

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SERAPIAS VOMERACEA SUBSP. LAXIFLORA (SOÓ) GOLZ AND REINHARD
(ORCHIDACEAE)' NİN MİKORİZAL FUNGUSLARININ ÇİMLENME ÜZERİNE
ETKİSİ**

Sevim DEMİRAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERAPIAS VOMERACEA SUBSP. *LAXIFLORA* (SOÓ) GOLZ AND REINHARD
(ORCHIDACEAE)' NİN MİKORİZAL FUNGUSLARININ ÇİMLENME ÜZERİNE
ETKİSİ

Sevim DEMİRAY

Biyoloji Anadalı Dalı

SAMSUN
2018

Her hakkı saklıdır.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü


Biyoloji Anabilim Dalında

Sevim DEMİRAY Tarafından Hazırlanan

**SERAPIAS VOMERACEA SUBSP. LAXIFLORA (SOÓ) GOLZ AND
REINHARD (ORCHIDACEAE)' NİN MİKORİZAL FUNGUSLARININ
ÇİMLENME ÜZERİNE ETKİSİ**

başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 02/07/2018 tarihinde yapılan sınav ile

YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İbrahim Özkoç.....

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Tuğba Özbucak.....

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Prof. Dr. Yasemin Özden Kömpe.....

(Danışman)

.../.../2018

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

...../...../2018

Sevim DEMİRAY

SERAPIAS VOMERACEA SUBSP. LAXIFLORA (SOÓ) GOLZ AND REINHARD (ORCHIDACEAE)' NİN MİKORİZAL FUNGUSLARININ ÇİMLENME ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Bu çalışmada *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* (Soó) Golz and Reinhard (Orchidaceae) tohumlarının simbiyotik yöntemler ile çimlenmesi ve gelişmesi incelenmiştir.

Simbiyotik kültür çalışmalarında, *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* köklerinden vejetatif yapıların toprak üzerinde görüldüğü aydan köklerin tamamen kurduğu aya dek izole edilen funguslar morfolojik olarak tanımlanmış, *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* tohumlarının çimlendirilmesindeki etkileri belirlenmiştir. *Rhizoctonia* benzeri bu fungal izolatların hepsi tohum çimlenmesini teşvik etmiş, en yüksek çimlenme oranları sırasıyla Sv1 22, Sv1 30, Sv1 29, Sv1 21, Sv1 31 ve sv1 19 kodlu fungal izolatlarda görülmüştür. Bu izolatlar arasında tohum ve fide gelişimini en iyi destekleyen izolat Sv1 22 kodlu izolat olarak tesbit edilmiştir. *Rhizoctonia* dışı olan Sv1 20 kodlu izolat ise çimlenmeyi teşvik etmemiştir.

Serapias vomeracea subsp. *laxiflora* tohumlarının farklı karbon kaynaklarına göre gelişimleri incelenmiş ve karbon kaynaklarının tohumların gelişmesinde etkili olduğu, en iyi gelişmenin ise sukroz içeren ortamda olduğu görülmüştür.

Ayrıca hem simbiyotik ortamda gelişen *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* fideleri hemde farklı karbon kaynaklarını içeren ortamlardaki fideler seraya aktarılmış ve bu fidelerin gelişimleri gözlemlenmiştir. Serada 3 ay sonunda gelişen fideler doğal ortamına aktarılmış ve burada 8 ay sonunda ilk yumru oluşumu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Orkide, Fungus, Mikoriza, Simbiyotik, Çimlenme.

MYCORRHIZAL FUNGI OF *SERAPIAS VOMERACEA* SUBSP. *LAXIFLORA* (SOÓ) GOLZ AND REINHARD (ORCHIDACEAE) EFFECT OF GERMINATION

ABSTRACT

In this study, germination and development of *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* seeds with symbiotic methods were investigated.

In symbiotic culture studies, fungi isolated in time that the vegetative organs are visible on the ground until the roots are completely dry, from *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* roots and morphologically defined, effects of germination of *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* seeds were determined. All these fungal isolates, such as *Rhizoctonia*, promoted seed germination, with the highest germination rates seen in fungal isolates Svl 22, Svl 30, Svl 29, Svl 21, Svl 31 and svl 19, respectively. Among these isolates, the isolate Svl 22 encoding isolate was the best supporting seed and seedling development. The Svl 20 encoded isolate, other than *Rhizoctonia*, did not encourage germination.

The growth of *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* seeds was investigated with respect to different carbon sources and carbon sources were found to be effective in the development of seeds and the best development was in sucrose-containing medium.

Serapias vomeracea subsp. *laxiflora* fidelity grown in both symbiotic media were also transferred to pot in different carbon sources containing media and the development of these fidelities was observed. The seedlings developed at the end of 3 months in the pot was transferred to its natural environment and the first tuber formation was observed after 8 months.

Key words: Orchid, Fungus, Mycorrhiza, Symbiotic, Germination.



Aileme,

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Akademik eğitim sürecimin bir üst noktası olan yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca yardım ve desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Beni bugünlere getirmek için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan anneme, babama ve her anımda yanımda olan kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK'ın: 114Z218 'nolu Bilimsel Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

Haziran 2018, Samsun

Sevim DEMİRAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Mikoriza ve mikorizal funguslar	4
2.2. Konak Değişimi Sayesinde Evrim.....	6
2.3. Orkide Funguslarının Özellikleri.....	6
2.4. Küresel İklim Değişikliğinin Orkide Popülasyonlarına Etkileri	12
2.5. Koruma Çalışmaları.....	13
3. MATERYAL ve METOT	16
3.1. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Teşhislerinin Yapılması.....	16
3.2 Tohumların Toplanması ve Simbiyotik Çimlendirme Deneylerinde Kullanılması	16
3.3. Araştırmada Kullanılan Kültür Ortamları	17
3.3.1. Fungus izolasyon ortamı	17
3.3.2. Patates dekstroz ortamı.....	18
3.3.3. Su agarı ortamı	18
3.3.4. ‘Safranin O’ ve ‘lactofenol cotton blue’ boya çözeltisi	18
3.3.5. Tohum çimlendirme ortamı.....	19
3.3.6. Farklı karbon kaynakları içeren simbiyotik besin ortamları	19
3.4 Fungusların Köklerden İzolasyonu.....	20
3.5. Fungusların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	20
3.5.1. Çekirdek sayılarının belirlenmesi.....	20
3.6. Simbiyotik Besin Ortamlarına Tohumların Ekilmesi ve Fungusun Aşılması	20
3.7 Simbiyotik Kültür Ortamında Gelişen Fidelerin Sera Ortamına Aktarılması	21
3.8 Gelişen Fidelerin Farklı Karbon Kaynakları İçeren Saksı Ortamına Aktarılması.....	21
4. BULGULAR	22
4.1. Fungus İzolasyonu.....	22
4.2. Fungusların renk skalasına ve hif yapısına göre gruplanması	22
4.3. Mikorizal fungusların tohum çimlenmesine etkisi	25
4.4. Simbiyotik kültürde elde edilen fidelerin toprağa aktarılması	26
4.5. Orkide tohumlarının çimlenmesinde farklı karbon kaynaklarının etkisi.....	28
5. TARTIŞMA	31
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	51

ÇİZELGELER LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Fungus izolasyon ortamı	17
Çizelge 3.2. Patates dekstroz agar ortamı içeriği	18
Çizelge 3.3. Su agarı ortamı içeriği	18
Çizelge 3.4. 'Safranin O' boya çözeltisi içeriği	18
Çizelge 3.5. 'Lactofenol cotton blue' boya çözeltisi	19
Çizelge 3.6. Modifiye simbiyotik yulaf ortamı	19
Çizelge 4.1. İzolasyon döneminde elde edilen fungal izolatların morfolojik özellikleri	22
Çizelge 4.2. Elde edilen mikorizal fungusların tohum çimlenmesine etkileri	26
Çizelge 4.3. Modifiye yulafli simbiyotik ortamında farklı karbon kaynaklarının çimlenme üzerine etkisi	28



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Rhynie bölgesi kayalarından izole edilen <i>Aglaophyton</i> fosillerinde hif ve arbüsküller (Remy vd., 1994).....	17
Şekil 2.2. Halk tarafından toplanan orkide yumruları	185
Şekil 4.1. İzole edilen fungusların petri ve hif görüntüleri (2016).....	18
Şekil 4.2. Seraya aktarıldıktan 8 ay sonra gelişen yumrulu fide i.....	18
Şekil 4.3. <i>Serapias vomeracea</i> subsp. <i>laxiflora</i> fidelerinin yaşam döngüsü; simbiyotik etkileşim için tohumların (b) uygun fungusla (c) infekte olması, protokorm gelişimi ve protokormda aktif endofitler (d), simbiyotik kültür ortamında gelişen fideler (e), fidelerin köklerinde fungal endofitler (f) fidelerin seraya aktarılması (g), doğal ortamında yaşama adapte olmuş çiçeklenme döneminde erişkin orkide fidesi (a)	19
Şekil 4.4. Farklı karbon kaynaklarında gelişen fidelerin görüntüleri.....	19
Şekil 4.5. Farklı karbon kaynaklarında gelişen fidelerin saksı ortamındaki gelişmeleri	22

1. GİRİŞ

Orchidaceae familyasının, tüm monokotiledonların % 40' ını ve tüm angiosperm türlerinin % 10'unu oluşturan 25 000 tür içerdiği tahmin edilmektedir (Rasmussen, 2014). Türkiye'de ise toplam 24 cinse ait % 85'i yumru olan 150 tür yetişmektedir (Güner, 2012).

