



Hindistan Cevizi Suyunun *Serapias vomeracea*'nin *In vitro* Gelişimine Etkileri

The Effects of Coconut Water on *In vitro* Development of *Serapias vomeracea*

Arda ACEMİ^{1,*} , Fazıl ÖZEN² 

¹ Biyoloji Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, Türkiye, **Orcid:** 0000-0003-0270-8507

² Biyoloji Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, Türkiye, **Orcid:** 0000-0001-9293-908X

Araştırma Makalesi

Gönderilme Tarihi : 28/11/2019

Kabul Tarihi : 14/02/2020

Anahtar Kelimeler

Doğal Katkı Maddeleri
Orkide Kültürü
Rizogenez
Sağırkulağı

Research Paper

Received Date : 28/11/2019

Accepted Date : 14/02/2020

Keywords

Natural additives
Orchid culture
Rhizogenesis
Long-lipped *Serapias*

Özet

Bu çalışma, Hindistan cevizi suyunun (HCS) *Serapias vomeracea*'de *in vitro* asimbiyotik tohum çimlenmesi, protokorm oluşumu ve organ gelişimi üzerine konsantrasyona bağlı (25, 50 ve 100 ml L⁻¹) etkilerini karşılaştırmayı amaçlamaktadır. Farklı HCS konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi ve protokorm oluşumu üzerindeki etkileri kültür ortamında sükröz varlığında ve yokluğunda test edilmiştir. Kültür ortamında HCS ve sükröz eşzamanlı bulunması tohumların çimlenme oranını düşürdüğü için organogenez üzerine HCS'nin etkileri sadece sükröz yokluğunda denenmiştir. Kontrol ortamı ve sadece HCS içeren ortam en yüksek tohum çimlenme oranlarını vermesine rağmen sonuçlar arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Bununla birlikte, tüm HCS konsantrasyonları kültür ortamında sükrözden bağımsız olarak protokorm oluşumunu önemli ölçüde artırmıştır. En yüksek ortalama sürgün uzunluğu 100 ml L⁻¹ konsantrasyonunda HCS uygulaması sonucunda kaydedilmiştir. HCS uygulamalarından sonra rizogenik cevap anlamlı derecede azalmış ve tüm HCS uygulamalarının kök uzamasını azalttığı bulunmuştur. Kök oluşumu artan HCS konsantrasyonları ile artmış ancak yine de kontrol değerinin altında kalmıştır. Kültürlerde yumru oluşumu gözlenmemiştir. Bu çalışma HCS'nin *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* çimlenmesinde sükröz yerine kullanılabileceğini önermektedir. Bununla birlikte, çalışmanın sonuçları HCS'nin *S. vomeracea*'de organ gelişimi üzerine sadece 100 ml L⁻¹'den daha yüksek bir konsantrasyonda veya sükröz ile birlikte daha düşük konsantrasyonlarda kullanılması durumunda pozitif etkiler yaratabileceğini göstermiştir.

Abstract

This study aimed to compare the concentration-dependent (25, 50, and 100 ml L⁻¹) effects of coconut water (COW) on *in vitro* asymbiotic seed germination, protocorm formation, and organ development in *Serapias vomeracea*. The effects of different COW concentrations on seed germination and protocorm formation were tested both in the presence and absence of sucrose in the culture medium. The effects of COW were tested on organogenesis only in the absence of sucrose since the simultaneous presence of COW and sucrose in the culture medium reduced the germination rate. The control medium and the medium only with COW gave the highest but statistically similar seed germination rates. However, all the COW concentrations triggered protocorm formation regardless of the sucrose presence in the culture medium. The maximum mean shoot length was recorded after COW treatment at 100 ml L⁻¹ concentration. The rhizogenic response was significantly reduced after COW treatments. All the COW treatments decreased root elongation. The root formation increased with elevated COW concentrations, but it remained below the control value. The tuber formation was not observed in the cultures. This study suggested that COW could be used as a substitute for sucrose in *in vitro* germination of *S. vomeracea* seeds. However, the results also showed that COW might induce positive effects on organ development in *S. vomeracea* only if it is used in the medium at a concentration higher than 100 ml L⁻¹ or at lower concentrations along with sucrose.

