

Kloralhidratın *Ophrys mammosa* Desf. ssp. *mammosa* (Orchidaceae) Ovülleri Üzerine Etkisi

Mehmet AYBEKE^{1*}

¹Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Balkan Yerleşkesi, 22100, Merkez, Edirne

¹orcid.org/0000-0001-9512-5313

*Sorumlu yazar: mehmetaybeke@trakya.edu.tr

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi:

Geliş tarihi: 06.01.2023

Kabul tarihi: 07.05.2023

Online Yayınlanma: 20.12.2023

Anahtar Kelimeler:

Orkide
Ophrys
Ovul
Tohum
Kloralhidrat

ÖZ

Orkide tohumları şeffaftır ve embriyoları rahatlıkla görünmektedir. Daha evvelki çalışmamızda farklı enzimlerle maserasyon tekniği kullanılarak embriyoların, şeffaf tohumlardan izolasyonu yapılmıştı. Bu çalışmada ise daha basit bir yöntemle kloralhidrat ve buna benzer farklı şeffaflaştırıcı ve doku geliştirici kimyasallar kullanarak basit embriyo izolasyonu yönteminin oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmada 2 farklı yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntemde farklı oranlarda laktik asit, kloralhidrat, fenol, karanfil yağı ve ksilol karışımında disekte edilmiş orkide ovülleri, farklı sürelerde (24 saat, 48 saat ve 72 saat) bekletilmiştir. Diğer yöntemde ise sadece kloralhidrat eriğinde ovüller 24 saat, 48 saat ve 72 saat olmak üzere 3 farklı sürelerde bekletilmiştir. Her iki yöntemde de ovüllerden embriyoların hafif bir bastırma ile kolayca çıkıp çıkamadığı test edilmiş ve ayrıca ovüllerden baskı ile çıkan embriyoların bütünlüğü ya da parçalı olma durumuna göre yöntemlerin verimliliği birbiri ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak; sadece kloralhidrat içinde 72 saat bekletilen ovüllerden embriyoların rahat izolasyonu ve embriyoların bütünlüğü ve sağlamlığı açısından bu yöntemin daha verimli olduğu tespit edilmiştir. İlâveten bu yöntem ile embriyoların ve süspansör yapılarının çok kolay ve pratik bir şekilde ovüllerden çıkışı gözlenmiştir. Ayrıca yöntemin funikulus, plasenta, karpel, megasporosist-arkeosporal hücre ve ovul gelişimi çalışmalarına hız kazandıracakları anlaşılmıştır. Böylece uzun süreli gömme ve mikrotomda histolojik kesitlere gerek kalmaksızın bazı önemli embriyonal ve süspansör yapılarının pratik ve hızlı bir şekilde incelenebilmesi mümkün olmuştur. Yöntemin faydaları ve yetersiz olduğu noktalar değişik güncel makaleler eşliğinde tartışılmıştır.

Effect of Chloralhydrate on *Ophrys mammosa* Desf. ssp. *mammosa* (Orchidaceae) Ovules

Research Article

Article History:

Received: 06.01.2023

Accepted: 07.05.2023

Published online: 20.12.2023

Keywords:

Orchid
Ophrys
Ovule
Seed
Chloralhydrate

ABSTRACT

Orchid seeds are transparent and embryos can be seen easily. In our previous study, embryos were isolated from transparent seeds using the maceration technique with different enzymes. In this study, it was aimed to create a simple embryo isolation method by using chloral hydrate and similar different clearing and tissue expanding chemicals with a simpler method. Two different methods were used in the study. In the first method, dissected orchid ovules were kept for different times in a mixture of lactic acid, chloral hydrate, phenol, clove oil and xylol at different rates. In the other method, ovules were kept in chloralhydrate solution for 3 different times: 24 hours, 48 hours and 72 hours. In both methods, it was tested whether the embryos could easily come out of the ovules with a slight pressure, and also the fertility of the methods was compared with each other according to the integrity or fragmentation of the embryos that came out of the ovules with pressure. As a result; it has been determined that this method is more efficient in terms of comfortable isolation

of embryos from ovules kept in chloral hydrate for 72 hours and in terms of integrity and robustness of embryos. In addition, with the efficiency of this method, it has been observed that the embryos and suspensor structures exit the ovules in a very easy and practical way. In addition, it has been understood that the method will accelerate the studies of funiculus, placenta, carpel, megasporist-archaeosporal cell and ovule development. Thus, it has been possible to examine some important embryonal and suspensory structures practically and quickly without the need for long-term embedding and histological sections in the microtome. The benefits of the method and its inadequacies, albeit partially, were discussed in the presence of various current articles.

To cite: Aybeke M. Kloralhidratın *Ophrys mammosa* Desf. ssp. *mammosa* (Orchidaceae) Ovülleri Üzerine Etkisi. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2023; 6(Ek Sayı): 55-71.

Giriş

Orchidaceae familyası, karasal veya ağaçlar üzerinde epifitler olmak üzere ototrof, saprofitik veya parazitik çok değişik yelpazede bitki formlarını içermektedir (Leake, 2005). Bitkilerin en büyük ailesi olarak kabul edilen Orchidaceae, 25.000–35.000 türden oluşmaktadır (Attri ve ark., 2020). Türkiye’deki orkidelerin büyük bir bölümü Orchidoideae subfamilyası Orchideae tribusuna ait karasal orkidelerdir. Türkiye’de Orchidaceae familyası 24 cins ve toplamda 229 taksonla temsil edilmektedir (Güler ve Deniz 2012), ve bu sayı her geçen gün yeni orkidelerin keşfi ile gittikçe artmaktadır. Bu dikkate değer güzellikte bitkiler, çiçek varyasyonları ve değişik tozlaşma yöntemleri ile birçok araştırmacının ilgi odağı olmuştur (Cozzolino ve Widmer 2005).

Ophrys mammosa subsp. *mammosa*’nın genel özellikleri şöyledir: Bitkiler 20-50 cm, 3-6 (-9) adet oblong-ovat veya lanseolat yapraklı, Spika 2-10 çiçekli, çiçekler büyük, çanak yapraklar yeşil, 14 mm’ye kadar uzunlukta, dorsal dik, oblong, bazen geriye doğru kıvrılmış, lateral olanlar yayık, alt yarısı bazen kırmızımsı- veya morumsu-kahverengi tonlu, petal ovat-lanseolat, labellum yuvarlak veya ovat, genellikle ± düz veya hafif kıvrık, 16 x 16 mm’ye kadar boyutlarında, tam veya nadiren küçük yan girintili, , apekte çok az mukronat, tabana yakın iki yuvarlak meme benzeri çıkıntılı, çıkıntıların dış tarafı genellikle villoz, koyu kestane rengi ile siyahımsı -kahverengi kadifemsi renkli, spekulum ± H şeklinde, soluk mavimsi, tüysüz, çiçeklenme: 3-5 aylar arası (Güler ve Deniz, 2012)

Tohumlarla ilgili olarak ekseriyetle sistematik morfolojik çalışmalar yapılmıştır. Testa retikülasyonları, antiklinal ve periklinal çeper özellikleri, retikülasyonların antiklinal çepere olan açıları, retikülasyonların çatallanma durumu vb. gibi değişik morfolojik kriterler deskriptif ve diagnostik karakter olarak tür ayırımında kullanılmaktadır (Clifford ve Smith, 1969; Barthlott, 1976; Arditti ve ark., 1979; 1980; Chase ve Pippen, 1988; Aybeke, 2007). İlâveten nesli tehlike altında olan orkideler üzerinde ex situ koruma, mikorizal ilişkiler, tohum çimlenmesi, orkide tohumlarının uzun süre canlılıklarının yitirmeden korunması gibi değişik tohum eksenli çalışmalar yapılmıştır (Kauth ve ark., 2008; Hongxia ve ark., 2010; Kendon ve ark., 2017; Yeung, 2017).

Toz şeklindeki orkide tohumlarının sayısal ve fiziksel özellikleri, Arditti ve Ghani (2000) tarafından yapılan kapsamlı bir incelemede detaylandırılmıştır. Buna göre; bir embriyo, görünür bir kotiledonu olmayıp, testa içinde küresel-oval bir şekildedir. Kök ve sürgün apikal meristemleri gibi farklı

dokulara belirgin yapısal farklılaşma ve birincil meristemleri yoktur. Bir başka belirgin özellik; orkide tohumlarının içinde bir endosperm olmamasıdır.