Orchidaceae, çok eski bir familyadır ve bugünkü dağılımı, muhtemelen 125 milyon yıl önce Gondwana kıtasının parçalanmasıyla gerçekleşmiş ve hala aktif bir evrim sürecindedir (Cribb vd., 2003). Orchidaceae familyasının bireyleri, neredeyse her yerde bulunurlar ve tüm büyük kıtalarda görülürler (Dressler, 1981). Türlerin dağılımı ise tekdüze olmayıp, tropik bölgelere doğru belirgin bir şekilde çeşitlilik artmaktadır. Tropik bölgelerde bile, dağılım kıtalar ve bölgeler arasında geniş çapta değişmektedir (Cribb vd.,2003). Güney Amerika'nın Kuzey And Dağları, Orta Amerika, Madagaskar, Çin, Sumatra, Borneo, Yeni Gine ve Avustralya orkideler açısından özellikle zengindir (Cribb vd.,2003).

Ilıman kuşak orkideleri, fotosentetik ya da klorofilsiz (parazit), toprak altında yumru, köklü veya rizomludur. Yumrular genellikle yuvarlak, elipsoid, uzamış ya da dallanmış olabilir (Sezik,1984). Yumru orkidelerde genellikle her bitki iki adet yumru taşır; bunlardan biri içi boşalmış eski, diğeri yeni oluşmuş yumru olup eski yumrunun besin içeriği o yılın ilkbahar mevsiminde yeni bitkinin oluşması için kullanılır ve bu süreçte gelecek yılın yumrusu da oluşur (Sezik, 1984).

Meyve küçük ve çok tohumlu, kapsül şeklindedir. Orkideler tipik olarak, rüzgârla uzak mesafelere kolaylıkla taşınabilen son derece hafif "toz tohumları" üretir (Swarts ve Dixon, 2010). Tohumları yaklaşık 0.18-3.85 mm boyutlarında olabilir, embriyosu ise 100-200 hücreden oluşur (Hadley, 1983). Bilinen tohum ağırlıkları 0.31-24 µg (78 katına kadar) aralığında değişiklik göstermektedir. Tohumlarda embriyo çok küçüktür, farklılaşmamış ve endosperm çok azdır (Arditti ve Ghani, 2000). Tohumlar uzun süre havada kalabilir (Rasmussen, 2002). Tohumlarının küçük olması taşınabilirliğini artırırken, tohumun çok sayıda olması tohum çimlenmesinin zorluğunu ve fidelerin ölüm oranının çok büyük olduğunu işaret eder (Arditti ve Ghani, 2000; Rasmussen, 2002).

Orkide popülasyonlarına yönelik aşırı tahribat, habitat kaybı ve habitat parçalanması gibi tehditler, genel olarak bitki neslinin devamı ile ilgili birçok büyük tehlikeler içerir (Swarts ve Dixon, 2009). Ekolojik bağlantılardaki (polinatör ve mikoriza kaybı) bozulmalar, değişen abiyotik koşullar (toprak ve hidroloji), yabancı otlar, zararlı böcekler ve hastalıklar da bu tehditler arasındadır (Swarts ve Dixon, 2009). Ayrıca, iklim değişikliğinin etkileri, orkideler için henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, değişen habitatlardaki kuraklık, yangın ve ekstrem hava koşulları birçok orkide türü için ölümcül bir darbe niteliğinde olacaktır (Swarts ve Dixon, 2009).

Orkidelerdeki tohum üretiminin çokluğu, fidelerin ölüm oranının önemli derecede büyük olduğunu göstermektedir (Rasmussen 2002). Uygun olmayan fiziksel koşullar herhangi bir bitkinin tohumlarının çimlenmesini engelleyen zorluklar ortaya çıkarır, ancak orkide tohumları uygun mikobiyot bulma konusunda da problemlere sahiptir (Rasmussen 2002). Ayrıca, başka bir görüşe göre; tozlaşma sistemlerinde, uygun polinatörün azalması, o polinatöre bağımlı bitki türlerinin yok olmasına yol açabilir (Darwin, 1862; Dunn vd., 2009; Phillips vd., 2014).

Ülkemizde endemik ve endemik olmayan orkide türlerinin IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) listesindeki kategorilerde belirlenen tehlike sınıflarına göre, 3 adedi tehlikede, 3 adedi az tehdit altında, 10 adedi zarar görebilir kategorisindedir (Davis, 1984; Güner vd., 2000; Sandal, 2010). Beş cinse ait, 28 orkide türü de endemiktir (Sezik, 2002). Hemen hemen tüm geofitlerde olduğu gibi oldukça kısa sayılabilecek bir vejetasyon dönemi içinde çiçeklenen bu bitkilerden, yumrulu olan orkide türleri salep ve dondurma yapımında ya da tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır (Sezik, 2002). Salep üretimi amacıyla orkideler, kırsal bölgelerdeki halk tarafından çiçeklenme aşamasında toplanmaktadır. Anadolu'da 5 büyük toplama alanı vardır bunlar; Anadolu'nun kuzeyinde Kastamonu, batısında Muğla, güneyinde Antalya, güneydoğusunda Kahramanmaraş ve doğusunda Van'dır. *Ophrys*, *Orchis*, *Himantoglossum*, *Serapias*, *Anacamptis*, *Comperia*, *Barlia*, *Dactylorhiza*, *Aceras* ve *Neotinea* cinslerine ait yaklaşık 120 takson Anadolu'da salep yapımında kullanılmaktadır (Sezik, 2002). Bu sebeplerle koruma altına alınan orkidelerin in vitro koşullarda doku kültürü yöntemiyle (Morel, 1960), asimbiyotik kültür (Burgef, 1909) ve /veya simbiyotik kültür ortamlarında tohumların çimlendirilmesi yoluyla üretim çalışmaları başlatılmıştır (Rasmussen, 2002).

Doku kültüründe ilk kez Hanning (1904) embriyo kültürü yoluyla üretimi gerçekleştirmiştir (Yancheva vd., 2016). *Laelia-Cattleya*'da Knudson (1922), *Laelia-Cattleya*

tohumlarının fungus içermeyen doku kültürü ortamında (asimbiyotik) çimlendirmiş, bu yöntem daha sonra yapılan doku kültürü yoluyla orkide üretiminin başlangıcı olmuştur (Arditti, 1967). Knudson (1922), salebin içeriğinin, % 48'lik musilaj, % 27'lik nişasta, % 5'lik protein, bazı şekerler ve çözünebilir minerallerden oluştuğunu bulmuştur. Arditti (1967), Bultel (1920, 1921, 1924, 1925, 1926), Ballion (1924, 1928), ve Clement (1925) 'in asimbiyotik kültür ortamında başarılı çimlendirme çalışmaları yapmış olduğunu belirtmiştir.

