

Hızlı, Güvenilir ve Ev Ortamında Doku Kültürü Yöntemi ile Tohum Kapsülünden Orkidenin (*Dendrobium* sp.) Çoğaltılması

Fatma Tunaboğlu¹, Elif Yüzbaşıoğlu^{2*}

¹Erenköy Kız Lisesi, Kadıköy, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı, Beyazıt, İstanbul, Türkiye

*Sorumlu yazar / Correspondence: aytamka@istanbul.edu.tr

Geliş/Received: 01.06.2022 • Kabul/Accepted: 02.12.2022 • Yayın/Published Online: 30.12.2022

Öz: Son yıllarda, birçok süs bitkisinin çoğaltılmasında ve ıslahında, geleneksel yöntemlerin yanı sıra, biyoteknolojik bir yöntem olan bitki doku kültürü tekniği de yaygın olarak kullanılmaktadır. Orkide doku kültürü yöntemi ile çoğaltılan ilk süs bitkilerinden biridir. Orkidenin doku kültürü ile çoğaltılması, tüm dünyada satın alınabilir ve yaygın bir süs bitkisi haline dönüşmesine neden olmuştur. Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda orkidenin aktif kömür içeren MS besiyeri ortamında mikro çoğaltımı amaçlanmıştır. Laboratuvar çalışması tamamen ev ortamında sağlanmış ve başarılı bir şekilde sonuçlanmıştır. Olgun orkide tohumları asimbiyotik olarak aktif kömür içeren MS ortamında çimlendirildikten sonra, kallus dokusu elde edilmiştir. Kallus dokusundan da çok sayıda orkide bitkicikleri elde edilmiştir. *In vitro* koşullarda üretilen orkide bitkicikleri sphagnum yosunu kullanılarak dış ortama alıştırılmıştır. Sonuçta, bitki doku kültürü yöntemi ile tohumdan, aktif kömür içeren ortamda başarılı bir şekilde orkide bitkisinin mikroçoğaltımı gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Aktif Kömür, *Dendrobium* sp., mikroçoğaltım, sphagnum yosunu

Reproduction of Orchid (*Dendrobium* sp.) From Seed Pod with Fast, Reliable and Homemade Tissue Culture Method

Abstract: In recent years, plant tissue culture has been widely used in the reproduction and breeding of many ornamental plants, as well as traditional methods. Orchid is one of the first ornamental plants propagated by tissue culture method. Propagation of the orchid by tissue culture has caused it to become a common ornamental plant that can be purchased all over the world. In this study, it was aimed to micropropagate orchid in *in vitro* conditions in MS medium containing activated charcoal. The laboratory work has been completely provided in the home environment and has been successfully concluded. Callus tissue was obtained after mature orchid seeds were germinated aseptically in MS medium containing activated charcoal. Many orchid plantlets were obtained from callus tissue. Orchid plantlets produced *in vitro* conditions were acclimated to the external environment using sphagnum moss. As a result, successful micropropagation of orchids was achieved from seed in medium containing activated charcoal by plant tissue culture method.

Key words: Activated Charcoal, *Dendrobium* sp., Micropropagation, Sphagnum Moss

GİRİŞ

Orchidaceae (Orkide) familyası, 736-899 cins, 27.800 isimlendirilmiş tür sayısı ve 100.000'dan fazla hibrit türü ile en büyük bitki ailesinden birini oluşturmaktadır (Chase vd, 2015; Cardoso vd, 2020). Orkidelerin floristik ve ekolojik önemlerinin yanı sıra; gösterişli ve uzun ömürlü çiçeklerinden dolayı çiçekçilik endüstrisinde popülaritesi artış göstermektedir. Son yıllarda, Orchidaceae familyası ekonomik olarak çiçekçilik sektöründe önemli bir yer tutmaktadır. Orkide familyasının *Dendrobium* sp., *Oncidium* sp., *Phalaenopsis* sp., *Cattleya* sp., *Vanda* sp., *Ascocenda* sp., *Brassavola* sp., *Mokara* sp., *Paphiopedilum* sp. türleri saksı ve kesme çiçek üretiminde kullanılmaktadır. *Dendrobium* cinsi, Orchidaceae familyasındaki üçüncü büyük grubu oluşturmaktadır (Nongdam ve Tikendra, 2014). Bu cinsin hızlı büyümesi, bitkicik rejenerasyonunun kolaylığı, çiçeğin güzelliği, çiçeklenmesinde yıl boyunca üretimi ve çiçek sapının uzun ömürlü olması çiçekçilik sektöründe talebini arttırmaktadır (Riva, 2016). Bu nedenle ticari olarak kullanılan orkidelerin arasında, doku kültürü yöntemi ile üretilen tropik orkidelerin %80'ini *Dendrobium* oluşturmaktadır (Nge vd., 2006).