Tohumun çimlenme sonrası gelişim anatomisi çalışmaları da dikkat çekicidir. Örneğin; tohum çimlenmesi bir protokorm oluşumu ile sonuçlanır. Doğada, bir protokormun başarılı bir şekilde büyümesi, bir mikorizal mantar ile simbiyotik birlikteliği gerektirir (Rasmussen, 1995; Peterson ve ark., 1998; Yeung, 2017). Apikal meristemler aktivitesiyle protokormdan sonunda fide oluşumu gerçekleşir (Vinogradova ve Andronova, 2002; Yeung, 2022).

Orchidaceae familyasında birçok farklı embriyolojik gelişmenin varlığından dolayı embriyoloji çalışmalarının taksonomik önemi vurgulanmıştır (Sharma ve Vij, 1987; Sood ve Sham, 1987; Yung-I ve ark., 2006, 2008). Zira bu öneme atfen Aybeke (2012), *Ophrys mammosa*'nın anter çepi ve polen gelişimini tüm embriyolojik safhaları ile ayrıntılı olarak tespit etmiştir. Ayrıca orkide embriyolarında süspansörün yapısı ve işlevi, embriyonun gelişmesi sırasında oldukça önemlidir. Ayrıca ovul gelişimi sürecinde iç integumentin varlığı, zigot ve proembriyo gelişimini etkilemektedir (Lumaga ve ark., 2020; Yuan-Yuan ve ark., 2016)

Türkiye'de de değişik orkide tohum çalışmaları yapılmıştır: Akçın ve ark. (2009), Türkiye'de bulunan 19 değişik orkide üzerinde morfolojik ve morfometrik çalışmalar yapmıştır. Orkide tohumlarının morfometrik analizi, testa ve embriyo boyutlarının ve morfolojisinin yanı sıra tohum kabuğu duvarlarında retikülasyonun varlığı / yokluğu veya retikülasyonun taksona özgü farklılıkları dikkate alınmıştır. Dolayısıyla dış morfolojik karakterler ve buna ilaveten tohum içi hava boşluk oranları orkide taksonisinde önemli olduğu anlaşılmıştır.

Bektaş ve ark. (2013), tohumdan invitro çimlendirme deneyleri ile *Orchis coriophora*'da protokorm oluşumu ve fide gelişimi çalışmaları yapmışlardır. Benzeri bir çalışma, *Anacamptis*, *Dactylorhiza*, *Orchis* ve *Ophrys* taksonlarında farklı bir araştırmacı grubu tarafından yapılmıştır (Çığ ve ark., 2018).

Süngü-Şeker ve ark. (2021), Türkiye'de de bulunan 12 farklı orkidede tohum morfolojik ve morfometrik çalışmalar yapmışlardır. Çalışmada sonuç olarak, tohumun kalazal veya medial bölgedeki hücre şekli farklılıkları, tohum boyutları, boyuna eksenindeki hücre sayıları, periklinal duvar süslemesi gibi tohum karakterleri, taksonomik olarak stabil karakterler olduğu, buna karşın tohum şekli, periklinal duvar süslemesi eksikliği ve daha büyük embriyo boyutlarının ise ekolojik adaptasyon veya gelişim ile alakalı olduğu belirtilmiştir. Benzer bir çalışmada Aybeke (2007), farklı *Ophrys* taksonları ve özellikle yakın taksonlar arasında polen ve tohum morfolojik özelliklerini incelemiştir.

Aybeke (2014) kendi çalışmasında *Himantoglossum robertianum*'da tohum morfoloji ve histokimyasına yönelik denemeler yapmıştır. Buna göre testa hücrelerinin ölü olduğu, histokimyasal testlere göre olgun embriyoların küresel şekilli olduğu ve özellikle tohumun embriyo kısımlarında kütiküler bir kılıfın varlığı, olgun embriyolarda ise yüksek miktarda çözünür karbonhidrat, lipid ve protein cisimleri ve çok az nişasta bulunduğu belirtilmiştir.

Orkide tohumlarında değişik maserasyon ve embriyo izolasyonu çalışmaları da yapılmıştır. Çünkü embriyolar ve tohumlar üzerinde araştırmalar çok zordur. Orkide tohumları çok küçük, tozlu ve

şeffaftır, bu nedenle, çalışmada orkide tohumları için izolasyon tekniğinin nasıl hazırlanacağı ve orkide embriyolarının tohumlardan nasıl izole edileceği incelenmiştir (Aybeke 2013a). Aybeke (2013b), bir çalışmada *Barlia robertiana*'da enzimatik maserasyon ve embriyo izolasyonu üzerinde denemeler yapmıştır.

Sonuç olarak; yukarıda ayrıntılı olarak belirtildiği gibi orkide tohumlarında ekseriyetle taksonomik-morfolojik ve invitro çimlendirme, mikorizal ilişkilerin aydınlatılması, simbiyotik ve asimbiyotik tohum çimlenmesi çalışmaları yapılmış ve kısmen de embriyolojik çalışmalara değinilmiştir. Bazı çalışmalarda ise embriyo izolasyonu ve tohum maserasyonuna dair değişik pratik metotlar geliştirilmiştir (Aybeke 2013a-b). Kısacası embriyolojik çalışmaların ve nesli tehlike altında olan orkide gruplarının ex situ korunma ve üretilmesi için embriyo oldukça önem arz etmektedir. Embriyo izolasyonu oldukça zordur. Tohumun şeffaflığı, tohum içinde bir hava boşluğunun varlığı bir avantaj sağlasa da embriyonun ve tohumun mikronlar düzeyinde küçüklüğü çalışmaları oldukça zorlamaktadır. Bu nedenle alternatif, pratik ve hızlı yöntemlerin tespiti, bu tarz çalışmalara kolaylık sağlayacaktır. Dolayısıyla bu çalışmanın amacı, yeni, pratik, hızlı bir maserasyon ve embriyo izolasyonu yönteminin keşfidir.

Materyal ve Metot

Çalışmada *Ophrys mammosa* Desf. subsp *mammosa* (Orchidaceae)'nin Edirne ilinde yapılan arazi çalışmalarında toplanan gimnostemiyumları ve gelişmiş örneklerin tohumları kullanılmıştır. Toplanan örneklerin bir kısmı, EDTU 8206 numara ile herbaryuma (Trakya Üniversitesi Herbaryumu) dâhil edilmiştir. Dolayısıyla çalışmada tozlaşmamış bitkilerin gimnostemiyumları ve tozlaşmış olgun meyvalardan alınan tohumlar kullanılmıştır.

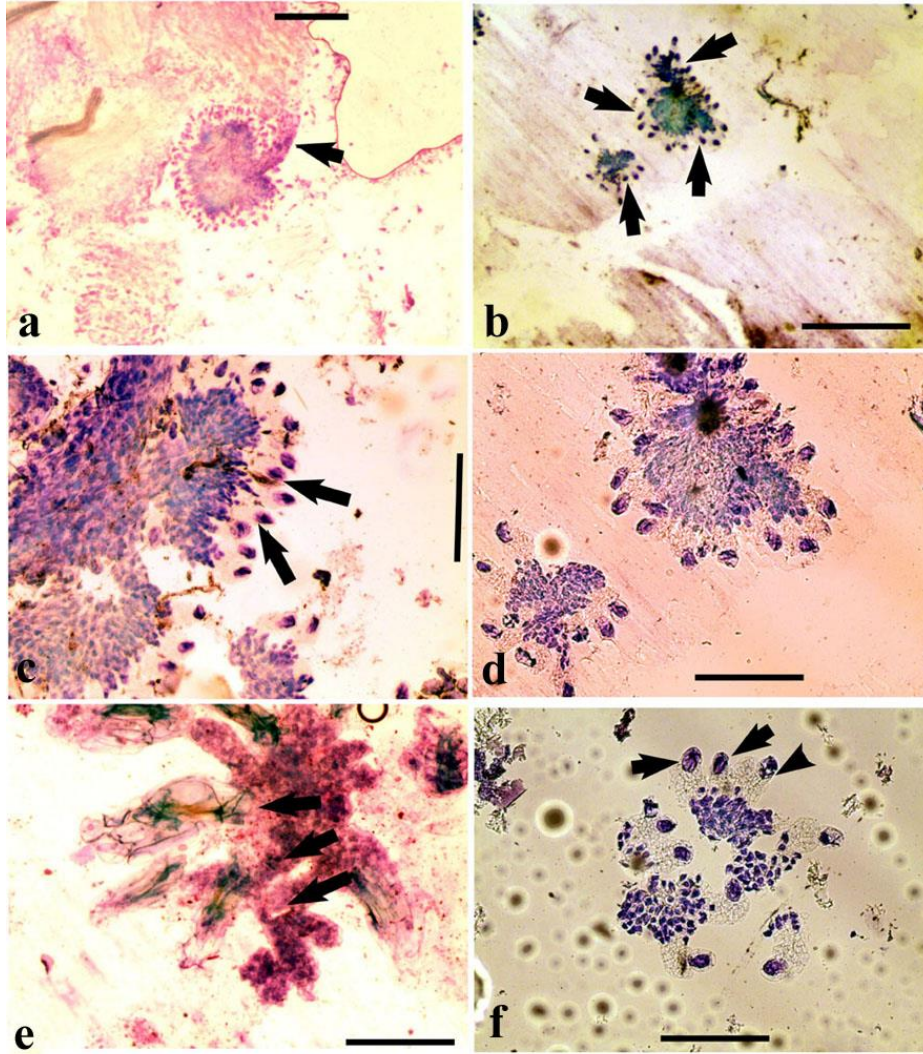
Gimnostemium, Carnoy fiksatifinde (3: % 96 alkol, 1: % 45 asetik asit) bir gece buzdolabında fikse edilmiştir. Sonrasında % 96 alkol ile yıkanan örnekler, % 70 alkol içinde denemelere kadar muhafaza edilmiştir. Tohumlar ise fikse olmadan doğrudan kuru şişeler içinde muhafaza edilmiştir.