1. Giriş

Serapias vomeracea (Burm.f.) Briq. (Orchidaceae), Türkiye dışında Balkan ve Akdeniz ülkelerinde yayılış gösteren, yaşam alanları 1000 m yüksekliğe kadar kurak çayır, çalılık ve fundalık araziler ile boş tarım alanları

olan çok yıllık ve yumru bir orkide türüdür. Yumru orkideler henüz doğada tükenmemiş olsalar dahi ticari değerlerinden dolayı doğadan kontrolsüz olarak toplanmakta ve doğal varlıkları daralma tehdidiyle karşı karşıya kalmaktadır [1]. Bu orkide türlerinin sahip olduğu yumrular zengin glukomannan içerikleri nedeniyle gıda ve ilaç endüstrisi için değerlidir. Glukomannan, günümüzde geleneksel bir sıcak içecek olan salep üretimi için

* Sorumlu Yazar (Corresponding Author): arda.acemi@kocaeli.edu.tr



hammadde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca hidrofilik özelliklerinden dolayı zayıflama kapsüllerinde ve gıda takviyelerinde tercih edilmektedir [2].

Bitki doku kültüründe, “doğal katkı maddeleri” veya “doğal maddeler” terimleri, bitki büyümesine katkıda bulunan, ancak herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) sınıfında sınıflandırılmayan, doğal kökenli besi ortamı bileşenlerini tanımlar [3]. En sık kullanılan doğal katkı maddeleri, Hindistan cevizi suyu (HCS), muz homojenatı, malt, patates ve maya ekstraktları olarak rapor edilmektedir [4]. Bu doğal maddeler arasında yaygın olarak orkide kültürlerinde kullanılan HCS *Cocos nucifera* meyvelerinin endosperm sıvısıdır. Orkide kültürlerinde, HCS'nin ortama eklenmesinin sürgün gelişimini, tohum çimlenmesini ve protokom benzeri yapıların (PBY) oluşum oranlarını arttırdığı bildirilmiştir [5, 6]. Buna karşın HCS'nin Akdeniz karasal orkideleri üzerindeki etkileri henüz tam olarak belirlenmemiştir.

Bu çalışma orkide kültürlerinde yaygın olarak kullanılan doğal bir katkı maddesi olan HCS'nin bitki gelişimi üzerindeki konsantrasyona bağlı etkilerini karşılaştırmayı amaçlamaktadır. Tropik orkide türlerinde çoğunlukla olumlu etkileri bildirilen HCS uygulamalarının *S. vomeracea* gibi yaygın ve ekonomik açıdan önemli bir model orkide türünün *in vitro* büyüme parametreleri üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması, bu doğal kültür ortamı takviyesinin etkilerinin Akdeniz karasal orkide türlerindeki potansiyel etkilerini de ortaya çıkartacaktır.

2. Malzeme ve Yöntem

2.1. Tohum kaynağı, canlılık yüzdesi ve dezenfeksiyon

Serapias vomeracea (Burm.f.) Briq. tohumları Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden (Menemen, İzmir, Türkiye) temin edildi. Tohumlar denemelerde kullanılmaya kadar 4 °C'de kuru ve karanlık bir ortamda saklandı. Tohum canlılığını belirlemek için tetrazolyum (2,3,5-Trifeniltetrazolyum klorür; TTC) testi, Acemi ve Özen [1] tarafından belirtilen yöntemle yapıldı. Tohumlar, Acemi ve Özen [1] tarafından *S. vomeracea* için uyarıldığı şekliyle Jevšnik ve Luthar'ın [7] yöntemini takiben dezenfekte edildi. Buna göre, tohumlar 1 mg olarak tartıldıktan sonra yuvarlak tabanlı santrifüj tüplerine yerleştirildi. Tohumlar 30 sn boyunca %70 EtOH ve 8 dk boyunca %1 NaOCl ile muamele edildikten sonra tüpler 1 dk boyunca 2000×g'de santrifüjlendi. Üst fazda kalan tohum kabukları ve köpük pipetle toplandıktan sonra tohumlar 3 defa steril dH₂O ile durulandı.