Tüm orkidelerin doğada tohum çimlenmesi ve/veya fide gelişimi için "uygun" bir mikorizal fungus ile zorunlu bir simbiyotik ilişkiye girmesi gereklidir (Arditti, 1992; Otero vd., 2002). Son birkaç onyıda, simbiyotik fungusların , bitki yapısı, işlevi ve sağlığı açısından çok kritik bir rol oynadıkları belirginleşmiştir (Meléndez vd., 2000). Nitekim bitki topluluklarının simbiyotik birlikler olmadan, bir çok çevresel strese karşı hayatta kalamayacağı düşünülmektedir (Meléndez vd., 2000). Ülkemizde tohumdan üretim yönünde ilk çalışma, 1983 yılında Gönülşen tarafından *Orchis anatolica* türü ile yapılmıştır. Özkoç ve Dalcı (1992), Özdener (1994), Sazak ve Özdener, (2006), Kömpe ve Mutlu (2017), asimbiyotik ve simbiyotik besin ortamında yaptıkları çalışmalar ülkemizde bu alandaki çalışmalara katkıda bulunmuştur.

Ege üniversitesi Tarımsal Araştırma Enstitüsünde yürütülen bir projede, birden fazla yumru ürettiği belirlenen *Serapias vomeracea* ve *Orchis sancta*'nın yumrularının tarlaya dikilmesi suretiyle kültüre alınması yönünde çalışmalar devam etmektedir (Tutar vd., 2012). Ege tarımsal araştırma enstitüsünün uyguladığı bu yöntem daha sonra tüm Türkiye orkidelerini kapsayacak şekilde uygulanmaya başlamıştır (<https://arastirma.tarim.gov.tr/etae>). Bu da bütün yumrulu orkidelerin aşırı miktarda toplanmasına ve çok ciddi orkide tahribatına sebep olmaktadır. Oysa tohum çimlenmesi yoluyla üretim, ticari amaçlara hizmet edebileceği gibi elde edilen yumruların doğal habitatlarına dikilerek tahribatın iyileştirilmesine de çok önemli katkı sağlayacaktır.

Bu bilgiler ışığında amacımız, *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* bitkisinin mikorizal fungus çeşitliliğini belirleyerek elde edilen fungal izolatların simbiyotik koşullarda tohum çimlenmesi ve fide gelişimi üzerindeki etkilerini ortaya koymak ve devamında elde edilen fideleri, serada toprağa aktararak hem orkide tahribatını iyileştirmeye yönelik çalışmalara katkıda bulunmak hemde tohumdan üretimi yaygınlaştırıp sürdürülebilir bir tarımsal ürün sunabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

Orchidaceae familyası, epifitik yaşam formundan karasal yaşam formuna, klorofilli türlerden klorofilsiz türlere kadar çok farklı yaşam stratejilerine sahiptir (Rasmussen ve Whigham, 2002). Orkidelerin fotosentetik safhaya ulaşıncaya kadar tüm bitkinin mineral ve organik besin gereksinimlerini karşılaması fungal bir mikobiyontlar sayesinde gerçekleştirilir (Rasmussen ve Whigham, 2002). Tüm orkidelerin ilk gelişim evresi, fotosentetik olmayan, mikoheterotrofik protokorm olup bu aşamada fungusla bağımlılık söz konusudur (Rasmussen ve Whigham, 2002). Yapraklar ortaya çıktıktan sonra, kısmi mikoheterotrofik orkideler olarak, fungal endofitlerinden yararlanma oranları azalır. (Merckx vd., 2009; Umata, 2013). Klorofilsiz orkideler ise fotosentez yapamadıkları için yaşamları boyunca uygun mikorizal funguslara bağımlı kalırlar ve bu şekilde bağımlı orkidelere “*tam mikoheterotrof*” orkideler denir (Waterman ve Bidartondo, 2008). Bu yüksek bağımlılık nedeniyle, tam mikoheterotrofların, kısmi mikoheterotroflara oranla funguslarla etkileşimlerinde, daha fazla spesifiklik sergiledikleri ileri sürülmüştür (Waterman ve Bidartondo, 2008).

2.1. Mikoriza ve mikorizal funguslar

Mikoriza, Yunanca’da fungus anlamına gelen “mykes” ve kök anlamına gelen “rhiza” kelimelerinin birleşiminden oluşmakta olup “kök mantarı” olarak nitelendirilmektedir. İlk kez 1885 yılında fungus ile bitki arasındaki ilişkiyi tanımlamak için kullanılmıştır (Frank, 2005). Toprak mikroflorasındaki mikroorganizmalar ile bitkiler arasındaki en yaygın simbiyotik yaşam şekillerinden biri olan mikorizal yaşam, dünya üzerindeki hemen hemen bütün kara bitkilerinde görülmektedir. Mikorizal funguslar muhtemelen topraktaki toplam biyokütlenin % 35-36’sını oluşturmaktadır (Olson vd., 1999).

Mikorizal ortaklığı bulunan bitkinin köklerinde fungus kolonizasyonu süreci, fungustaki bir dizi karmaşık değişiklikleri içeren farklı aşamalarla karakterize edilir, bunlar: spor çimlenmesi, hifal farklılaşma, appressorium (fungusun bitki hücresi içine girmesine yardımcı olan yapı) oluşumu, kök penetrasyonu (yerleşme), hücreler arası büyüme, arbuskül oluşumu ve besin taşınımı şeklindedir (Harris, 1997).

Rhynie bölgesi kayalarından izole edilen Aglaophyton fosillerinde hif ve arbusüller rapor edilmiştir ve bu kanıtlar Devonien’in erken döneminde arbuskular mikorhiza simbiyozunun varlığını ortaya koymuştur (Remy vd., 1994).



Şekil 2.1. Rhynie bölgesi kayalarından izole edilen *Aglaophyton* fosillerinde hif ve arbüsküller (Remy vd., 1994)

Ayrıca, 18s rDNA'nın nükleotid dizisi farklılığı temelli moleküler çalışmalar, Glomales takımına ait taksonların 350-460 milyon yıl önce ortaya çıkmış olduğunu düşündürmektedir (Simon vd., 1993a).

Orkide köklerinin korteksinin içindeki pelotonların gözlenmesi 19. yy'ın erken dönemlerine dayanır (Swarts ve Dixon, 2009). Link (1840), *Goodyera repens*'in kök hücrelerinde görülen yapıların fungus olabileceğini ileri sürmüştür (Curtis, 1939).

Warlich (1886), 500'ün üzerinde orkide türünde yaptığı çalışmada, her bir türdeki fungal enfeksiyonları keşfetmeyi başarmıştır. Frank (1891), enfekte dokulardan hiflerin yayıldığını belirlemiş ve bu dokulardaki hücrel modifikasyonların, bitkinin bu birliktelikte aktif bir rol aldığına göstergesi olarak kabul etmiştir. Bernard'ın (1904, 1909) çalışmaları, parazitik enfeksiyonu durdurmak için bir savunma mekanizması olarak, bitkinin, dokularının içindeki hifleri parçaladığını göstermiştir. Burgeff (1936) ise, bu ilişkiyi “kontrollü patojenik istila” olarak tanımlamıştır. Bu birlikteliğin temel sebebinin, fungusların kompleks besin bileşiklerini ayrıştırma kabiliyetine ve bu bileşiklerin bitki için erişilebilir hale getirilmesine dayandığı düşünülmektedir. Smith (1966) tarafından, miselyumların orkideye karbon taşıyışı, radyoaktif karbon 14 yöntemi ile takip edilmiş ve bu durum önemli bir keşif olarak görülmüştür (Arditti, 1992). Smith'in (1967) diğer çalışmasında, radyoaktif karbonla beslenmiş olan simbiyotik fidelerin analizinde, radyoaktif karbonun % 50'sinin, 160 saat sonra simbiyotik fidelerin hücre duvarı materyallerine ve proteinlerine geçtiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise (Hadley, 1974) karbonun fungusa doğru ters yönlü yer değiştirip değiştirmediği araştırılmış ve bu durumu gözlemlemek amacıyla radyoaktif karbon takibi yapılmıştır. Radyoaktif karbon ile beslenen *Dactyloctenium aegyptium*'nin yaprakları

radioaktif karbon ile beslenmesine rağmen, dış miselyumda işaretli karbon görülmemiştir (Hadley, 1974).

2.2. Konak Değişimi Sayesinde Evrim

Orkide fide mikorizasında en göze çarpan evrim, fungal endofitlerin değişmesidir (Rasmussen ve Rasmussen, 2014). *In situ* olarak elde edilen fideler üzerinde yapılan moleküler tanımlamalara dayanan bir dizi çalışma bu durumu doğrulamaktadır (Rasmussen ve Rasmussen, 2014). *Apostasioid* cinsinin erişkin bitkileri (*Apostasia*), *Ceratobasidiaceae* ve *Botryobasidiaceae*' ye tanımlanan mikobiyontları içerir (Rasmussen ve Rasmussen, 2014). *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* ve *Tulasnella* ise orkide fide mikorizası olarak en gelişmiş orkide gruplarından birkaçında kaydedilmiştir (Rasmussen ve Rasmussen, 2014). Orkideler için bir simbiyont belirleme ve önemine değinme bakımından düşünüldüğünde, *Rhizoctonia* fungusları ile simbiyotik ilişkinin orkide fidelerinin beslenmesi adına son derece başarılı olduğu görülmektedir (Rasmussen ve Rasmussen, 2014).