Bitkilerin doku kültürü yöntemi ile mikroçoğaltımı, geleneksel olarak tohum veya vejetatif yöntemler ile üretilmesi zor olan orkidelerin ve süs bitkilerinin, çok sayıda çoğaltılması ve bulunabilirliğinin sağlanması için önemli ve yaygın bir teknik haline gelmiştir (Özzambak, 2022). *In vitro* mikroçoğaltım tekniği, değerli genotiplerin hızlı çoğaltılması, yeni varyetelerin geliştirilmesi, seri üretim, genetik kaynakların korunması gibi birçok avantaj sağlamaktadır (Riva, 2016). *In vitro* teknikler bahçecilik ve çiçekçilik gibi tarımsal alanlarda, bitki verimini artırmasından dolayı üreticiler tarafından tercih edilmektedir (Riva, 2016).

Mikropropagasyon veya büyük ölçekli klonal çoğaltma işlemi bitki biyoteknolojisinin en önemli uygulama alanlarından biridir (Yüzbaşıoğlu vd., 2012). *Dendrobium* orkidelerinden kök, yaprak, çiçek sapı, nod, protokorm gibi farklı eksplant tipleri kullanılarak kallus dokusundan somatik embriyogenez yolu ile ya da doğrudan aksillar gövde oluşumunun teşvik edilmesi ile somaklonal çoğaltım yapılmaktadır (Da Silva vd., 2015). Protokorm-benzeri gövde (PBG) orkidinin *in vitro* kültüründe gelişen organı olarak tanımlanır. *In vitro* kültür ortamında elde edilen orkideler morfolojik, yapısal ve fonksiyonel olarak benzer yapıdadır.

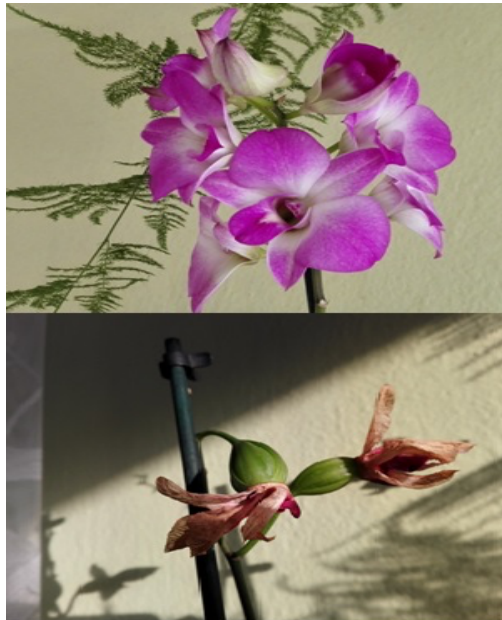
Orkide bitkisi endosperm içermeyen, mikroskobik boyutta çok sayıda tohum üretebilir. Doğal ortamda, orkide tohumlarının çimlenmeleri mantar ile mikoriza oluşturmaları ile gerçekleşmektedir (Warghat vd., 2014). Çimlenme olayında etkin olan mikorizal mantarlar besin ihtiyacını sağlamaktadır. Bu süreç simbiyotik tohum çimlenmesi olarak isimlendirilir. Knudson (1922) tarafından, orkidelerin çimlenme ortamına karbonhidrat kaynağı olarak şeker eklenerek simbiyotik olmayan (asimbiyotik) çimlenme yöntemi keşfedilmiştir. Böylelikle orkide kapsüllerinden mikorizal mantarlara ihtiyaç duymadan *in vitro* koşullarda tohumlarının çimlenmesi sağlanmaktadır. Orkidelerin asimbiyotik tohum çimlenmeleri ticari olarak önemli orkide türlerinin üretimi için sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca bu yöntemin, doğal orkide türlerinin korunması ve rehabilitasyonu için de etkili bir araç olduğu gösterilmiştir (Bektaş, 2016). Orkide tohumlarının *in vitro* çimlenmesi tohum yaşı, besin ve organik karbon içeriği gibi bir çok faktörden etkilenmektedir (Mohanty vd., 2012). Çimlendirilmiş tohumlardan protokorm-benzeri gövde (PBG) geliştirilmesi *in vitro* koşullarda orkide üretimi için güvenilir bir yöntem haline gelmiştir (Mohanty vd., 2012). PBG kısa sürede ve çok sayıda elde edilebildiği için, hızlıca bitkiciklere dönüşebilir. Bu nedenle orkidinin çoğaltım çalışmalarında tercih edilmektedir. PBG, gövde ve kök meristemlerini içeren iki farklı bipolar yapıda orkide embriyolarına farklılaşabilen bir dokudur.