2.2. Besiyerinin hazırlanması ve tohumların ekimi

Deneylerde üç konsantrasyonda (10, 30 ve 50 g L⁻¹) HCS ile takviye edilmiş Knudson C (KN) besiyeri [8], kullanıldı. Kullanılan HCS yerel marketlerden satın alınan *C. nucifera* meyvelerinden doğrudan elde edildi. HCS tohumlarla aynı çevre koşullarında tutuldu. HCS içermeyen KN ortamı kontrol olarak kullanıldı. HCS'nin tohum çimlenmesi ve protokom oluşumu üzerindeki etkileri besiyerinde hem sükroz varlığında (BAN + Sükroz) hem de yokluğunda (BAN - Sükroz) test edildi. Protokorm gelişimi için en iyi sonuçları veren birleşim seçildi ve daha sonraki deneylerde kullanıldı. Sükroz kullanılan durumlarda besiyeri 20 g L⁻¹ sukroz ile desteklendi. Besiyeri 3,5 g L⁻¹ phytigel ile katılaştırıldı ve otoklavlamadan önce pH'sı 5,6'ya ayarlandı. Dezenfekte edilen tohumların üzerine 200 µl steril dH₂O eklenerek tohumlar pipet yardımıyla Petri kaplarındaki besiyerlerine aktarıldı. İnkübasyon periyodunun sonunda gelişen protokormlar aynı ortamı içeren kültür kaplarına aktarıldı. Kültürler 16/8 saatlik bir fotoperiyod ile 60 µmol m⁻² s⁻¹ fotosentetik foton akı yoğunluğundaki aydınlatma altında 23±1 °C sıcaklıkta inkübe edildi. Kültürlerde yoğun kararma gözlemlendiğinde besiyeri yenilendi.

2.3. Verilerin toplanması ve istatistiksel analiz

Tohum çimlenme oranı inkübasyon döneminin 45. gününün sonunda hesaplanırken, 90. gününden sonra ise protokorm gelişimi değerlendirildi. Organ gelişim parametreleri protokormların kültür kaplarına aktarılmasından sonra başlatılan inkübasyon süresinin 180. günü sonunda ölçüldü. Tohumlar, Yamazaki ve Miyoshi [9] tarafından belirtilen şekilde altı farklı çimlenme evresinde sayıldı ve sınıflandırıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Yamazaki ve Miyoshi [9]'ye göre tohum çimlenme safhaları

Çimlenme Evreleri	Belirteçler
Evre 0	Çimlenme yok. Embriyo büyümesi gözlemlenmez.
Evre 1	Ön çimlenme safhası. Embriyo tohum kabuğunu enine doldurur.
Evre 2	Çimlenme safhası. Embriyo tohum kabuğundan çıkıntı yapar.
Evre 3	Protokorm safhası. Embriyo tohum kabuğundan kurtulur.
Evre 4	Rizoit safhası. Protokorm yüzeyinde rizoitler görülür.
Evre 5	Sürgün safhası. Protokormdan sürgün farklılaşır.

Çimlenme yüzdeleri, aşağıdaki formül (1) kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Çimlenme (\%)} = \frac{\Sigma \text{Tohum sayısı (Evre 2-5)} \times 100}{\Sigma \text{Tohum sayısı (Evre 0-5)}} \quad (1)$$

Tartılan 1 mg *S. vomeracea* tohumunda yaklaşık 180-200 ayrı tohum bulunmaktadır. Her bir kültür kabında 5 protokorm kültüre alındı ve her tekrarda 3 kültür kabı kullanıldı. Her deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Veriler "ortalama \pm standart sapma (SS)" olarak verildi. Ortalamalar Duncan veya Tukey çoklu karşılaştırma testleri kullanılarak $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde karşılaştırıldı. İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 22 yazılımı kullanıldı.