2.3. Orkide Funguslarının Özellikleri

Simbiyotik çalışmalar endomikoriza adı verilen ve orkide rizosferinde bulunan simbiyotik fungusların izole edilmesini ve bu fungusların tohum çimlenmesi üzerine etkilerinin belirlenmesini içermektedir (Otero vd., 2002). Tüm orkidelerin, mikorizal simbiyontlarının çoğu *Rhizoctonia* benzeri funguslardır (Otero vd., 2002). Bu grup, *Thanatephorus*, *Ceratobasidium* ve *Tulasnella*' nin anamorf gruplarını içerir. Bunlardan bazıları çok çeşitli bitki patojenleri olarak bilinir (Otero vd., 2002).

Rhizoctonia dik açılı dallanma ve dallanan hifin orjin noktasına yakın bir septum ile karakterize edildiği gibi sıklıkla monilioid hücreler olarak bilinen, şişkin hif yapıları bulunur (Sneh, vd., 1991; Otero vd., 2002). *Rhizoctonia*'nin sınıflandırılmasında yardımcı olan bir diğer özellik ise hücrelerdeki çekirdek sayısıdır (Sneh, vd., 1991; Otero vd., 2002). *Rhizoctonia solani*' nin 2 önemli patojen türü (telemorfu: *Thanatephorus*, *Ceratobasidiales*) multinükleat hücrelere sahiptir (Otero vd., 2002). Binükleat hücreler *Ceratobasidium* ve *Tulasnella* cinslerine ait hücrelerde görülür. Üninükleat hücreler ise *Ceratobasidium* ' un anamorfalarında ortaya görülmektedir. (Hietala, vd., 2001; Otero vd., 2002).

Fungusları sınıflandırmak için kullanılan bir başka yöntem ise anastomoz gruplarını (AG) belirleyerek yapılıdır (Sneh , 1991). İki izolat aynı anastomoz grubuna ait olduğunda ,

hifleri birbiri ile birleşir. *Rhizoctonia solani* 13 AG' na sahiptir; binükleat *Rhizoctonia* spp. 21 AG içerirken (Sneh , 1991; Burpee ve Ogoshi, 1991), uninükleat *Rhizoctonia* spp. sadece 1 AG içerir (Hietala, vd., 2001; Otero vd., 2002).

Orkideler ile ilişkili olduğu bilinen *Rhizoctonia solani* (multinükleat)' nin AG'ları AG-6 ve AG-12' dir (Carling vd., 1999; Bayman vd., 2002). Bununla birlikte en yaygın mikorizal grup olan orkide mikorizal fungusları binükleat *Rhizoctonia* formlarıdır (Currah vd., 1997). Uninükleat *Rhizoctonia* formları daha önce orkide köklerinde tesbit edilmemiştir (Otero vd., 2002).

Moleküler sistematik, büyük ölçüde ITS (nükleer ribozomal iç transkripsiyon aralığı) sekanslarına dayanan çalışmalarla *Rhizoctonia* spp. ve orkide mikorizalarının taksonomisi önemli ölçüde geliştirilmiştir (Otero vd., 2002). Otero vd. (2002), yaptıkları bir çalışmada *Ceratobasidium*' un farklı anastomoz gruplarının endofitler olarak orkide köklerinde bulunduğunu belirlemişlerdir.

Dactylorhiza maculata tohumları ile *Tulasnella calospora* (*Rhizoctonia repens* Bernard Juel) *T. asymmetrica*, ve *Sebacina vermifera* fungusları arasındaki ilişkiyi belirlemek üzere yapılan çalışmada, fungus olmayan tüplerdeki tohumların sadece tohum kabuğunu kırmak üzere şiştiği görülmüştür. (Warcup, 1971). *Tulasnella calospora* ile enfekte edilmiş tohumlarda uygun büyüklükte protokorm ve yeşil sürgün oluşturdukları gözlenirken, *T. asymmetrica* ile enfekte edilmiş tohumlarda sadece hafif şişme belirlenmiş, buna karşılık *Sebacina* ve *Tulasnella*'nın başka türleri ile enfekte edilmiş tohumlar, kontrol tüplerindeki tohumlardan daha fazla gelişme göstermemiştir (Warcup, 1971).

Ochora (2001), 12 farklı türde Kenya orkidesinin çimlendirmesi ve analizleri çalışmasını yapmıştır. 12 orkideden izole edilen funguslar ile bu orkidelerin tohumlarının karşılaştırmalı simbiyotik çimlendirilmesi yapılmış, sonuç olarak epifit orkidelerden izole edilen fungusların, karasal orkidelerin çimlendirilmesinde etkisiz olmasına karşın, funguslar, izole edildiği epifit orkidelerin çimlenmesini teşvik etmiştir. Shan (2002), simbiyotik çimlendirme çalışmasında, *Ceratorhiza* ve *Epulorhiza* izolatları ile 14 orkide türünün arasındaki uyumluluk belirlenmiştir. Orkide türlerinden 3'ü olan *Arundina chinensis*, *Spathoglottis pubescens* ve *Spiranthes hongkongensis*'in çimlenmesi ve gelişimi, *Epulorhiza* izolatları tarafından uyarılmıştır. *Habenaria dentata*'nın bir *Ceratorhiza* izolatu ile başarılı bir şekilde simbiyoz oluşturduğu gösterilmiştir. Pereira (2003), orkide mikorizal fungusları ile ilgili Brezilya'daki ilk çalışmayı yapmış ve iki Brezilya endemik epifitik orkide türü olan *Epidendrum rigidum* ve *Polystachia concreta* köklerinden izole edilen fungusu *Epulorhiza*

epifitica olarak tanımlanmışlardır. Stewart (2006), nadir bir Florida karasal orkidesi olan *Habenaria macroceratitis*'in simbiyotik tohum çimlenmesi deneylerini yapmıştır. Stewart'ın (2006) sonuçlarına göre *Rhizoctonia* benzeri bir fungusla enfekte edilen tohumlar için, sürekli karanlık, protokormların gelişimini uyarılmış, simbiyotik çimlenme deneylerinde test edilen üç fungus izolatu, tohum çimlenmesini desteklemiştir, ancak sadece bir izolat protokormun gelişimini teşvik etmiş, kontrol grubundaki tohumlar ise şişmiş ancak çimlenmemiştir.

Simbiyotik fungusların etkilerinin gözlemlenmesiyle bu konuda yapılan çalışmalarda artış olmuş, çok sayıda türü barındıran bu familya üyelerinin köklerinde simbiyotik olarak bulunan funguslar birçok çalışmada tespit edilmiş, bitki türleri ve söz konusu fungus türleri arasında bazı ilişkiler olduğuna karar verilmiştir (Rasmussen 2002).

Orkideler, çeşitli funguslar ile ilişkili içindedir (Arditti, 1979). Orkide tohumlarının simbiyotik funguslar ile ilişkisinin spesifik olduğunu belirterek tür düzeyinde özgüllük kavramından bahsedilmiş ve bu görüş, daha sonra Ramsbattom ve Burgeff tarafından desteklenmiştir (Arditti, 1979). Daha sonra yapılan çalışmalar da orkide mikorizasının spesifik olduğunu ortaya koymuştur (Taylor ve Bruns, 1997). Bu mikorizal birlikteliğin bazı türlerde oldukça spesifik ilişki içinde olduğu gözlemleri, Brundrett'e (2004) göre, giderek artmaktadır. Orkide fungus uyumuna ilişkin Bonnerdeux (2007)'un görüşleri bu konudaki önceki görüşleri (Masuhara ve Katsuya, 1994) desteklemektedir. Orkide tohumlarının protokormlarından izole edilen fungal izolatların, aynı orkide türünün yetişkin bitkilerinden elde edilemediği gözlemlenmiştir (Ramsay vd., 1986; Masuhara ve Katsuya, 1994; Eken vd., 2005). Bununla birlikte Avrupa orkideleri üzerine yapılan bir çalışma (Muir, 1989), mikorizal simbiyozun spesifikliğinin türden türe değişebileceğini göstermiştir. Değişik türlere ait orkidelerden yapılan izolasyonlarda, herhangi bir orkide türünün birden fazla fungus tarafından enfekte edilebileceği, aynı zamanda aynı fungusun geniş bir yayılım gösteren orkide türlerini enfekte edebileceği gösterilerek bu tarz tür-tür düzeyinde özel ilişkinin olamayacağı açıklanmıştır (Rasmussen, 2002). Ayrıca, fungus türleri ile orkidelerin habitatları arasında bir ilişki olabileceği düşünülerek ekolojik özgüllük kavramından söz edilmiştir (Curtis, 1939). Orkide mikorizal birliklerinin özgüllüğü, yakın orkide türleri arasında bile büyük ölçüde değişiklik gösterir (Otero vd., 2002). Ilıman kuşak orkideleri arasında yumrulu orkidelerin, rizumlu orkidelere oranla daha çok mikorizal olduğu düşünülmektedir (Rasmussen, 2002).