Bu çalışmada, süs bitkisi olarak kullanılan *Dendrobium* türü orkidinin tohum kapsülünden *in vitro* koşullarda mikroçoğaltımı hedeflenmiştir. Ayrıca, bilimsel çalışma prensipleri kullanılarak, tamamen ev ortamında gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Dendrobium tohum kapsülü üretimi

Süs bitkisi olarak kültüre alınmış orkide (*Dendrobium* sp.) türünün kapsülleri çalışma materyalini oluşturmaktadır (Şekil 1). Bu amaçla çiçeklenme dönemindeki orkidinin polenleri tozlaşmasını sağlamak için kürdan yardımı ile stigma bölgesine yerleştirilmiştir. Tozlaşma işlemi başarılı olan çiçeklerde, bir hafta sonunda çiçek sapları kalınlaşıp şişmeye başlamıştır. *Dendrobium* orkidesinin kapsülleri yaklaşık 4 ay içinde olgunlaşmıştır (Şekil 1). Kapsül hasat edilip ortadan kesildiğinde binlerce sarı toz benzeri tohumlar kapsülden kolayca elde edilmiştir.



Şekil 1. *Dendrobium* çiçeği ve tohum kapsülü.

Tohum kapsülünün sterilizasyonu

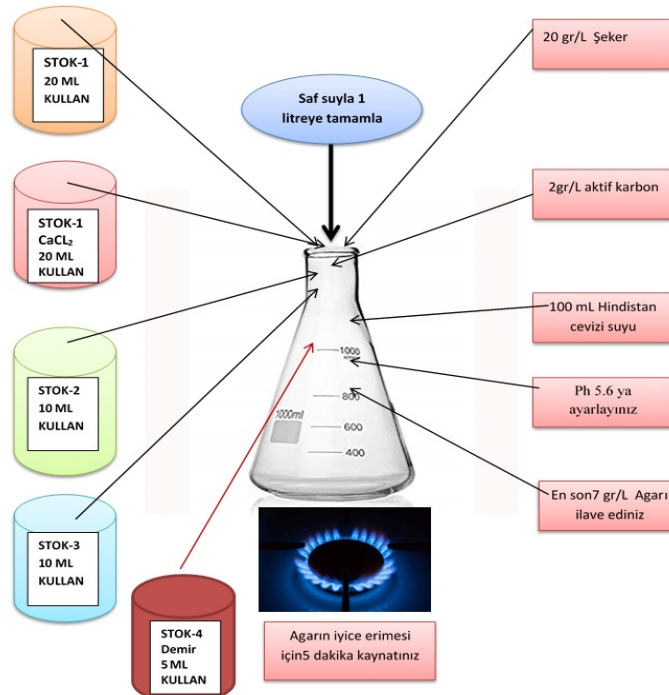
Olgunlaşan *Dendobium* tohum kapsülünün sapı makasla kesilerek hasat edilmiştir. Kapsülün sapından maşa ile tutulacak kadar küçük bir sap bırakılmıştır. Bir miktar bulaşık deterjanı ile akan suda fırçalayarak kaba kir ve tozlardan arındırılmıştır. Daha sonraki işlemler steril ortamda yapılmıştır. Yıkanan kapsüller, 3 dakika %70'lik etil alkolde bekletildikten daha sonra, %30'luk ticari çamaşır suyu içerisinde 20 dakika boyunca çalkalayıp bekletilmiştir. Çamaşır suyundan çıkarılan kapsüller, %96'lık etil alkole batırılıp çıkarıldıktan sonra, hızlıca alevden geçirilerek hemen söndürülmüştür. Kapsülü alevden geçirme işlemi hızlıca ve 3 defa tekrarlanarak yapılmıştır. Sterilizasyon işlemi tamamlanan kapsüller ekim işlemine kadar, steril petri içerisinde buzdolabında bekletilmiştir.