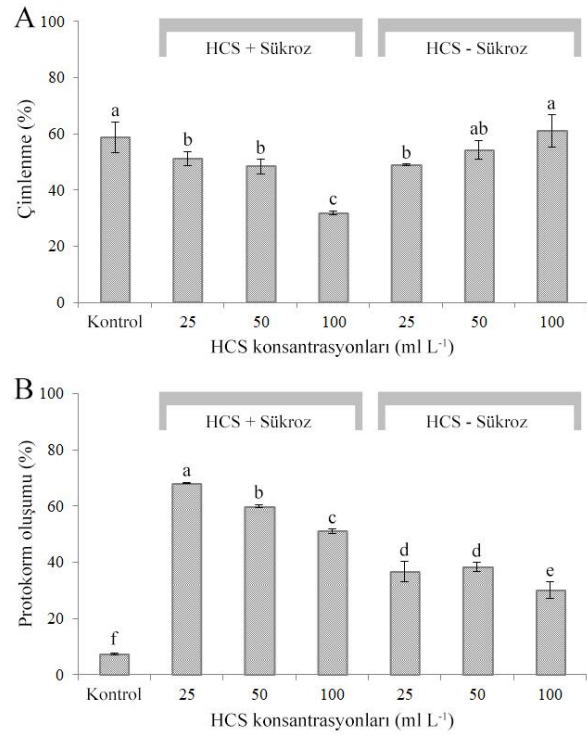
3. Bulgular ve Tartışma

Uygulanan TTC testi sonunda *S. vomeracea* tohumlarına ait canlılık oranı %54,67 \pm 4,16 oranında bulundu. İnkübasyon süresinin sonunda ise tohum çimlenme oranı kontrol ortamından %58,77 \pm 5,51 olarak kaydedildi. Artan HCS konsantrasyonlarının ortamdaki sükröz varlığında tohum çimlenme oranını kademeli olarak azalttığı belirlendi (Şekil 1A). Sükröz yokluğunda ise çimlenme oranında artan HCS konsantrasyonlarıyla birlikte kademeli bir artış görüldü dahi ulaşılan en yüksek çimlenme oranının kontrolden istatistiki olarak farklı olmadığı belirlendi. Besiyerinde eşzamanlı olarak sükröz ve HCS mevcudiyeti kontrol grubuna oranla protokorm oluşumunu çarpıcı şekilde artırdığı bulundu (Şekil 1B).

Bununla birlikte sükröz ortamdaki çıkarıldığında protokorm oluşum oranı kontrol grubundan yüksek bulunsada dahi kademeli olarak azaldı. Denenen HCS uygulamalarının protokorm oluşumunu kontrole kıyasla 4 ila 8 kat arasında artırdığı kaydedildi. En yüksek protokorm oluşum oranları HCS ve sükröz ilaveli besiyerinde gözlemlendi için sonraki deneylere bu ortamla devam edildi.

Besiyerinde HCS ve sükrözün eşzamanlı varlığında çimlenme oranının artan HCS konsantrasyonlarıyla birlikte azalmasının nedeni besiyerinin osmotik potansiyelinin düşmesine bağlı olarak tohumların su alımının sınırlanması olabilir [10]. Nitekim besiyerinin osmotik potansiyeli üzerine etkili olan sükrözün ortamdaki çıkarıldığında tohum çimlenme oranının artmaya başlaması bu çıkarımı doğrulamaktadır. Bitki doku kültüründe kullanılan farklı karbon kaynaklarının bitki hücrelerini, doku ve organ gelişimini çeşitli şekillerde etkilediği gösterilmiştir [11]. Bitki doku kültüründe sükröz, mannitol, fruktoz glukoz, maltoz ve laktöz gibi mevcut olan alternatiflerin arasında birincil karbon kaynağı olarak kabul edilmiştir [12]. Bununla birlikte bu çalışmadaki çimlenme sonuçları,