Orchidaceae, tohum çimlenmesi ve yeni orkide bitkilerinin gelişimi için, *Ceratorhiza*, *Moniliopsis*, *Epulorhiza* ve *Rhizoctonia* gibi funguslarla yakın ilişki içindedir (Rasmussen ve

Whigham, 1998b). *Rhizoctonia* ile ilişkilendirilen orkide endofitlerinin çoğu saprofitlerdir (Roberts, 1999). Örneğin; *Thanatephorus ochraceus* çürümekte olan yapraklar üzerinde gelişir (Roberts, 1998). *Goodyera pubescens* R. Br. gibi bazı türler bir enfeksiyona ihtiyaç duymadan serbest bir şekilde çimlenebilir, fakat mikorizal bir simbiyont olmadan fidelerin gelişimi her zaman başarılı değildir ve fungal simbiyont yokluğunda genellikle fidelerde büyük oranda ölümler gözlemlenir (Rasmussen ve Whigham, 1998b). Mikorizal birlikteliğe uyumlu olmayan funguslar yüksek fide ölümlerine yol açabilmektedirler (Zettler vd., 1999; Rasmussen, 2002). Masuhara ve Katsuya (1994) 'nın çimlendirme çalışmalarında, bazı *Rhizoctonia* suşlarının *Spiranthes sinensis* ' i çimlendirmiş olmasına karşın, *Spiranthes sinensis* ' 'in doğal mikobiyontu *Tulasnella deliquescens* ' dir (Umata, 1997a,b). *Erythorchis ochobiensis*, doğada belirli bir endofiti bulunmamasına karşın endofiti olmayan çeşitli funguslar ile çimlendirilmiştir (Rasmussen, 2002). Bir başka önemli gözlem, uygun fungusların nispeten farklı ağlara sahip olan dört orkide türünün hepsiyle de kısa süreli ilişkiler oluşturmasıdır, bu da orkide tohumlarının test edilen birçok fungal izolat ile protokorm gelişimini desteklemiştir (Hollick, 2005). Sadece tam uyumlu fungal endofitlerle yapılan simbiyotik çalışmalar, gelişmiş orkide fideleriyle sonuçlanmıştır. (Ramsay vd., 1986; Pope ve Carter 2001; Huynh, 2004; Hollick, 2005). Zelmer (1996), 14 fotosentetik orkideden 9'unda birden fazla fungus cinsi tanımlamıştır. McCormick (2004), çalışmasında, fotosentetik orkidelerin mikorizal fungus çeşitliliğinin, fotosentetik olmayan orkidelere oranla daha düşük olduğunu gözlemlemiştir.

Fungusların bitkiler için; ağır metal toleransı, kuraklık toleransı, bitki büyümesi, hastalık direnci, otoburlara karşı bitkiyi savunma ve besin maddelerinin alımında yardımcı olması gibi çeşitli yararları vardır (Otero vd., 2000). Bazı mikorizal funguslar, bitkinin fizyolojik durumuna ve çevre koşullarına göre mutualist veya parazit davranabilmektedir (Graham ve Eissenstant, 1998; Rasmussen ve Rasmussen, 2009).

Orkide kökleri her yıl yeniden enfekte olurlar (Rasmussen 2002). Orkide tohumlarının çimlenebilmesi için, doğada uygun funguslarla karşılaşması gerekir. McCormick (2016) çalışmasında, orkide mikorizal funguslarının topraktaki yoğunluğunu üzerine incelemeler yapmıştır. *Goodyera pubescens*, *Liparis liliifolia* ve *Tipularia discolor* fidelerinin bulunduğu bölgeler esas alınarak, toprakta bulunan hedef mikorizal mantarların dağılımını ve bolluğunu DNA esaslı moleküler teknikler ile karşılaştırmıştır (McCormick, 2016). Fungusun belirli bitki türlerine yakınlığı fungus için uygun substrat sağlayabilir, bu durum fidelerin başarılı bir şekilde gelişmesi için kritik bir etken olabilir (Rasmussen, 2002). Bonnardeux (2007), orkide

protokormlarında kesin olarak bulunduğu belirlenen fungusların daha büyük orkide fidelerinde bulunmadığını gözlemlemiştir, ve bu durumu açıklamak için uyumlu fungusların, gelişmiş bir fide aşamasına dek kalıcı ilişkili funguslar ve fide gelişimini desteklemeyen, bitkiyle kısa karşılaşmaları olan funguslar olarak tanımlanmasını önermiştir. Fungusları geniş ağlara sahip orkideler (*Disa bracteata*) diğer orkidelerden daha fazla yayılış gösterir ve yeni habitatlara dağılma ve göç etme konusunda daha yetenekli olabilir (Bonnadeux, 2007). Bu durum uygun fungusun geniş alanlara yayılmış olmasından kaynaklanıyor olabilir (Bonnadeux, 2007). Masuhara ve Katsuya (1994), yetişkin *Spiranthes sinensis* fideleriyle, tohum paketlerinin bu fidelere yakın olmasının fide üretiminde başarı sağladığına dair hiçbir bağlantı bulamamıştır. Mckendric (2000a), *Corollorhiza trifida*' da benzer bir sonuca ulaşmıştır. Nemesio ve Rasmussen göre (2011), tohumların istatistiksel çimlenme şansı, ana bitkiye olan mesafeye bağlı olarak önemli ölçüde azalmaktadır. Örneğin, bir *Cephalanthera* türünde Chung (2004), tohumların çoğunluğu için 10 m'den daha kısa mesafedeki dağılma çapı ile istikrarlı bir genetik yapı bulmuştur. Ana bitki gurubundan, 10–15 km'den daha uzak mesafelerdeki yayılmalar (Ridley, 1930; Crackles, 1975; Willems, 1982) çok nadir görülen vakalar olarak görülmektedir. Orkide mikorizal fungusları bitki ile güçlü bir şekilde ilişkili olsa da, toprağa geniş bir şekilde dağılmıştır (Waud, 2016). Orkide mikorizal funguslarının topraktaki çeşitliliği ve sıklığı, orkide bitkilerinden uzaklaştıkça azalmıştır ve bu da, orkide türlerinin kümelenmiş dağılımının, türlere özgü mikorizal endofitlerinde bölgesel olarak dağılımı ile açıklanabileceğini düşündürmektedir (Waud, 2016). Diğer bitkiler genellikle tek çeşit mikorizal fungus ile birleşirken, orkide türleri, bir veya birkaç fungus türü ile mikorizal etkileşimlere girmektedir (Otero, 2004; Ogura vd., 2008; Jacquemyn, 2010; Roche, 2010; Swarts, 2010; Phillips, 2011a). Özelleşmiş ekolojik etkileşimler, bitki türlerinin uygun habitatlarda güçlenmesini kontrol ederek (McCormick, 2012) bitki türlerinin dağılımını sınırlayabilir, bu da potansiyel olarak kullanılabilir habitat çeşitlerini ve coğrafi dağılımı sınırlandırır.