Besiyeri Hazırlanması

Murashige ve Skoog (1962) tarafından önerilen makro ve mikro elementleri içeren temel tuz içeriği (MS besiyeri) tablo 1 de verilen solüsyonlar ile hazırlanmıştır. MS besiyerinin hazırlanışı Şekil 2'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Hazırlanan besiyerinin pH'sı 5,6 olarak ayarlanmıştır. Sterilizasyon öncesinde 2gr/L olacak şekilde aktif kömür ilave edilmiştir. Hazırlanan MS besiyerinin sterilizasyon işlemi 20 dk boyunca düdüklü tencere kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. MS besiyeri hazırlanması.

Stok adı	M&S makro molekül	(1X) gr/L
Stok 1	KNO ₃	1,9 gr
	NH ₄ NO ₃	1,65 gr
	CaCl ₂	0,44 gr
	M&S mikro molekül	(1X) gr/L
Stok 2	KH ₂ PO ₄	0,17 gr
	H ₃ BO ₃	0,0062 gr
	KI	0,00083 gr
	Na ₂ MoO ₄	0,00025 gr
	CoCl ₂	0,000025 gr
	M&S minör molekül	(1X) gr/L
Stok 3	MnSO ₄	0,0169 gr
	ZnSO ₄	0,0086 gr
	MgSO ₄	0,37 gr
	CuSO ₄	0,000025 gr
Stok 4	Demir Stok solüsyonu	1,25 gr toz demir /250 ml
	Vitamin	
Stok 5	hindistan cevizi suyu	



Şekil 2. MS besiyeri hazırlama şeması.

Orkide Tohumlarının MS ortamına ekilmesi

Alkol ile temizlenmiş ve ispirto ocağı yakılan steril ortamda ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon işlemi tamamlanan orkide kapsülleri, bir pens yardımı ile besiyeri üzerine silkelenerek, tohumların yayılması sağlanmıştır. Tohum ekilen petri kapları 10 gün boyunca karanlıkta oda sıcaklığı koşullarında bekletilmiştir. Daha sonra, oda sıcaklığında aydınlık bir ortamda üretim gerçekleştirilmiştir.

Bebek orkidelerin *in vitro* ortamdan çıkartılması

Dış ortama alınacak olan bebek orkideler dikkatli bir şekilde besiyeri ortamından alınmıştır. Besiyeri parçalarını tamamen temizlemek için yaklaşık 30 °C'lik su ile kökler yıkanmıştır. Daha sonra, kökler fungusit ve bakterisit solüsyonu içine batırılıp çıkartılmıştır. Kağıt havlu yardımı ile fazla suyu alınan *Sphagnum* yosunu içine bebek orkidelerin ekimi gerçekleştirilmiştir.