Çalışmada iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntem, Bolleddu ve ark. (2022) çalışmasından modifiye edilerek tatbik edilmiştir. Buna göre karışım; 2: % 85 laktik asit, 2: kloralhidrat, 2: fenol, 2: karanfil yağı, 1: ksilol şeklindedir. İkinci yöntemde ise doğrudan kloralhidrat eriyiği hazırlanıp kullanılmıştır. Belirtilen bu yöntemlerde örnekler (gimnostemiyum / tohum) 24 saat, 48 saat, 72 saat gibi 3 farklı zaman diliminde oda koşullarında bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltiden çıkarılan örneklerden gimnostemiyumlar, aynı sıvıda lam üzerine alınıp, Olympus BH-2 stereo mikroskop altında hafifçe dissekte edilip ve lamel ile çok hafifçe bastırılarak preparatı yapılmıştır. Tohumlar ise çözelti sonrasında herhangi bir disseksiyona tabii tutulmadan aynı sıvı içinde ve lam lamel arasına alınarak preparasyonu yapılmıştır. Bu işlem sırasında tohumlara lamel üzerinden hafifçe bastırılmıştır. Lamelle kapatılmadan evvel 1 damla Toluidin Blue O boyası (O'Brien ve ark., 1964) ile preparat muamele edilmiş ve sonrasında lamel ile kapatılmıştır. Preparatların incelenmesi ve fotoğrafların çekimi, Olympus CX-21 bilgisayar uyumlu Fotomikroskop ile gerçekleştirilmiştir.

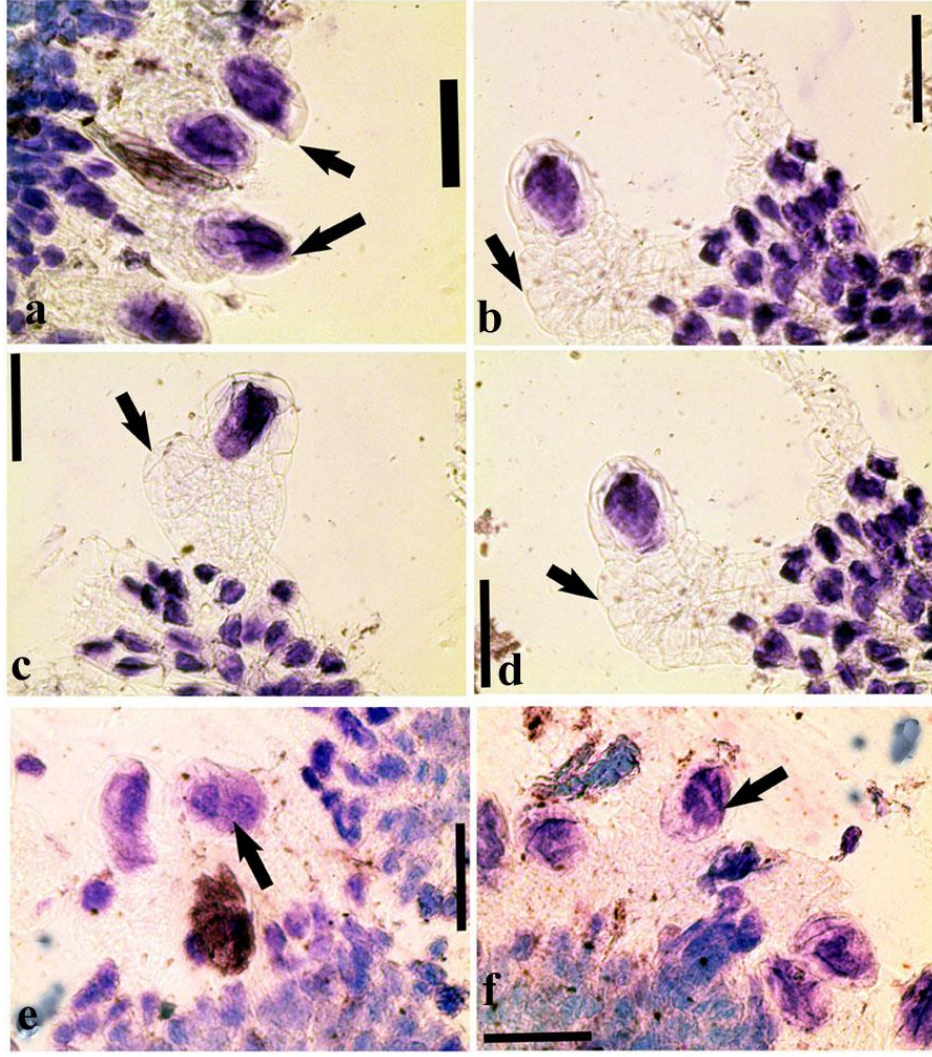
Bulgular ve Tartışma

Çalışmada her iki yöntemde farklı sürelerde (24, 48, 72 saat) denenmesine rağmen en iyi sonuçların kloralhidratta 72 saate alındığı tespit edilmiştir. Bu yöntemle ilgili bulgular, aşağıda sunulmaktadır:

Gimnostemiyumlardan yapılan preparatlarda karpeller ile plasenta arasında ve plasentadan funikuluslar ile ovullere olan bağlantılar dikkat çekmektedir (Şekil 1a-d). Yeni gelişen bu ovullerde funikulus hücrelerinin şeffaf olduğu görülmektedir (Şekil 1d). Olgun tohumlardaki funikuluslarda hücrelerin daha yoğun ve koyu boyalı olduğu görünmektedir (Şekil 1e). Yeni gelişen ovullerin uç kısımlarında arkeosporal hücreler veya mayozla girecek olan megasporosistler yoğun sitoplazmalı olarak dikkat çekmektedir (Şekil 1f).