Orkidelerin çoğu yetişkin aşamada fotosentetiktir, çok az orkide türü mikoheterotroftir (Leake vd., 2005). Tüm orkideler başlangıçta mikoheterotroftir (fungusa bağımlı beslenme), ancak en sonunda yaprak üreterek fotosentetik hale gelir (Leake vd., 1994). Son kanıtlar, üçüncü bir orkide beslenme türü olarak miksotrofinin (klorofil taşıdığı halde heterotrof olarak beslenebilme biçimi) var olduğunu göstermektedir (Julou ve vd., 2005). Miksotrofik orkideler, fotosentetik ve mikoheterotrofik orkideler arasında evrimsel bir adım olabilir (Julou vd., 2005). Hatta, fotosentetik orkidelerde mikorizal fungusun varlığı,

orkideye az miktarda da olsa fungustan karbon tedarik etmeye devam ettiğinin göstergesidir, ve bu beslenme şeklinin *Orchidaceae*'de ilk düşünülenden daha yaygın olabileceği düşünülmektedir (Cameron vd., 2006). Bir çalışmada, erişkin *G. repens*'ten mycobionta karbon geçişi tespit edilmiştir (Cameron vd., 2006). Cameron (2006) ayrıca, mikorizal fungusların, yetişkin fotosentetik bitkilere karbon sağladıklarını da göstermiştir. Orkideler büyük olasılıkla hem çimlenme aşamasında hem de yetişkin evrelerinde azot, fosfor ve diğer besin maddelerini funguslar aracılığıyla sağlamakta ve aynı zamanda fotosentez ürünleri de fungal partnere geçmektedir (Liebel ve Gebauer, 2011). Orkide endofitleri tüm minerallere ihtiyaç duyarlar (Cameron vd., 2008). Hem amonyum hem de nitrat orkide fungusları için ideal nitrojen kaynaklarıdır (Cameron vd., 2008). Diğer funguslar ise nitrojen kaynaklarında iyi gelişmemektedir. Tropikal orkidelerin fungusları, aminoasit, pepton, nükleik asit ve üre benzeri organik nitrojen kaynaklarında çok iyi gelişmektedir (Cameron vd., 2008). *Arundia chinensis*'ten izole edilen 2 *Rhizoctonia* fungusu nitrojen kaynağı olarak glutamik asit kullandığında en iyi gelişmeyi göstermiş, diğer uygun kaynakların ise asparajin ve asparjin olduğu görülmüştür (Cameron vd., 2008). Prolin ve metionin de uygun kaynaklar arasında gösterilebilir, Asparajin, glisin ve üre; glutamin, arjinin ve alanine göre *Tulasnella calospora* için daha uygun nitrojen kaynaklarıdır (Cameron vd., 2008).

Simbiyontlar arasındaki denge, diğer şeylerin yanı sıra nitrojen kaynağından da etkilenir (Beyrl, 1995). Bu bağlamda yüksek karbonhidrat ve nitrojen temini bitki tarafından fungusun reddedilmesine neden olur (Rasmussen, 2002). Bitkinin karbonhidrat kaynağı düşük bir ortamda yaptığı herhangi bir mikorizal kombinasyon fungusun bitkide parazit davranmasıyla sonuçlanır. Dış karbohidrat kaynakların yetersizliği fungus parazitliğini artırmaya neden olur (Rasmussen, 2002). Ortamda yüksek nitrojen kaynağının bulunması bitkinin hücre duvarlarını kalınlaştırması ve fenolikler biriktirmesiyle fungusu reddetmesine neden olur (Beyrl vd., 1995). Orkide türleriyle fungal izolatlar arasındaki ilişkilerde simbiyozdan parazitizme kadar değişen bir varyasyonun olduğu da ortaya çıkarılmıştır. Bu değişimin, simbiyotik kültürlerde kullanılan fungal izolatın içinde bulunduğu besinsel şartlara bağlı olduğu anlaşılmıştır (Özkoç ve Dalcı, 1992). Dijk ve Eck (1995), yüksek nitrojen kaynağının in vitroda protokorm verimini negatif yönde etkilediğini ortaya koymuşlardır (Rasmussen, 2002). *In vitro* simbiyotik fideler kontrol gruplarına oranla daha yüksek nitrojen konsantrasyonuna sahiptir (Lee vd., 1997). *Cattlea* hibritine dışarıdan karbon sağlanması durumunda kök-sürgün oranı artarken yaprak gelişimi durmuştur (Smith ve Beyrl, 1993a).

Anacamptis morio'da, substratta ki yüksek karbonhidrat konsantrasyonu bitkinin klorofil üretimini engellemiştir (Smith ve Beyrl, 1993a).

Mikorizal fungustan, heterotrofik bitkiye çözülmüş karbonhidratların aktarımı şu çalışmayla desteklenmiştir: Çalışmada işaretli glikoz, *Mycena mondicola* miselyumundan *Gastrodia elata* fidelerine ilerlemiş ve işaretli glikoz daha sonra bitkinin meristematik dokularında görülmüştür (Lan vd., 1996; Rasmussen, 2002). Ayrıca mikorizal enfeksiyonun, hem karasal türlerde hem de epifitik türlerde, enfekte olmayan kontrol bitkilerine oranla bünyelerinde daha fazla su içeriğine sahip olmalarından dolayı, su alımını artırdığı düşünülmektedir (Yoder vd., 2000).

Bazı hormonlar da tohum çimlenmesini uyarıcı niteliktedir; etilen, oksinler ve sitokinin, bazı orkide mikobiyotları tarafından üretilirler ve in vitro ortamlara eklendiğinde bazı tohumlar için uyarıcıdır (Miyoshi ve Mii, 1995; Rasmussen, 2002).

Orkideler ile ilişkili *Rhizoctonia* endofitleri , bitki kalıntılarının parçalanmasını sağlayan bir dizi karbohidrat parçalayıcı enzim üretir (Rasmussen, 1995). *Ceratorhiza* ile ilişkilendirilen *Rhizoctonia* suşları, lignin parçalanmasında aktif rol alan polifenol oksidazlar üretir (Zelmer vd., 1996; Rasmussen 2002). Orkide dokularındaki hifal penetrasyonun kontrolü, genel olarak fitoaleksinin üretimine dayandırılmaktadır, yakın zamandaki bir çalışmada fitoaleksinin olan orchinol orkide protokormlarında belirlenmiştir (Beyrl vd., 1995; Rasmussen, 2002). Orkide dokularının funguslar tarafından enfekte edilmesi ve dokuların zarar görmesi fitoaleksinin üretimini uyarır (Reinecke, 1994).

2.4. Küresel İklim Değişikliğinin Orkide Popülasyonlarına Etkileri

Küresel iklim değişikliği de orkide habitatlarında ekolojik ve fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır (Solomon vd., 2010). İklim değişikliğinin orkideler üzerindeki olası etkilerini tahmin etmek zordur ve bazı ekosistemlerin iklim değişikliğine karşı diğerlerine göre daha savunmasız olması muhtemeldir. Tropikal dağlardaki orkide kolonilerinin sıcaklıkla kuvvetli bir şekilde kontrol edildiği düşünülmektedir (Primack ve Corlett, 2005). Bazı tropikal ormanların kademeli olarak değişmesi beklenmektedir. Yarı kurak bitki örtüsü, kurak bitki örtüsüne değişme eğilimindedir (Solomon vd., 2010). Atmosferik sıcaklıkların artması, bitki örtüsünün kademeli olarak dağ eteklerinden yukarı doğru hareket etmesiyle sonuçlanabilir, bu da ovalarda yetişen orkide türlerinin yukarı doğru göç etmesine ve en yüksek bölgelerdeki

orkide türlerinin yok olmasına neden olabilir (Foster, 2001). Bazı orkide popülasyonları iklimsel ısınmaya karşı daha savunmasız olabilir (Liu vd., 2010). Orman kanopilerindeki orkideler kuraklığa karşı son derece hassas olabilir (Benzing, 2004) veya dolaylı olarak da etkilenebilirler. Işık, beslenme ve nemdeki değişiklikler de orkideleri etkileyebilirken iklim değişikliği orkidelerin tozlaşma ağları için önemli bir tehdittir (Pemberton, 2010). Avrupa karasal orkidelerinin sayıları, son 30 yılda azalmaya devam etmiştir (Seaton vd., 2010).

Orkideler çok sayıda ve yaygın olmakla birlikte, birçoğunun yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olduğu bilinmektedir. Birçok orkide, doğal olarak nadirdir ve sınırlı alanlarda yerleşirler. Fakat bu alanlarda barınmaları çeşitli sebeplerle engellenmiştir. *Mexipedium kserophyticum*, bilinen tek lokalitesinde yangınlar tarafından yok edilmiştir. Bir dağda bulunan *Phalaenopsis javanica* kolonisi keşfini takiben, bir bahçıvan tarafından toplanmasıyla bölgede yokolmuştur (Comber, 1990).