Bebek orkidelerin *Sphagnum* yosunu ile dış ortama alıştıırılması

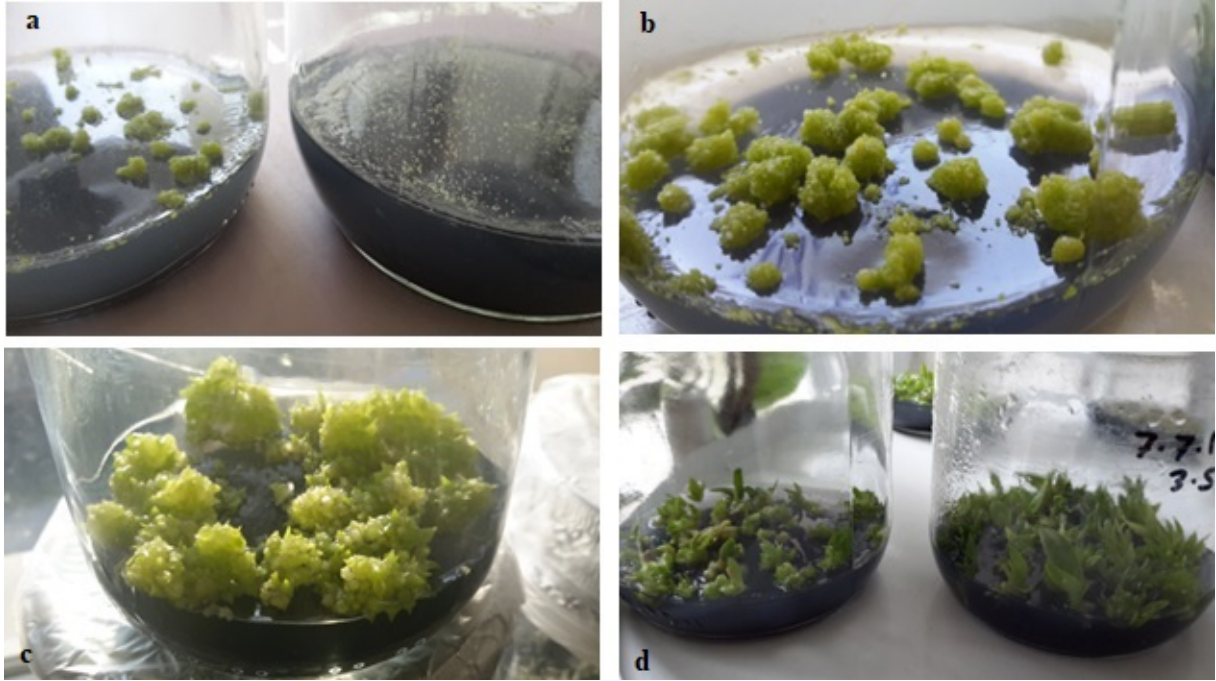
Bebek orkidelerin adaptasyon işlemi, 25-28 °C'de, aydınlık ve doğrudan güneş ışığı almayan bir ortamda gerçekleştirilmiştir. *Sphagnum* yosunu ıslatılıp fazla suyu sıkıldıktan sonra mikro dalga fırında 5 dakika steril edilmiştir. Şeffaf, ağzı kapaklı ambalaj kutusunun içine biraz kömür parçası serilerek, üzerine nemli sphagnum yosunları ilave edilmiştir. Her bir orkidenin kökü biraz yosunla sarılıp köklerin kurummasını önleyecek şekilde yosunlu kutuya ekilmiştir. Kutunun ağzı nem ve ısı kaybetmesin diye bir hafta kapatılmıştır. Bir hafta sonra kapağına bir delik, sonraki hafta iki delik, sonraki hafta üç delik açılarak yavaş yavaş ortama alıştıırılmıştır. Ara sıra kapak açılarak kısa süreliğine hava alması sağlanmıştır. Her gün nem kontrolü yapılmıştır. Orkidelerin üzerine 1/2 MS (mineralli su) içeren su ile her gün çok az spreyleme yapılmıştır ve dış koşullara alıştıktan sonra kutuların kapakları tamamen açılmıştır. Tamamen dış ortama alışan bebek orkideler yeni ortama alınmıştır. Bu ortamda kömür taneleri, ağaç ve çam kabukları ile *sphagnum* yosunundan elde edilmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma, bilimsel teknikler kullanılarak ev ortamında kurulan doku kültürü laboratuvarında başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmamızın sonuçları, doku kültürü tekniğinin laboratuvar ortamı dışında da, bir bitkinin hızlı ve güvenilir üretimi için kullanılabilirliği sonucunu desteklemektedir. Çalışmamız, vejetatif ve tohum çimlenmesi yöntemi ile ev ortamında üretimi zor olan *Dendrobium* orkide türü seçilmiştir (Şekil 1). *Dendrobium* orkidesinin tozlaşması el yardımı ile başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Döllenmenin başarılı