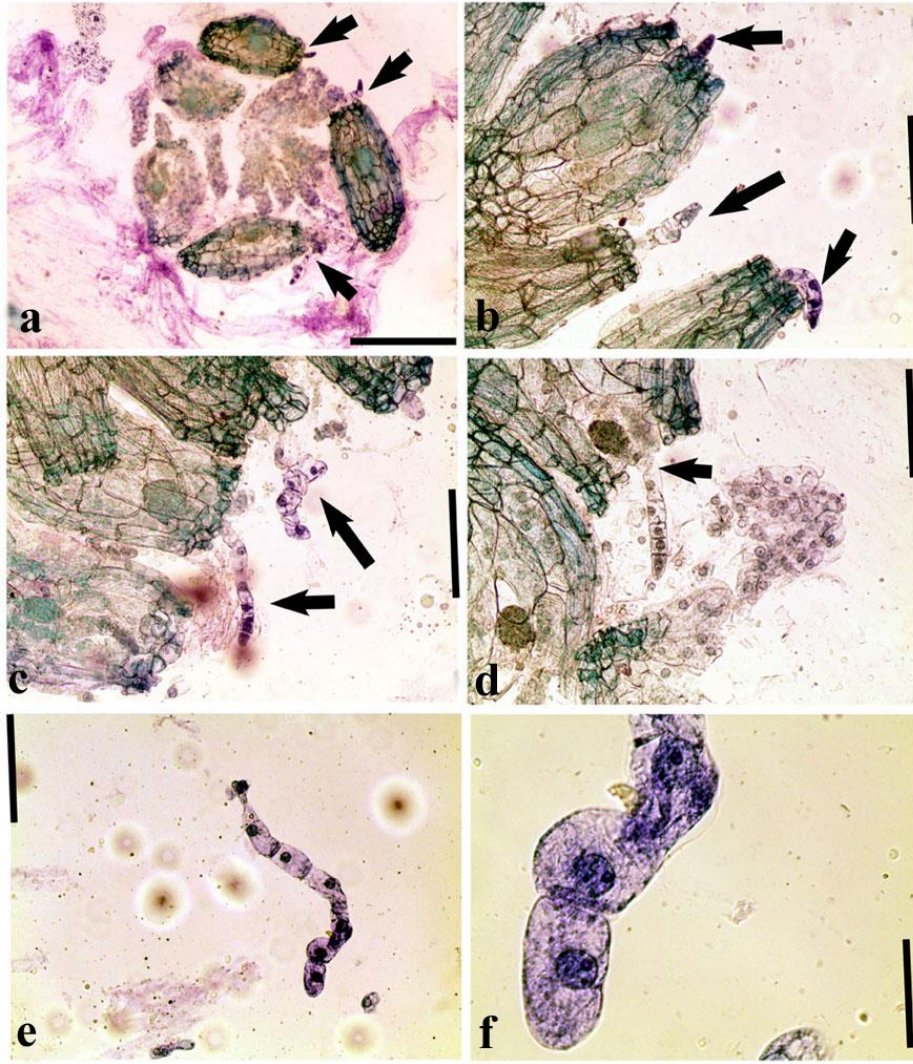


Şekil 1a. karpelden plasenta bağlantısı (ok) ve plasenta üzerinde ovuller, **b:** plasentadan ovullere bağlantılar (ok). **c:** ovuller (ok), **d:** (Şekil c büyütülmüşü) ovuller, funikulus bağlantıları şeffalaşmış, **e:** funikulusların ve tohumlara bağlantısı (ok), **f:** ovuller ve megasporosistler / arkeosporal hücreler koyu renkli halde (ok). **Ölçek:** a-c: 160 μ , d-f: 100 μ



Şekil 2a. Arkeosporal hücre veya mayoz sürecindeki megasporosist (ok), **b-d:** integument (antetik ovul) gelişimi için dikkate değer ovul yapısı (ok.) (c-d şekilleri farklı odaklı çekimlerdir), **e:** 2 adet ovulde birinde profaz II (ok), **f:** kısmen tetrada dönüşen ovul (tetrad ve etrafında şeffaf kallos çeper var, ok).
Ölçek: a-f: 50µ.

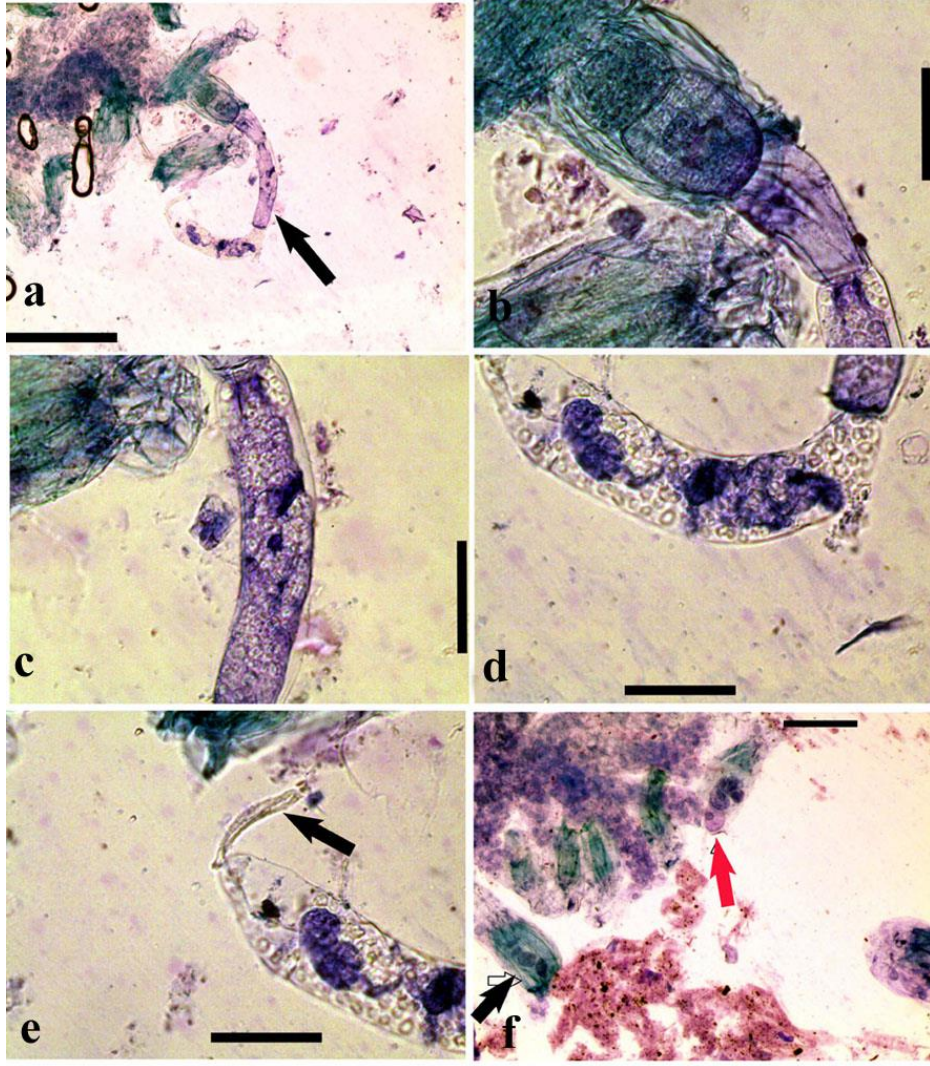
Kloralhidrat yöntemi uygulanan ovullerde megasporosist veya arkeosporal hücreler de görünmektedir (Şekil 2a). Ayrıca ovullerde integument varlığına ve gelişme düzenine göre Atekmik olup olmadığı da bu yöntemle kolayca anlaşılabilir (Şekil 2b-d). Ovul uçlarında mayoz geçiren megasporosist veya mitoz geçiren arkeosporal hücreleri de kısmen de olsa görmek mümkün olmaktadır (Şekil 2e,f). Tohumlardan süspansör veya embriyosu ile birlikte süspansörün çıkışı mikropilar kısımdaki boşluktan olmaktadır. Böylece embriyo ve süspansör fazla hasar görmeden hafifçe bastırma ile şişen ve şeffaflaşan tohumdan çıkmaktadır (Şekil 3a-e). Hatta süspansör uç hücresi, nukleusu ile birlikte gayet iyi incelenebilmektedir (Şekil 3f). Uzun bir süspansörün tohumdan çıkışı ile tüm baştan sona hücrelerini görmek kloralhidratlı ezme yönteminde mümkündür.



Şekil 3a. Tohumlardan süspansör çıkışı (3 tohumdan, ok), **b:** 3 tohum mikropil açıklığından süspansör çıkışı (ok), **c:** süspansör kısımları (ok), **d:** embriyo ve süspansör (ok), **e:** süspansör, **f:** şekil e'deki süspansörün uç kısmı, **Ölçek:** a: 160µ, b-e: 100µ, f: 50µ

Süspansörün baş ve en son uç hücrelerinde nispeten daha küçük ve yoğun sitoplazmalı hücreler varken orta kısmındaki hücreler ise daha büyük ve vakuollüdür (Şekil 4a,f). Kısmen tohum içinde kalan süspansör ve embriyoları da incelemek mümkündür. Örneğin Şekil 4f ve Şekil 5a-d'de böyle bir durum vardır. Çünkü orkide tohumları şeffaftır ve kloralhidratta maserasyonu içerdeki dokuların /hücrelerin görünebilirliğini artırmaktadır.