Tüm orkideler küresel ısınmaya aynı şekilde tepki göstermeyecek ve bazıları gelecekteki değişikliklerle baş edebilmek için daha iyi adapte olacaktır. *Paphiopedilum* ve *Cypripedium*'a ait türlerin karşılaştırılması, farklı fizyolojik adaptasyonlar ve hayatta kalma stratejilerine sahip olduklarını ortaya koymaktadır (Seaton vd.,2010). Örneğin; yaprak dökmeyen *Paphiopedilum*, daha az fotosentez ve büyüme oranıyla daha düşük kaynak ortamlarına adapte olurken, yaprak döken *Cypripedium* türleri daha yüksek fotosentez oranlarına sahiptir ve aktif dönemde daha hızlı büyüme gösterir. Ayrıca karasal türler, epifitik türlere göre yangına daha dirençli görünmektedir (Seaton vd.,2010). Yumruları toplanan orkidelerin bu tahribattan kaçmak için mezarlıklara sığındığı görülmektedir. 474 mezarlık üzerinde yapılan çalışma da 313 mezarlıkta yumrulu orkide tesbit edilmiştir. Mezarlıklarda tesbit edilen türlerin ise çiçeklenme dönemlerinin erken oluşunun bu sığınmada etkili olduğu düşünülmektedir (Löki vd., 2015).

2.5. Koruma Çalışmaları

Orkidelerin çeşitli amaçlarla aşırı toplanması, habitatlarının yok edilmesi bu bitkileri, giderek artan şiddette tehdit altına almaktadır. Çok ciddi önlemler alınmadığı takdirde özellikle Türkiye orkidelerinin birçoğu tamamen yok olabilecektir. Bu ciddi tehdiye karşı çeşitli önlemler alınmalıdır. Milli parklar, botanik bahçeleri, tohum bankaları tam olarak değilse bile gen kaynaklarının sürdürülebilir bir şekilde korunması açısından önemli ve olumlu adımlardır. Bu bağlamda dünya çapında 2500'ün üzerinde (http://www.bgci.org/garden_search.php) botanik bahçesi, tüm kıtalarda etkili bitki koruma sağlamaktadır. Uluslararası Botanik

Bahçeleri Koruma sitesinden (http://www.bgci.org/garden_search.php) elde edilen veritabanına göre, dünya çapında botanik bahçeleri tarafından yürütülen bilimsel aktiviteler yelpazesinde tohumla ilgili çalışmalar tüm çalışmaların %3'ünü, taksonomi çalışmaları ise %24' ünü oluşturmaktadır (Swarts ve Dixon, 2009). Bilimsel otoriteler göz önüne alındığında, botanik bahçeleri, nesli tükenmekte olan türlerde uluslararası ticareti yavaşlatan veya engelleyen, Tehdit Altındaki Türler Uluslararası Ticaret Sözleşmesi'ne (CITES) yardımcı olabilir (Swarts ve Dixon, 2009).

Botanik bahçeleri, 25.000 orkide taksonunun tahmini %25'ine sahiptir ve bu şekilde orkidelerin canlı koleksiyonlarını barındırmaktadır (Swarts ve Dixon, 2009). Botanik bahçeleri sadece var olan bitki türlerinin rezervlerini korumaktadır, habitatların doğrudan zarar görmesini ve küresel iklim değişikliğinin etkisini azaltmak için yeterli değildir. Dolayısıyla gen kaynaklarının korunması yönünde daha ciddi adımların atılması gerekmektedir.

Orkidelerin toz benzeri tohumları, türlerinin korunması için olağanüstü fırsatlar sağlar. Tek bir kapsül, binlerce tohum içerebilir ve bu da bir türe ait tohumların bir tohum bankasında saklanabilmesi için etkili bir yoldur. Orchidaceae, üzerinde en fazla araştırma yapılan bitki familyalarından biri ve yüksek ekonomik öneme sahip olmasına rağmen, Türkiye'de orkide tohum bankası yoktur.



Şekil 2.2. Halk tarafından toplanan orkide yumruları

Şuana dek yapılan çalışmalar, standart tohum depolama koşullarına bir dizi cevap vermektedir. Orkide tohum bankası çalışmalarında, üzerinde çalıştıkları bazı türlerin (*Dactylorhiza*, *Dendrobium*, *Eulophia* ve *Paphiopedilum* spp.) -70 °C'de canlılığını koruduğu

görülmüştür (Swarts ve Dixon, 2009). Bazı orkide türlerinde, uzun süreler için sıfır altı sıcaklıklarda depolama, çimlenme kabiliyetinde bir artışa yol açabilir (Swarts ve Dixon, 2009). Bu nedenle, bir orkide tohumu için depolama programına başlamadan önce, depolanacak tohumun uzun ömürlülüğünü için uygun tohum neminin ve sıcaklığının belirlenmesi gerekmektedir. Güneybatı Avustralya küresel biyoçeşitlilik noktasında, Kings Park Botanik Bahçesi, Millenium Tohum Bankası (MSB) tarafından finanse edilen bir programla, orkide tohumlarının korunmasında dünya çapında bir ilke imza atmaya yakındır (Swarts ve Dixon, 2009). Bu program, güneybatı Avustralya biyoçeşitlilik noktasında bulunan 408 karasal orkide türünün dörtte üçünün tohumlarını depolayarak gerekli mikorizal simbiyotları sağlamıştır (Swarts ve Dixon, 2009).

Tüm bu çalışmalar neticesinde doğal ortamında çimlenme ve fide gelişimi uygun fungus ile simbiyotik ilişkiye bağımlı olduğu gerekçesiyle simbiyotik kültürde üretilen fidelerin toprağa adaptasyonu nispeten daha kolay olduğu görülmüştür. Doku kültürü, asimbiyotik ve simbiyotik çimlendirme çalışmaları ile elde edilen fidelerin doğal ortamlarına transfer edilmesi denenmiş fakat özellikle asimbiyotik kültürde üretilen fidelerin toprağa adaptasyonunda başarı elde edilememiştir. Bu sebeple simbiyotik kültür çalışmaları tercih edilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Bitki Örneklerinin Toplanması ve Teşhislerinin Yapılması

Bu araştırmada kullanılan orkide türünün teşhisi Flora of Turkey (Davis, 1984)'e göre yapılmıştır. Buna göre; *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora*, parçalı olmayan, ovat yumruları olan çok yıllık bitkidir. Yapraklar lanseolat, dışa doğru katlanmış, mavimsi yeşil renktedir. Çiçek durumu 2-3 çiçekli başak şeklindedir. Çiçekler zigomorfik ve çok çeşitli renklerdedir. Çoğunlukla çiçekleri aşan boyda kırmızımsı mor, lanseolat brakteler mevcuttur. Periant 2 halkadan oluşur; 3 benzer parçadan oluşan dış halkada sepaller ve iki eşit parçaya sahip iç halkada ise petaller ile birlikte eşit olmayan bir labellum mevcuttur. Sepaller petallerle beraber 20-26 mm boyda bir miğfer meydana getirmiş, uçta sivrilmiş, kırmızıdan morumsu kırmızıya kadar olan renklerdedir. Labellum spursuz, 3 lobludur. Bazalda bölünmüş bir hipokil ve distal bir epikil bulunur. Hipokil geniş, epikil ise dil benzeri, aşağıya doğru, koyu mor, kahverengimsi veya kırmızımsıdır. Kolumnada 3-6 mm uzunluğunda bir gaga bulunur. Polinyum, bir kese içinde, tek bir viskidyuma bağlıdır. Ovaryum; fusiform şeklinde, sapsız, bükülmüştür. *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora*; makilerde, çayırlarda, ıslak yerlerde, yol kenarlarında ve harebelerde 300-1000 metre arasında görülmektedir (Davis, 1984). Çiçeklenme mart ayı ortası - mayıs ayı gibi gerçekleşir (Sezik, 1984).

Bu karakteristik özellikleri gösteren tam bir bitki örneği alınıp herbaryum örneği olarak hazırlanmış ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü herbaryumunda saklanmıştır.