olduğu çiçeklerde, tohum kapsüllerinin 3-4 ay boyunca olgunlaşması beklenmiştir (Şekil 1). Olgunlaşan tohum kapsüllerinin başarılı olan sterilizasyonu sonrası, asimbiyotik tohum çimlenmesi aktif kömür tozu içeren MS besiyeri ortamında karanlıkta gerçekleşmiştir (Şekil 3a). Çimlenen tohumlar 7-10 gün içerisinde kallus dokusunu oluşturmuştur (Şekil 3b). Kallus dokusu yaklaşık 1 ay sonra, çok sayıda protokorm benzeri gövdeleri oluşturmuştur (Şekil 3c). Yaklaşık 2 ay sonunda, birinci alt kültür gerçekleştirilmiştir (Şekil 3d). Alt kültürde aynı besiyeri ortamına aktarım yapılmıştır. Büyüyen kallus ve çok sayıda oluşan protokorm benzeri gövdelerden dolayı ekim yapılan petri sayısı fazlaştırılmıştır. Alt kültüre alma işlemi ayda bir olacak şekilde dört defa tekrarlanmıştır. Altı ayın sonunda, 3-5 yapraklı ve 1-2 cm kök uzunluğunda bebek orkideler elde edilmiştir (Şekil 4a-d). MS besiyeri içerisinde herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi kullanımına gerek duyulmamıştır. Sadece MS besiyeri ortamında da çimlenme ve kallus oluşumu gözlenmiştir. Ancak, MS besiyerine aktif kömür eklenmesi hem çimlenme hem de kallus üretimini yüksek oranda hızlandırmıştır. Aktif kömür, bitki doku kültürü çalışmalarında hücre büyüme ve gelişmesinin teşvik edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Doku kültürü ortamına aktif kömür eklenmesi, fenolik oksidasyonunu önemli miktarda azaltarak, en uygun morfogenez oluşumu için ortamın pH sınırını düzenlemektedir (Yüzbaşıoğlu ve Dalyan, 2017). De Stefano vd (2022) yaptıkları çalışmada nesli tehlike altında olan *Epidendrum nocturnum* orkide türünü tohumlarını *in vitro* koşullarda aktif kömür ve Hindistan cevizi suyu içeren besiyeri ortamında çimlendirerek, mikropropagasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirmişlerdir.