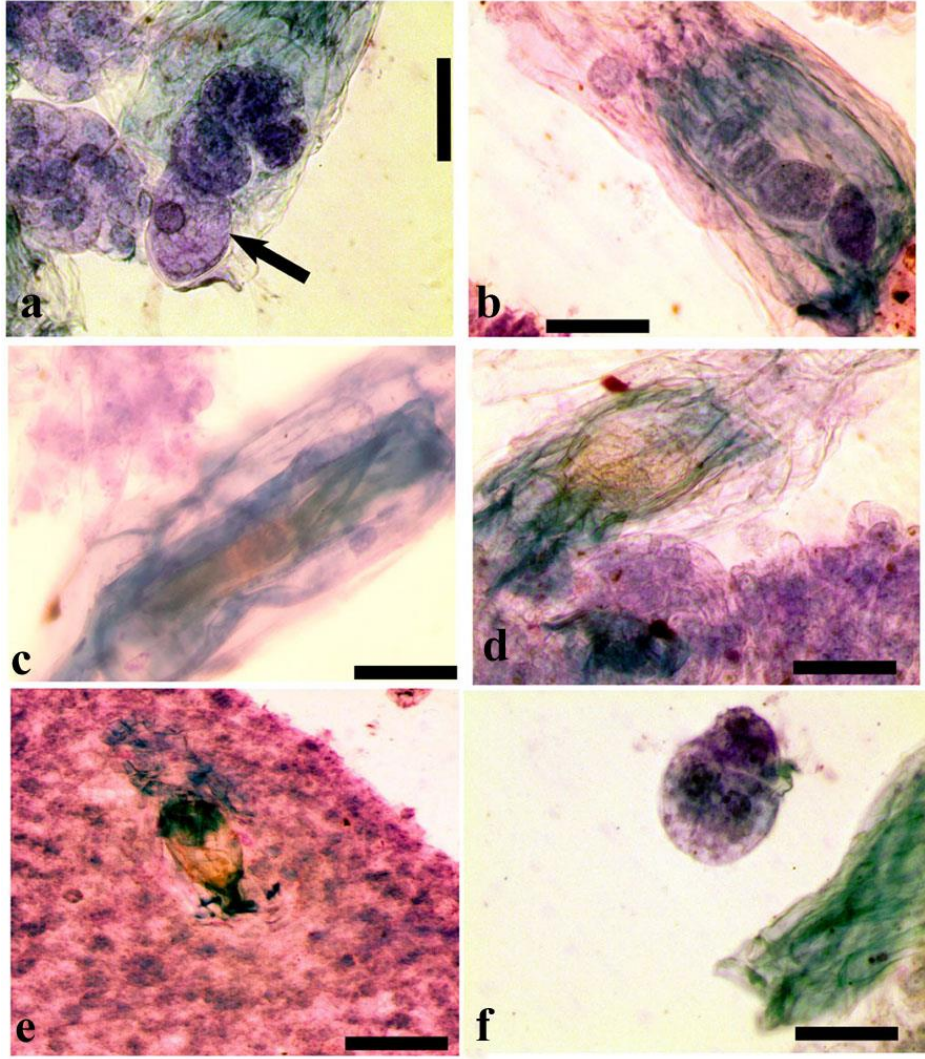
Süspansörün orta bölgesi daha sarımsı, baş ve son kısımları daha koyu renkli bir kılıf ile çevrilidir. Çünkü kütikül, süspansörün sarımsı görünen orta bölgesinde bulunmamaktadır (Şekil 5a-e). Ayrıca farklı süspansör yapılarını da bu yöntemle görmek mümkündür. Örneğin; Şekil 5d-e'de torpido şeklinde süspansör görülmektedir. Şekil 5f'de proembriyo görülmektedir. Kısacası tüm embriyonal gelişim safhaları tespit edilebilmektedir. Torpido benzeri süspansörlerin birkaç örneği Şekil 6a-d'de verilmektedir.



Şekil 4a. süspansör oldukça uzamış ve dışarıya doğru kıvrılmış (ok), **b:** şekil a'da süspansör baş kısmı, **c:** şekil a'daki süspansörün orta kısmı, **d:** şekil a'daki süspansörün uca doğru büyük ve taneli çok nukleuslu bir hücresi, **e:** şekil a'daki süspansör uç kısmı ve funikulus ile olan bağlantısı (ok), **f:** süspansör hücreleri (siyah ok; kırmızı ok embriyo hücrelerini gösterir). **Ölçek:** a: 100 μ , b-e: 50 μ , f: 160 μ

Embriyonun kaç hücreli olduğunun anlaşılması için araştırmacının mikroskop mikrovidası ile farklı noktalara odaklanarak hücre sayımı yapabilmesi kısmen mümkündür (Şekil 7a-f).

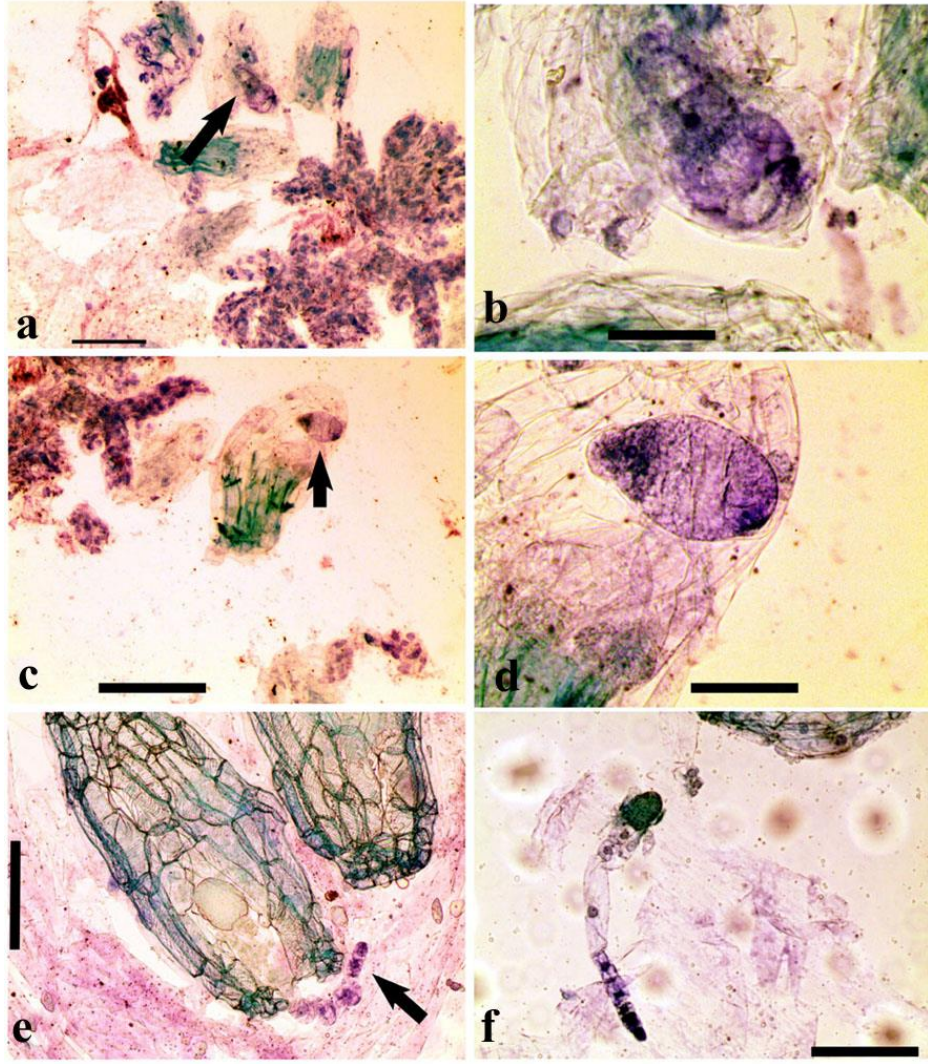
Normal süspansör yapısı Şekil 6e-f'dedir. Buradan incelenen taksonda süspansör değişik yapılarını ortaya çıkarmanın mümkün olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 5a. şekil 4f’de kırmızı oklu embriyo hücreleri büyütülmüş halde ve altında vakuollü süspansör oluşturacak olan büyük 2 hücre (ok), **b:** süspansör hücreleri mikropile doğru küçülmekte, **c:** süspansör hücresi (sarı renkli kısımda kutikular kalınlaşma yoktur), **d:** farklı şekilde (torpido benzeri) bir süspansör (sarı orta kısmında kutikular kalınlaşma yoktur), **e:** torpido benzeri süspansör yapısı (süspansör baş ve son kısmı kutikular kalınlaşmalı ama orta şişkin sarı kısımda kalınlaşma yok), **f:** proembriyo (süspansörü eksik), **Ölçek: a-d,f: 50µ, e: 100µ.**