HCS'nin yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında *S. vomeracea* tohumlarının çimlendirilmesinde sükröz yerine kullanılabilir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Sükröz varlığında HCS uygulamalarından sonra azalan protokorm oluşum oranları, HCS ve sükrözün birlikte besiyerinin osmotik potansiyelini azaltabileceğini ve bunun su ve besin alımını sınırlayabileceğini göstermiştir. Ayrıca, bazı çalışmalarda sükrözün bitki hücrelerinde hipoksi ve etanol birikmesine neden olmasından dolayı tamamen veya kısmen başka bir karbon kaynağı ile değiştirildiği rapor edilmiştir [13]. Çimlenme ve protokorm oluşumundaki birbirinin karşıtı olan bulgular ve tartışmalar bitkinin her gelişim aşamasında beslenme ve fizyolojik ihtiyaçlarındaki değişiklikleri işaret etmektedir. Bektaş ve Sökmen [14] *S. vomeracea*'da sükröz ilavesiz KN besiyerinden protokorm oluşum oranını %52,22 \pm 2,9 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise sükröz ilavesiz KN kültür ortamına 25 ml L⁻¹ HCS ilavesinin *S. vomeracea*'da %60'ın üzerinde protokorm oluşum oranları verebileceğini gösterilmiştir.



Şekil 1. Hindistan cevizi suyunun *Serapias vomeracea*'de tohum çimlenme (A) ve protokorm oluşum oranlarına (B) etkisi. Veriler ortalama \pm SS'yi temsil etmektedir. Aynı üst karakterlere sahip olan ortalamalar arasında Duncan çoklu aralık testine göre önemli ölçüde fark yoktur ($p < 0.05$).

Çalışmadan elde edilen veriler incelendiğinde kontrole kıyasla sürgün uzunluğunun besiyerindeki HCS konsantrasyonuna paralel şekilde arttığı gözlemlendi. *S. vomeracea*'de organ gelişimi üzerine HCS uygulamalarının konsantrasyona bağlı etkileri Şekil 2'de gösterilmektedir. Buna rağmen 25 ve 50 ml L⁻¹ HCS içeren

besiyerlerinden alınan sonuçlar arasında istatistiki fark bulunmadı (Şekil 3A). HCS uygulamalarının konsantrasyondan bağımsız olarak *S. vomeracea*'de kök gelişimi üzerine olumsuz etki yaptığı bulundu.

