA'nın 1.0 mg/L derişiminin sürgün uzamasında daha etkili olduğu görülmüştür. En yüksek sürgün uzama miktarı bu ortamda 36.05 mm ile ölçülmüştür. En düşük uzama miktarı ise 0.25 mg/L derişiminde 21.62 mm olarak ölçülmüştür. Genel olarak 1.0-2.0 mg/l sitokinin çoğu sistemde yeterli olduğu ve yüksek düzeylerinin adventif sürgün oluşumunu arttırma eğiliminde olduğu bildirilmiştir. Bunların sürgün çoğaltım aşamasında kullanılan oranları 0.1-1.0 mg/L olarak belirlenmiştir (Skoog ve Miller 1957; Werbrouck ve Debergh 1994).

ZEA'nın farklı derişimlerinin, kök sayısı üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda ise kök uzamasını en fazla teşvik eden ortamın, sürgün uzamasında olduğu gibi 1.0 mg/L derişimi olduğu belirlenmiştir (Tablo 3). Bu ortamdaki ortalama kök sayısı 3.4 adet olarak hesaplanmıştır. ZEA'nın 0.25, 0.5 ve 2.0 mg/L derişimlerinden elde edilen ortalama kök sayıları ise sırasıyla 2.6, 2.8 ve 2.7 adet olarak hesaplanmıştır. Bu ortamların kök sayısı üzerine etkileri istatistiksel olarak benzerdir ve kontrole göre de olumlu etki göstermişlerdir.

Tablo 3. OM ortamında büyütülen *D. urvileana* türüne ait kök ve sürgün oluşumları üzerine sitokininlerin etkileri

| | Konsantrasyon mg/L | Kök sayısı ¹ | Sürgün boyu (mm) ² |
|-----|--------------------|-------------------------|-------------------------------|
| ZEA | 0.25 | 2.6±0.5b | 21.62±1.1d |
| | 0.5 | 2.8±0.4b | 25.52±0.7c |
| | 1 | 3.4±0.5a | 36.05±2.1a |
| | 2 | 2.7±0.4b | 30.46±1.9b |
| | Kontrol | 1.8±0.4c | 19.14±0.6e |

¹KS: Kök sayısı. 3 aylık fidelere ait kök sayılarının ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen OAM ortamından elde edilen sonuçlar kontrol değeri olarak değerlendirildi.

² Uzama miktarı. 3 aylık fidelere ait son boyları ile başlangıç boyları arasındaki farkları alındı ve bu farkların ortalamaları alınarak ± standart sapmalarıyla verildi. Her bir ortam için 20'şer örnekten ölçüm alındı. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen OAM ortamından elde edilen sonuçlar kontrol değeri olarak değerlendirildi.

Aynı sütundaki benzer harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre (P<0,05) farklı değildirler

Çalışma kapsamında, bitki büyüme düzenleyicilerinin etkilerinin incelendiği parametrelerden birisi de yaprak sayısındaki artıştır. Ancak, yapılan gözlemler sonucunda *in vitro* ortamda büyütülen *D. urvileana* fidelerinin gözlem süresi boyunca tek bir yapraktan ibaret olduğu ve bu şekilde gelişmeye devam ettiği görülmüştür (Şekil 2). Bu yüzden yaprak sayısı ile ilgili sayısal bir veri sunulamamıştır.



Şekil 2. OAM ortamında yetişen, kök ve sürgün oluşumu gerçekleşmiş 3 aylık (protokorm oluşumundan sonra) *D. urvileana* fideleri

KAYNAKLAR

- Arditti J, Michaud JD, Oliva AP (1981) Seed germination of North America Orchids. I. Native California and related species of *Calypso*, *Epipactis*, *Goodyera*, *Piperia* and *Platanthera*, Botanical Gazette 142:442-453
- Arditti J, Ghani AK (2000) Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytologist 145:367-421
- Bektaş E, Cüce M, Sökmen A (2013) *In vitro* germination, protocorm formation and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. Turkish Journal of Botany 37:336-342
- Crafts CB, Miller CO (1974) Detection and identification of cytokinins produced by mycorrhizal fungi. Plant Physiology 54:586-588
- Eymar E, Alegre J, Toribio M, Lo'pez-Vela D (2000) Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 63:57-65
- Hartman HT, Kester DE (1975) Plant Propagation - Principles and Practices. Prentice-Hall. Inc, New Jersey
- Malmgren S (1992) Large-scale asymbiotic propagation of *Cypripedium calceolus* -plant physiology from a surgeon's point of view. Bot Gard Micropropagation News 1: 59-63
- Mansuroğlu S, Gürel E (2001) Mikroçoğaltım. In: Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S (ed) Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, pp 262-281
- Mitchell RB (1989) Growing Hardy Orchids from Seeds at Kew. The Plantsman 2:152-169
- Paek KY, Murthy HN (1977) Temperate Oriental *Cymbidium* species. In: Kull T, Arditti J (ed) Orchid Biology: Reviews and Perspectives, VIII. Edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 287
- Raghavan V, Torrey JG (1964) Inorganic nitrogen nutrition of the seedlings of the orchid, *Cattleya*. American Journal of Botany 51:264-274
- Sezik E (1984) Orkidelerimiz. Sandoz Kültür Yayınları, No:6, pp 166
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology 11:118-130
- Stewart SL, Kane ME (2006) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell Tissue and Organ Culture 86:147-158
- Van Waes JM, Debergh PC (1986) *In vitro* germination of some Western European Orchids. Physiologia Plantarum 67:253-261
- Werbrouck SPO, Debergh PC (1994) Applied aspects of plant regeneration (micropropagation). In: Dixon RA, Gonzales RA (ed) Plant Cell Culture - A Practical Approach, Oxford University Press, New York, pp 127-135
- Yamazaki J, Kazumitsu M (2006) *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). Annals of Botany 98:1197-1206