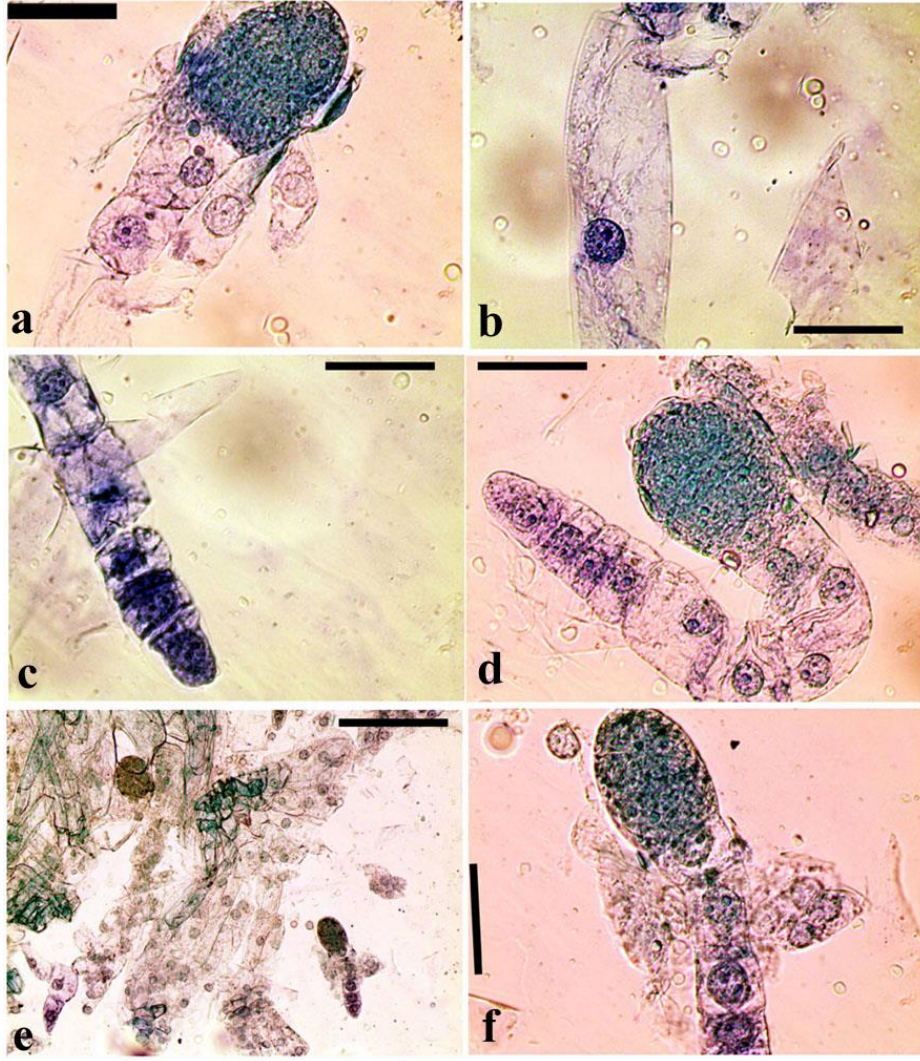
Tohum yumuşak ve şişkin olduğu için embriyo tam çıkmasa bile görülmesi mümkün olmaktadır. Örneğin; Şekil 6e’de tohum içinden kısmen çıkmış süspansör ve tam globüler embriyo yapısı gayet rahatça görülebilmektedir. Tohumdan tamamen çıkmış embriyo ve süspansörler Şekil 7a-f’de verilmektedir.

Süspansör nükleusları hasarsızdır. Süspansör orta hücreleri büyük vakuollüdür. Farklı büyüklükte gelişme gösteren süspansörler embriyoları ile birlikte Şekil 8a-f’de verilmektedir. Süspansörün farklı büyüklükte olmasına ilaveten embriyoların farklı büyüklükte oldukları dikkat çekmektedir (Şekil 8a-f). Farklı büyüklükte embriyo ve süspansörler, hasarsız bir şekilde görünmektedir. Hatta ikiz embriyolu ve süspansörlü tohumlar da bu yöntemle rahatça tespit edilebilmektedir (Şekil 9a-f).



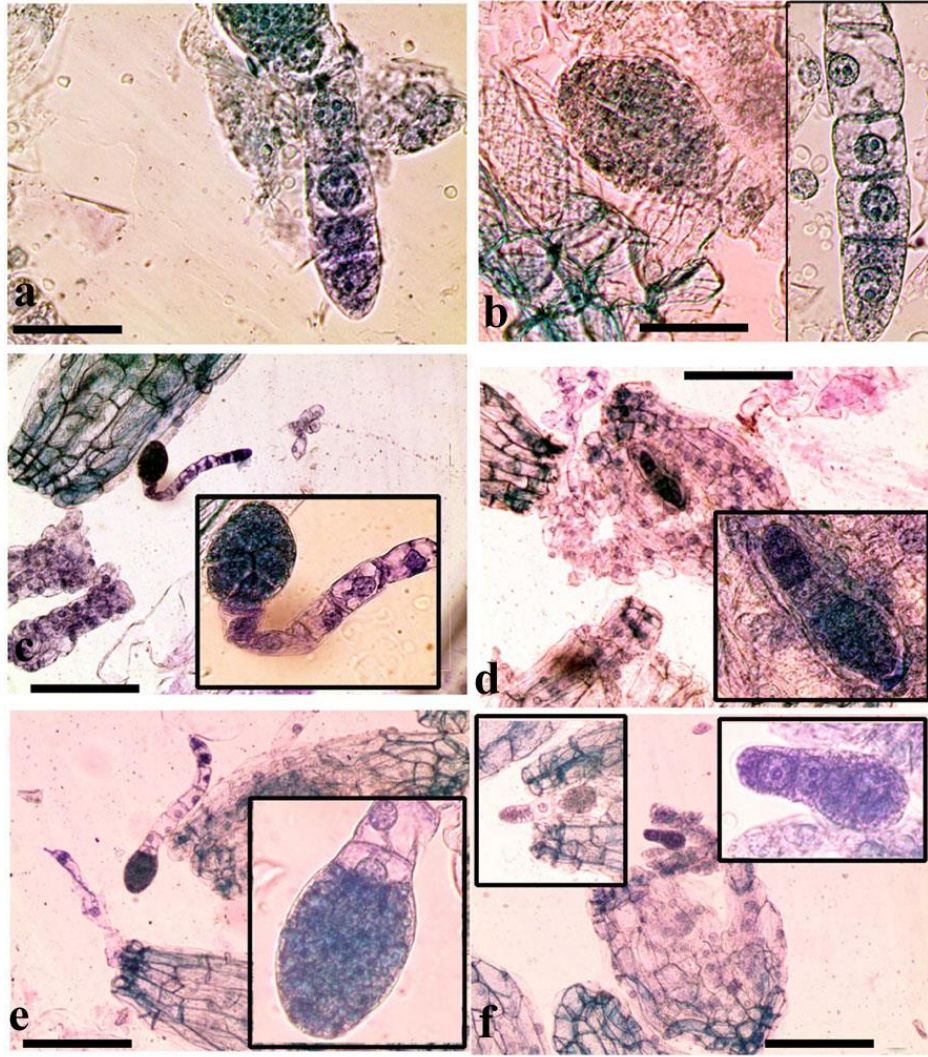
Şekil 6a. torpedo benzeri embriyo (ok), **b:** şekil a büyütülmüşü, **c:** embriyo ve süspansörü (torpido benzeri), **d:** “şekil c” büyütülmüşü, **e:** tohum içinden kısmen çıkmış bir embriyo (ok), **f:** embriyo ve tam süspansörü ile birlikte (süspansör uca doğru hücre boyutları ve yoğunlukları dikkat çekmektedir). **Ölçek:** **a:** 160 μ , **b,d-f:** 50 μ , **c:** 100 μ .

Burada verilen birçok örnekler ışığında kloralhidratlı 72 saatlik maserasyon süresinin orkide ovullerinde en iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Diğer yöntemde ise karışım halinde laktik asit, kloralhidrat, fenol, karanfil yağı ve ksilol kullanılmasına rağmen ve o denemede de 24-48-72 saatlik maserasyon testlerine rağmen en iyi sonuç, sadece kloralhidratlı denemede alınmıştır. Yapılan literatür taramalarında laktik asitin, fenolün, karanfil yağının ve ksilolün değişik bitkisel ve hayvansal maserasyon denemelerinde şeffaflaştırıcı etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Bybd ve ark., 1983; Blahnik ve ark., 2007; Khandelwal, 2008; Sawad ve Udah, 2012).