In vitro koşullarda çok sayıda elde edilen bebek orkidelerin steril olmayan dış ortama aktarılmaları, çalışmanın en zor kısmını oluşturmaktadır. Bu aşamada, fidelerin dış ortamdaki mikrobiyal çevreye alışmaması ve nem kaybının engellenememesinden dolayı kökler çürümüş, orkide bitkiciklerinde ölümler gerçekleşmiştir. Bu nedenle *sphagnum* yosunu kullanılarak adaptasyon çalışması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 5). *Sphagnum* yosununun yüksek oranda su tutması, antibakteriyel özellikte olması ve nefes olabilen yapıda olmasından dolayı dış ortama adaptasyon sürecinde kullanılması tercih edilmiştir. Bu çalışma ile benzer şekilde doku kültürü yöntemi ile çoğaltılan *Epidendrum nocturnum* orkide türünün dış ortama alıştıırılmasında *sphagnum* yosunu kullanmışlardır (De Stefano vd., 2022).

Bu çalışmanın sonucunda, ev ortamında başarılı, basit, uygulanabilir ve bilimsel ölçütlerde bitki doku kültürü protokolü ortaya konmuştur. Oluşturulan bitki doku kültürü protokolü ortaöğretimde ve lisans düzeyinde proje çalışması yapacak olan öğrenciler için önemli bir kaynak oluşturacaktır.



Şekil 3. a) steril tohum kapsülünden aktif kömür içeren besiyeri ortamına ekimi yapılan orkide tohumları, b) orkide tohumlarından 7-10 gün sonra kallus dokusunun oluşumu, c) kallus dokusundan protokorm benzeri gövdelerin oluşumu, d) alt kültüre alınan orkide bitkicikleri.



Şekil 4. a-d) Aktif kömür içeren MS besiyeri ortamında kök ve gövde oluşumu.



Şekil 5. a-b) doku kültürü koşullarında elde edilen orkide bitkiciklerinin dış ortama alıştırılması. Gövde ve kök oluşumu, **c-d)** orkide bitkiciklerinin spagnum yosunu kullanılarak saksılarda ekimi.

KAYNAK LİSTESİ

- Bektaş, E. (2016). *Dactylorhiza urvileana*'nın in vitro asimbiyotik çimlendirilmesi ve fidelerinin oluşturulması. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 17 (1): 89-95.
- Cardoso, J.C., Zanello, C.A. ve Chen, J-T. (2020). An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 985; doi:10.3390/ijms21030985.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudentein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., Van den Berg, C. ve Schuiteman, A. (2015). An update classification of Orchidaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 177: 151-174.
- Da Silva, J.A.T., Cardoso, J.C., Dobránszki, J. ve Zeng, S. (2015). *Dendrobium* micropropagation: a review. *Plant Cell Rep.* 34: 671-704.
- De Stefano, D., Costa, B.N.S., Downing, J., Fallahi, E. ve Khoddamzadeh, A.A. (2022). In-vitro micropropagation and acclimatization of an endangered native orchid using organic supplements. *Am J Plant Sci.* 13: 380-393.
- Mohanty, P., Paul, S., Das, M.C., Kumaria, S. ve Tandon, P. (2012). A simple and efficient protocol for the mass propagation of *Cymbidium mastersii*: an ornamental orchid of Northeast India. *AoB PLANTS* 2012: plso23; doi:10.1093/aobpla/plso23.
- Murashige, T. ve Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15: 473-497.
- Nge, K.L., Nwe, N., Chandkrachang, S. ve Stevens, W.F. (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Sci.* 170: 1185-1190.
- Nongdam P. ve Tikendra, L. (2014). Establishment of an efficient in vitro regeneration protocol for rapid and mass propagation of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. using seed culture. *The Scientific World Journal.* 740150, <http://dx.doi.org/10.1S155/2014/740150>
- Özzambak, M.E. Süs Bitkilerinde Doku Kültürü Uygulamaları. <https://www.turktob.org.tr/upload/dergi/14/16-21.pdf>. (Erişim tarihi:31.05.2022)
- Riva S.S. (2016). *In Vitro Regeneration and Rapid Multiplication of Two Orchid Varieties of Dendrobium bensoniae* and *Dendrobium aphyllum*. Yüksek Lisans Tezi, Biotechnology Program Department of Mathematics and Natural Sciences BRAC University, Bangladesh.
- Warghat, A.R., Bajpai, P.K., Srivastava, R.B., Chaurasia, O.P., Chauhan, R.S. ve Sood, H. (2014). In vitro protocorm development and mass multiplication of an endangered orchid, *Dactylorhiza hatagirea*. *Turk J Bot.* 38: 737-746.
- Yüzbaşıoğlu, E. ve Dalyan E. (2017). Büyüme hormonları ve aktif kömürün in vitro koşullarda kardelen (*Galanthus woronowii* Losinsk.) soğancık oluşumuna etkisi. *Mediterr Agric Sci.* 30 (3): 239-243.
- Yüzbaşıoğlu, E., Dalyan, E., Bona, M. ve Öz, G. (2012). In vitro propagation of endemic plant *Centaurea arifolia* Boiss. *Taxa. Eur J Biol.* 71 (2): 121-127.