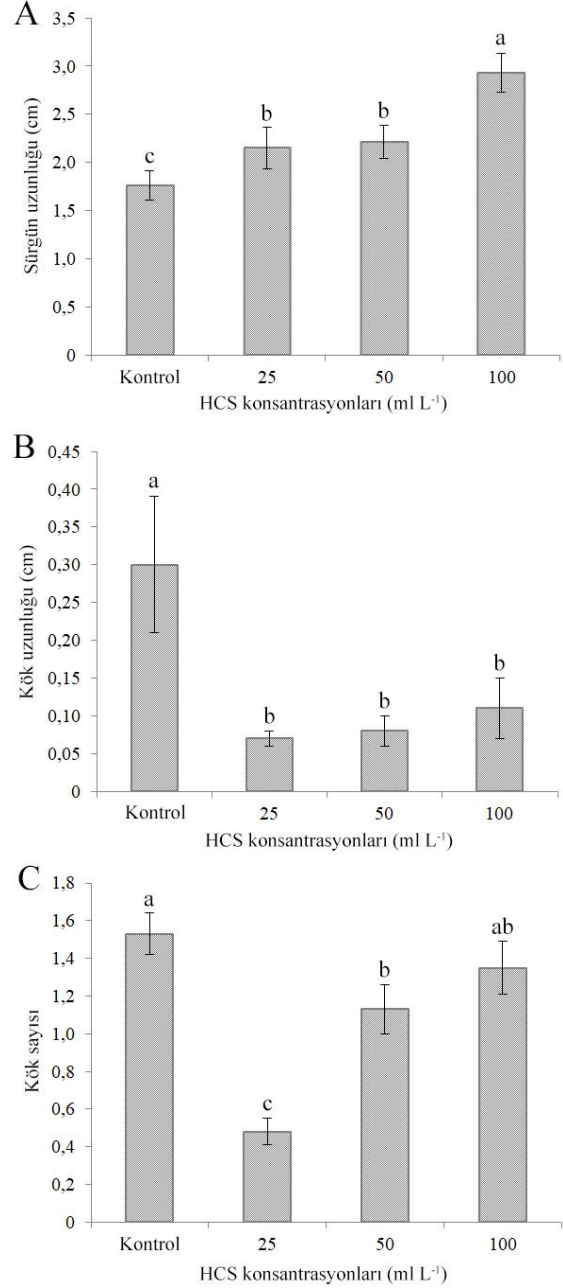


Şekil 2. Hindistan cevizi suyunun *Serapias vomeracea*'de *in vitro* bitki gelişimi üzerine konsantrasyona bağlı etkileri. Kontrol (A), soldan sağa doğru “25, 50 ve 100 ml L⁻¹” Hindistan cevizi suyu uygulamaları (B). Ölçek çubukları her şekil için 1 cm uzunluğu temsil etmektedir.

Ortalama kök uzunlukları kontrole oranla 3 ila 4 kat arası azalırken uygulanan HCS konsantrasyonları sonucunda alınan sonuçlar arasında istatistiki fark bulunmadı (Şekil 3B). Bununla birlikte artan HCS konsantrasyonları ortalama kök uzunluğu üzerinde oldukça sınırlı bir olumlu etki gösterdi. Ortalama kök sayısının uygulanan en düşük HCS konsantrasyonu ile birlikte çarpıcı şekilde azaldığı ve artan HCS konsantrasyonlarıyla birlikte yükseldiği bulundu. Buna rağmen ortalama kök sayısının kullanılan en yüksek HCS konsantrasyonunda dahi kontrol grubundan elde edilen değere ulaşamadığı kaydedildi (Şekil 3C).

Hindistan cevizi suyu, sitokinin olarak işlev gören difenil üre dâhil büyümeyi ve hücre bölünmesini teşvik eden birçok besinsel ve/veya hormonal madde içerir [15]. *Dendrobium lasianthera* kültürlerinde Vacin & Went [16] besiyerine %15 (v:v) oranında HCS eklenmiş ve bunun sürgün, kök ve yaprak gelişimini artırdığı bildirilmiştir [6]. Çeşitli *Phalaenopsis* [17] ve *Calathea* [18] hibritlerinde ayrıca bazı süs bitkilerinde de [19] HCS'nin sürgün gelişimi ve bitki rejenerasyonunu artırdığı rapor edilmiştir. *S. vomeracea* kültürlerinde ise HCS kullanımının etkilerine ait daha önce bildirilmiş bir veri bulunmamaktadır. Tropik orkidelerde *in vitro* bitki kök ve sürgün uzamasının sağlandığı, tohumların çimlendirilmesi sonrasında kullanılan besiyerlerinde HCS yaygın olarak

kullanılmaktadır [20]. Bunun nedeninin HCS'nin yüksek nitrojen ve zeatin içeriğinden kaynaklandığı öne sürülmüş ve bu bilginin teyit edilmesi gerektiği vurgulanmıştır [21]. *S. vomeracea* üzerinde yapılan bu çalışmada ise besiyerinde sükröz yerine kullanılan HCS'nin bitkinin gelişimi için ihtiyaç duyduğu karbon kaynağı olarak yetersiz kaldığını göstermektedir.



Şekil 3. Hindistan cevizi suyunun *Serapias vomeracea*'de sürgün uzunluğu (A), kök uzunluğu (B) ve kök sayısı (C) üzerine etkileri. Veriler ortalama±SS'yi temsil etmektedir. Aynı üst karakterlere sahip olan ortalamalar arasında Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre önemli ölçüde fark yoktur ($p < 0.05$).