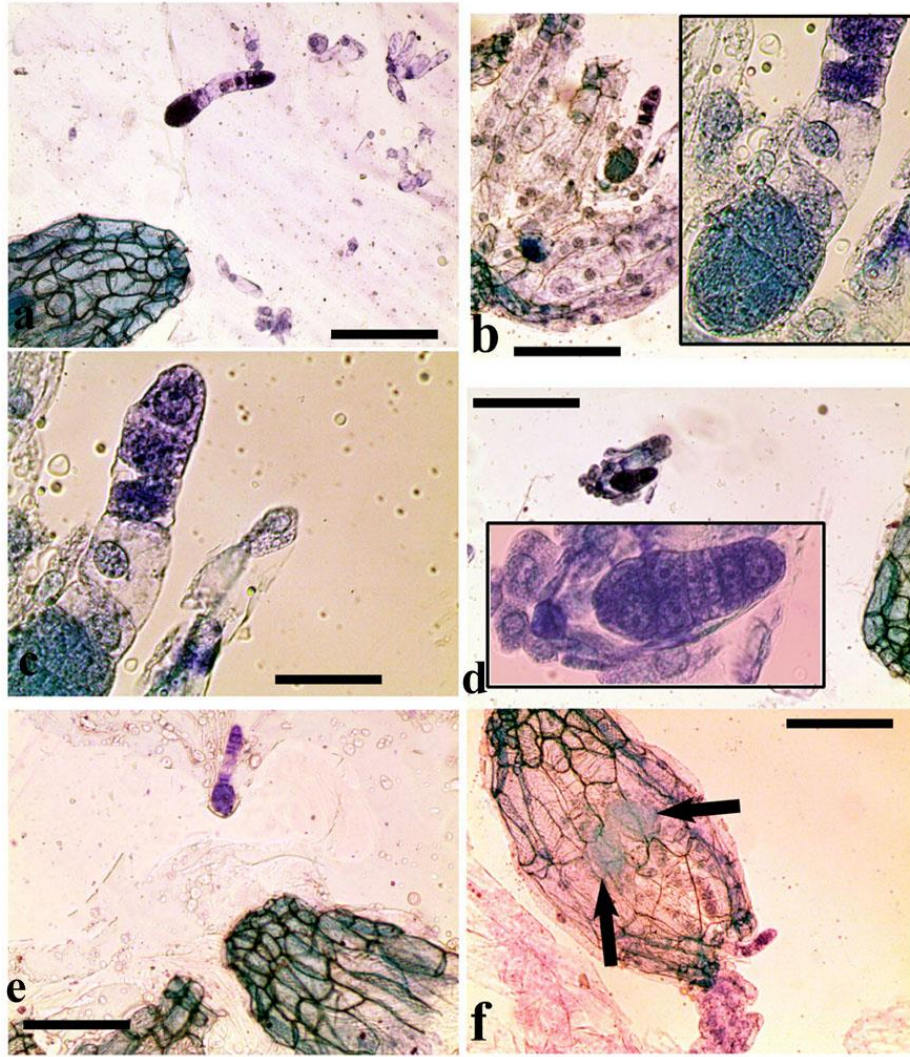
Şekil 7a. embriyo ve kısmi süspansörü ile birlikte, **b:** süspansörün orta kısmındaki iri ve vakuollü büyük hücresi, **c:** şekil b'nin devamında süspansör uç kısım hücreleri (daha sıkı dizilişli, yoğun sitoplazmalı ve küçük hücreler), **d:** 8 hücreli embriyo ve tam süspansörü ile birlikte, **e:** embriyo ve süspansörü (küçük büyütmede), **f:** şekil e'nin büyütülmüş halinde embriyo kısmı ve kısmen süspansörün baş kısımları görülmektedir. **Ölçek:** a-d,f: 50µ, e: 100µ.

Ayrıca her iki yöntem arasında geçişli denemeler de yapılmıştır. Örneğin; materyal toplandıktan sonra 24 saat %85 laktik asitte bekletme sonrası karışım sıvısına alınmış; fakat bu denemede verimli sonuç alınamamıştır. Yine kloralhidratta 48 saat bekletilen örnekler, sonrasında karışım sıvısına konulmuş; fakat olumlu sonuç alınamamıştır. Bir başka denemede karışım sıvısında 24 saat bekletme sonucunda bütün örneklerin dağıldığı ve hiçbir organın sağlam kalmadığı anlaşılmıştır. Kloralhidratta 24 saat bekletme sonucunda ve preperasyonda hafif bir ezme sonucunda hiçbir faydalı sonucun alınmadığı anlaşılmıştır. Bunun üzerine 48 saatlik kloralhidrat maserasyon testlerinde bastırma ile embriyo ve süspansörün çıktığı anlaşılmıştır.



Şekil 8a. şekil 7f'nin devamı, süspansörün uç kısmında yoğun sitoplazmalı küçük hücreler, **b:** embriyo ve süspansörünün uç kısmı, **c:** embriyo ve süspansörü (küçük resimde kısmen büyütülmüşü), **d:** embriyo ve süspansörü (küçük resimde büyütülmüş halde), **e:** embriyo ve süspansörü (küçük resimde embriyo kısmı büyütülmüş halde), **f:** embriyo ve süspansörü ile tam halde (diğer 2 küçük resimde büyütülmüş halde). **Ölçek: a-d:** 50µ, **e-f:** 100µ.

En iyi verimin ise kloralhidratta 72 saat bekletilen deneylerden elde edilmiştir. Bu denemelerde tohumların oldukça şeffaf olduğu ve hafif bir baskı ile embriyonun ve süspansörün sağlıklı bir şekilde mikropilar açıklıktan dışarı çıktığı gözlenmiştir. Böylece embriyo ve süspansör rahat bir şekilde incelenebilmektedir. Embriyonun proembriyo ve embriyo fazında kaç hücreli olduğu anlamak için mikrovida ile farklı odaklarda netleştirmek gerekmektedir. Ayrıca embriyonal gelişme çalışmaları yapılacaksa bir kereye mahsus histolojik gömme tekniğinin uygulanması gerekmektedir. Buradan embriyo boyutları, şekilleri ve hücre sayıları not edilerek bir skala oluşturulmalı ve maserasyondan sonra embriyo incelemeleri, bu skala ile karşılaştırılarak yapılması daha doğru olduğu düşünülmektedir.



Şekil 9a. embriyo süspansörü ile birlikte tam, **b:** ezilmiş tohum içinde embriyo ve süspansörü (embriyo ve kısmen süspansörün baş kısımları görülmekte), **c:** şekil b'deki süspansörün uç kısmında küçük ve yoğun hücreler, **d:** tohum içinde ezilmiş halde embriyo ve süspansörü (küçük resimde büyütülmüş), **e:** süspansörleri ile tam bir embriyo, **f:** tohum içinde ikiz embriyolar (oklu) ve süspansörleri (birinin süspansörü kısmen mikropilden dışarı çıkmış halde). **Ölçek: a-b,d-e:** 100 μ , **c,f:** 50 μ .

Yöntemin birçok yanıl faydası da bulunmaktadır: Örneğin; karpel-plasenta bağlantıları, plasenta-ovul bağlantıları, funikulus ve ovul bağlantıları Şekil 1'de gösterilmiştir. Süspansör ve funikulus bağlantıları Şekil 3'de gösterilmiştir. Megasporosist veya Arkeospopal hücrenin gelişim evreleri Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir. Bu noktada emin olmak için histolojik gömme teknikleri kullanımının oldukça faydası olacağı düşünülmektedir. Zira maserasyon yönteminde nükleus ve sitoplazma içeriği kısmen bulanık görünmektedir. Birkaç preperasyondan sonra araştırmacının uzmanlığı daha da gelişeceğinden sonraki çalışmalarda histolojiye girmeden doğrudan maserasyonla embriyonal gelişim tespit edilebilecektir. Ayrıca yöntemin ovul gelişiminde de faydası bulunmaktadır. Zira Lumaga ve ark. (2020) orkidelerde antetik ovul gelişimini ve integument yapılarının önemini vurgulamışlardır. Dolayısıyla Şekil 2b-d'de gösterildiği gibi ovul yapısı ve integument gelişim aşamaları bu maserasyon yöntemi ile hiç gömme tekniğine gerek kalmadan pratik bir şekilde tespit edilebilecektir. İlaveten

süspansör ve embriyo yapıları (tek veya ikiz embriyolu tohumlarda) ayrıntılı olarak Şekil 3-9'da bol fotoğraflı örneklerle gösterilmiştir.

Bu yöntemle ayrıca embriyonun süspansörü ile birlikte total şekil olarak izlenmesi de mümkündür. Çünkü Şekil 5 ve 6'da süspansörün torpido benzeri bir yapıda olduğu görülmüştür. İlaveten embriyonun etrafındaki kılıfın kutikular olup olmaması (histokimyasal incelemeler açısından) önemlidir. Kısmen histokimyasal sonuçlar bu yöntemle de elde edilmektedir.

Sonuç olarak; detaylı ve birçok fotoğraflı örneklerin yukarıda gösterilmesi (Şekil 1-9) ile bu basit maserasyon yönteminin 1) funikulus-plasenta-karpel bağlantıları, 2) megasporosist / arkeosporal hücre, 3) süspansör ve 4) embriyo incelemelerinde gayet iyi sonuçlar verdiği anlaşılmıştır. Elbette eksik yönleri vardır; bunun için bu yöntemin başlangıç aşamasında histolojik gömme teknikleri ile birlikte yürütülmesi çok daha verimli sonuçların alınmasını sağlayacaktır. Sonrasında araştırmacı zamanla tecrübe kazanacak ve yukarıda belirtildiği gibi 4 farklı alanda sadece bu yöntemle hızlıca birçok taksona bağlı örnekleri tarama yapması mümkün olacaktır. Dolayısıyla yöntemin orkide embriyolojisi, anatomisi ve histolojisine katkıda bulunacağına inanılmaktadır.

Sonuçlar

Çalışmada *Ophrys mammosa* Desf. subsp *mammosa* pistil ve tohumlarında 2 farklı maserasyon yöntemi uygulanmış ve buna göre sadece kloralhidratlı 72 saat inkubasyon süresinin en verimli sonuçları verdiği anlaşılmıştır. Süre sonunda yapılan preparatlardan embriyo ve süspansör yapıları net bir şekilde ayırt edilmiş ayrıca funikulus yapıları, ovul gelişim şekli de tespit edilmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarın kendi araştırması olup, herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarın kendi tek başına çalışmasıdır.

Kaynaklar

Akçin TA., Özdener Y., Akçin A. Taxonomic value of seed characters in Orchids from Turkey. Belgian Journal of Botany 2009; 142(2): 124-139.

Arditti J., Michaud JD., Healey PL. Morphometry of orchid seeds: I. *Paphiopedilum* and native California and related species of *Cypripedium*. American Journal of Botany 1979; 66: 1128-1137.

Arditti J., Michaud JD., Healey PL. Morphometry of orchid seeds: II. Native California and related species of *Calypso*, *Cephalanthera*, *Corallorhiza* and *Epipactis*. American Journal of Botany 1980; 67: 347-360.

- Arditti J., Ghani AKA. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. Tansley Review No. 110. The New Phytologist 2000; 145(3): 367 – 421.
- Attri LK., Bhanwra RK., Nayyar H. Pollination induced embryology studies in *Aerides multiflora* (ROXB.). International Journal of Botanical Studies 2020; 5(4): 211–215.
- Aybeke M. The pollen and seed morphology of some *Ophrys* L. (Orchidaceae) Taxa. Journal of Plant Biology 2007; 50(4): 387-395.
- Aybeke M. Anther wall and pollen development in *Ophrys mammosa* L (Orchidaceae). Plant Systematic and Evolution 2012; 298(6): 1015-1023.
- Aybeke M. Simple embryo isolation techniques from *Ophrys* (Orchidaceae) seeds. Greener Journal of Agricultural Sciences 2013a; 3(6): 448-450.
- Aybeke M. Embryo and protoplast isolation from *Barlia robertiana* seeds (Orchidaceae). American Journal of Plant Sciences 2013b; 4: 1-8.
- Aybeke M. Morphological and histochemical investigations on *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge (Orchidaceae) seeds. Plant Systematic and Evolution 2014; 300: 91–97.
- Barthlott W. Morphologie der samen von orchideen in hinblick auf taxonomische und funktionelle aspekte. In: Senghas K. (ed). Proceedings of the 8th world orchid conference. Frankfurt, Hamburg: Parey; 1976; 444-445.
- Bektaş E., Cüce M., Sökmen A. In vitro germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. Turkish Journal of Botany 2013; 32(2): Article: 10.
- Blahnik RJ., Holzenthal RW., Prather A. The lactic acid method for clearing *Trichoptera genitalia*. In: Bueno-Soria J., Barba-Álvarez R. ve Armitage B. (eds.) Proceedings of the XIIth International symposium on Trichoptera, June 18-22. NY: The Caddis Press, 2006; 9-14.
- Bolleddu R., Narasimhaji CV., Venkatesh S. et al. Establishment of quality parameters for fruits of *Crotalaria pallida* Aiton. through microscopy and phytochemical studies. Vegetos 2022; 35: 622–632.
- Bybd DW., Kirkpatrick JR., Barker KR. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Journal of Nematology 1983; 15(1): 142-143.
- Chase MW., Phippen JS. Seed morphology in the Oncidiinae and related Subtribes (Orchidaceae). Systematic Botany 1988; 13: 313-323.
- Clifford HT., Smith WK. Seed morphology and classification in the Orchidaceae. Phytomorphology 1969; 19: 133-139.
- Cozzolino S., Widmer A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? Trends in Ecology ve Evolution 2005; 20: 487-494.
- Çığ A., Demirer Durak E., İşler, S. In vitro symbiotic germination potentials of some *Anacamptis*, *Dactylorhiza*, *Orchis* and *Ophrys* terrestrial orchid species. Applied Ecology and Environmental Research 2018; 16(4): 5141-5155.

- Güler N., Deniz İG. Orchidaceae. Türkiye bitkileri listesi (Damarlı Bitkiler). 1.baskı. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Basımı; 2012.
- Hongxia L., Yibo L., Hong L. Studies of mycorrhizal fungi of chinese orchids and their role in orchid conservation in China-A review. *Botanical Review* 2010; 76: 241–262.
- Kauth PJ., Dutra D., Johnson TR., Stewart SL., Kane ME., Vendrame W. Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Volume V. USA: Global Science Books; 2008.
- Kendon JP., Rajaovelona L., Sandford H., Fang R., Jake B., Viswambharan S. Collecting near mature and immature orchid seeds for ex situ conservation: ‘in vitro collecting’ as a case study. *Botanical Studies* 2017; 58: 34.
- Khandelwal KR. Practical pharmacognosy, techniques and experiments. India: Nirali Prakashan publisher; 2008.
- Leake JR. Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the ‘saprophytic’ plant myth. *Mycologist* 2005; 19: 113-122.
- Lumaga MRB., Giovanni S., Cozzolino S. The effect of seasonality on developmental stages of anthetic ovule integuments in Mediterranean orchids. *Protoplasma*, 2020; 257: 613–618.
- O'Brien TP., Feder N., McCully ME. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* 1964; 59: 368–373.
- Peterson R., Larry YU., Zelmer C. Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis* 1998; 25: 29-55.
- Rasmussen HN. Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant. New York: Cambridge Univ. Press; 1995.
- Sawad AA., Udah AD. Morphological and histopathological study of air sacs (Sacci pneumatic) in japanese quail (*Coturnix japonica*). *Mirror of Research in Veterinary Sciences and Animals* 2012; 1(1): 50-56.
- Sharma M., Vij SP. Embryological studies in Orchidaceae IV: *Habenaria* Willd. *Phytomorphology* 1987; 37(4): 327–335.
- Sood SK., Sham N. Gametophytes, embryogeny and pericarp of *Rhynchosstylis retusa* Blume (Epidendreae, Orchidaceae). *Phytomorphology* 1987; 37(4): 307–316.
- Süngü-Şeker Ş., Akbulut MK., Şenel G. Seed morphometry and ultrastructure studies on some Turkish orchids (Orchidaceae). *Microscopy Research Technique* 2021; 84: 2409–2420.
- Vinogradova TN., Andronova EV. Development. In: Kull T., Arditti J. (Eds) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, VIII. Dordrecht: Springer 2002.
- Yeung EC. A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies* 2017; 58, Article number: 33.
- Yeung EC. The orchid embryo “an embryonic protocorm”. *Botany* 2022; 100: 691–706.

- Yuan-Yuan L., Xiao-Mei C., Shun-Xing G., Yung IL. Embryology of two mycoheterotrophic orchid species, *Gastrodia elata* and *Gastrodia nantoensis*: ovule and embryo development. *Botanical Studies* 2016; 57: 18.
- Yung IL., Yeung EC., Lee N., Chung MC. Embryo development in the Lady's Slipper Orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor. *Annals of Botany* 2006; 98: 1311–1319.
- Yung IL., Yeung EC., Lee N., Chung MC. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: embryo development. *Botanical Studies* 2008; 49: 139-146.