4. Sonuçlar

Sonuç olarak *S. vomeracea* tohumlarının *in vitro* asimbiyotik çimlendirilmesinde sükröz yerine HCS'nin kullanılabilceği gösterilmiştir. Ayrıca *S. vomeracea*'nin *in vitro* gelişiminde protokorm oluşumu ve sonraki organogenez aşamalarında ise HCS'nin besiyerinde ancak 100 ml L⁻¹'den daha yüksek bir konsantrasyonda veya sükröz ile birlikte daha düşük konsantrasyonlarda kullanılması halinde olumlu etkiler göstereceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

- [1] Acemi A., Özen F., 2019. Optimization of *in vitro* asymbiotic seed germination protocol for *Serapias vomeracea*. The EuroBiotech Journal **3(3)**, 143–151.
- [2] Acemi A., Çobanoğlu Ö., Türker-Kaya S., 2019. FTIR-based comparative analysis of glucomannan contents in some tuberous orchids, and effects of pre-processing on glucomannan measurement. Journal of the Science of Food and Agriculture **99(7)**, 3681–3686.
- [3] Molnár Z., Virág E., Ördög V., 2011. Natural substances in tissue culture media of higher plants. Acta Biologica Szegediensis **55(1)**, 123–127.
- [4] George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J., 2008. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd ed. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- [5] Parthibh S., Rao M.V., Kumar T.S., 2015. *In vitro* regeneration from protocorms in *Dendrobium aqueum* Lindley – An imperiled orchid. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology **13(2)**, 227–233.
- [6] Utami E.S.W., Hariyanto S., Manuhara Y.S.W., 2017. *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through mature seed culture. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine **7(5)**, 406–410.
- [7] Jevšnik T., Luthar Z., 2015. Successful disinfection protocol for orchid seeds and influence of gelling agent on germination and growth. Acta Agriculturae Slovenica **105**, 95–102.
- [8] Knudson L., 1946. A new nutrient solution for germination of orchid seed. American Orchid Society Bulletin **15**, 214–217.
- [9] Yamazaki J., Miyoshi K., 2006. *In vitro* asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). Annals of Botany **98**, 1197–1206.
- [10] Borowitzka L.J., 1985. Glycerol and Other Carbohydrate Osmotic Effectors. In: Gilles R., Gilles-Baillien M. (eds) Transport Processes, Iono- and Osmoregulation. Proceedings in Life Sciences. Springer, Berlin, Heidelberg
- [11] Roycewicz P., Malamy J.E., 2012. Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on Arabidopsis root and shoot system growth in laboratory assays. Philosophical Transactions of the Royal Society B **367**: 1489–1500.
- [12] Neto V.B.P., Otoni W.C., 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? Scientia Horticulturae **97**: 193–202.
- [13] Yaseen M., Ahmad T., Sablok G., Standardi A., Hafiz I.A., 2013. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. Molecular Biology Reports **40**: 2837–2849.
- [14] Bektaş E., Sökmen A., 2016. *In vitro* seed germination, plantlet growth, tuberization, and synthetic seed production of *Serapias vomeracea* (Burm.f) Briq. Turkish Journal of Botany **40(6)**: 584–594.
- [15] Teixeira da silva J.A., Chan M.T., Sanjaya Chai M.L., Tanaka M., 2006. Priming abiotic factors for optimal hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) PLB and callus induction, plantlet formation, and their subsequent cytogenetic stability analysis. Scientia Horticulturae **109**: 368–378.
- [16] Vacin E, Went F.W., 1949. Some pH changes in nutrient solutions. Botanical Gazette **110**: 605–613.
- [17] Zahara M., Datta A., Boonkorkaew P., Mishra A. 2017. The Effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* Hybrid 'Pink'. Brazilian Archives of Biology and Technology **60**: e17160149.
- [18] Baque A., Shin Y-K., Elshmary T., Lee E-J., Paek K-Y., 2011. Effect of light quality, sucrose and coconut water concentration on the microporpagation of *Calanthe* hybrids ('Bukduseong' × 'Hyesung' and 'Chunkwang' × 'Hyesung'). Australian Journal of Crop Sciences **5(10)**:1247-1254.
- [19] Agampodi V.A., Jayawardena B. 2009. Effect of coconut water (*Cocos nucifera* L.) water extracts on adventitious root development in vegetative propagation of *Dracaena purple compacta* L. Acta Physiologia Plantarum **31**: 279–284.
- [20] Arditti J., 2008. Micropropagation of orchids, 2 volume set. 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing, United Kingdom.
- [21] Yong J.W.H., Ge L., Ng Y.F., Tan S.N., 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. Molecules **14**: 5144–5164.