Fungus izolasyonları yapmak üzere *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* türüne ait bireylerin kökleri şubat ayında vejetatif kısımların toprak üstünde görülmesinden, köklerin tamamen kuruduğu haziran ayına dek doğal habitatlarından yumru ve toprak üstü kısımlarına zarar vermeden alınmış ve hemen laboratuvara getirilerek izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2 Tohumların Toplanması ve Simbiyotik Çimlendirme Deneylerinde Kullanılması

Meyve olgunlaşma döneminde araştırma alanından kapsüller alınıp kağıt zarflara konularak laboratuvara getirilmiştir. Kapsüller açılıp tohumlar ayrılmış ve bir hafta oda sıcaklığında neminin uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra içinde CaCl_2 paketleri bulunan kahverengi şişelere konularak kullanıncaya kadar buzdolabında (4°C) saklanmıştır.

3.3. Araştırmada Kullanılan Kültür Ortamları

3.3.1. Fungus izolasyon ortamı

Orkide köklerinden mikorhizal fungusların izolasyonu için kullanılan besin ortamı Clements vd. (1986) göre hazırlanmıştır.

Besin ortamlarının içeriği ise şu şekildedir;

Çizelge 3.1. Fungus izolasyon ortamı

	Miktar (gr)
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0.5 gr
KH PO ₄	0.2 gr
KCl	0.1 gr
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0.1 gr
Yeast Eksrakt	0.1 gr
Sükroz	5 gr
Agar (HIMEDIA GRM026-500G)	10 gr
Distile su	1000 ml

Besin ortamı hazırlanan şişeye 300 ml su koyulmuştur ve tartılan her bir örnek tartımdan sonra tamamen çözünene dek karıştırılmıştır. Son olarak yeast ekstrakt koyulduktan sonra çözeltinin hacmi 1000 ml ye tamamlanmıştır. pH metreyle (WTW Ph 315i, Eksper) pH' sı 5.8'e ayarlandı. Bu işlem sırasında 0.5M'lık NaOH, pH ayarlamak için kullanıldı. Sonrasında sükroz (Bioshop) ve agar (HIMEDIA) sırayla tartılarak aynı hassasiyetle çözeltiye eklenmiştir. Daha sonra 1.5 Atm basınçta 121°C'de 30 dakika süreyle otoklavda (NUVE L60)steril edilmiştir. Yaklaşık 50 °C sıcaklığa düştüğünde alkolle silinip 15 dakika UV işığa maruz bırakılarak steril edilen kabinde (NUVE LN90) steril petrilere (ISOLAB 90/17mm) aktarılmıştır.

İzole edilen fungusların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için aşağıdaki kültür ortamları hazırlanmıştır.

3.3.2. Patates dekstroz ortamı

Çizelge 3.2. Patates dekstroz agar ortamı içeriği

	Miktar (<i>gr</i>)
PDA (HIMEDIA M403-500G)	39 gr
Distile su	1000 ml

Besin ortamı hazırlanan 1000ml'lik erlene 300 ml su koyulmuştur. Tartılan stok PDA'dan 39 gr tartıldı 1000 ml ye tamamlanan besin çözeltisi, daha sonra 1.5 Atm basınçta 30 dakika süreyle steril edildi ve steril kabinde steril petrilere dökülmüştür.

3.3.3. Su agarı ortamı

Çizelge 3.3. Su agarı ortamı içeriği

	Miktar (<i>gr</i>)
Agar (HIMEDIA GRM026-500G)	10 gr
Distile su	1000 ml

Su agarı ortamı tabloda belirtilen miktarda agar tartılıp 1000mL saf su içine aktarılıp otoklavda steril edilerek hazırlanmıştır.

3.3.4. 'Safranin O' ve 'lactofenol cotton blue' boya çözeltisi

Çizelge 3.4. 'Safranin O' boya çözeltisi içeriği

	Miktar (<i>gr</i>)
Safranin O	0.05 gr
Distile su	100 ml

'Safranin O' çekirdek boyaması için kullanılan boya çözeltisidir. 'Lactofenol cotton blue' ise, fungus boyaması için yaygın olarak kullanılan boya çözeltisidir. %70'lik alkol damlatılan ortama fungal preparat yerleştirilip ve üzerine 'lactofenol cotton blue' çözeltisi 2 damla olacak şekilde damlatılıp ve lamel preparat üzerine kapatılmıştır (Leck, 1999).

Çizelge 3.5. 'Lactofenol cotton blue' boya çözeltisi

	Miktar (<i>ml</i>)
Alkol (% 70)	1 <i>ml</i>
Lactofenol cotton blue	2 <i>ml</i>

3.3.5. Tohum çimlendirme ortamı

Tohum çimlendirme ortamı olarak Clements vd. (1986)'nin modifiye yulaf ortamı kullanılmıştır. Bu kültür ortamının içeriği Çizelge 3.6'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Modifiye simbiyotik yulaf ortamı

	Miktar (<i>gr</i>)
Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	0.2 <i>gr</i>
KH ₂ PO ₄	0.2 <i>gr</i>
KCl	0.1 <i>gr</i>
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0.1 <i>gr</i>
Yeast Eksrakt	0.1 <i>gr</i>
Sükroz	2 <i>gr</i>
Agar	10 <i>gr</i>
Distile su	1000 <i>ml</i>

Dereceli silindir içine bir miktar su konup içine Çizelge 3.6.'deki kimyasal maddeler (agar ve sukroz hariç) verilen miktarda tek tek çözdürülerek eklenmiş, daha sonra son hacim 1 litreye tamamlanıp pH 5.8'e ayarlandıktan sonra sukroz ve agar eklenip otoklavda 15 dakika steril edilmiştir. Bu kültür ortamı simbiyotik kültür tüplerine eşit miktarda dağıtılıp tüplerin ağızları iki kat alüminyum folyo ile sıkıca kapatıldıktan sonra tekrar aynı koşullarda otoklavda steril edilmiştir. Steril edilen tüplerdeki besiyerinin yatık olarak katılaşması sağlanmıştır.

3.3.6. Farklı karbon kaynakları içeren simbiyotik besin ortamları

Tohum çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine farklı karbon kaynaklarının etkisini belirlemek üzere, modifiye yulaf ortamına sabit konsantrasyonlarda (2 gr/L) sükroz, ksiloz, selüloz, maltoz eklenmiş, kontrol grubu olarak ise hiçbir şekerin kullanılmadığı besin ortamı hazırlanmıştır.

3.4 Fungusların Köklerden İzolasyonu

Serapias vomeraceae subsp. *laxiflora* bireylerine ait kök örnekleri laboratuvara getirilip önce musluk suyu altında yıkanıp toprak kalıntılarından temizlenmiş, her kökten, fungus enfeksiyonu olup olmadığını belirlemek için birkaç kesit alınarak mikroskopta incelenmiş, canlı hif yumakları bulunan kökler fungus izolasyonu için kullanılmıştır.

Kök parçaları %1.5'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit) çözeltisinde 2-3 dakika steril edilip ardından steril kabin içinde steril saf su ile üç kez yıkanarak NaOCl uzaklaştırılmıştır. Kök parçalarından steril petri kaplarında ince kesitler alınmıştır. Kök kesitleri, içinde fungus izolasyon ortamı bulunan petri kaplarına konmuş ve 25 °C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. Besiyerine doğru fungus hifleri büyümeye başlayınca, hifal zonun uç kısımlarından tekrar parça alınıp saflaştırılmıştır. Fungusların uzun süreli saklanması için, içinde fungus izolasyon ortamı bulunan stok kültür tüplerine aşılama yapıp iklim odasında büyümeye bırakılmış, fungus hifleri tüpleri tamamen kaplayınca buz dolabına alınmıştır. Elde edilen fungusların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için PDA ve su agarı ortamlarına ekimi yapılmıştır.

3.5. Fungusların Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.5.1. Çekirdek sayılarının belirlenmesi

Safranin O, fungusların çekirdek sayılarını belirlemek üzere kullanılmıştır. Saf olarak izole edilen funguslar, içerisine steril lamel bırakılmış olan, lamelli su agar ortamına aktarılmış ve gelişmeye bırakılmıştır. 8 ila 16 gün süre inkübe edilmiş, hifler lamel üzerinde geliştikten sonra lamel üzerine safranin O-KOH-gliserin damlatılmıştır. Bu lameller lam üzerine kapatılıp hafifçe alevden geçirilerek sabitlenmiştir. Etrafı ise şeffaf bir kapatıcı ile kapatılıp yarı kalıcı preparat haline getirilmiştir. Hazırlanan bu preparatlar, (Leica DM500) mikroskobunda, çekirdek sayılarının belirlenmesi, hif çaplarının ölçümleri, monolioid hücrelerin en-boylarının ölçümleri için incelenmiş ve her özellik için fotoğrafları çekilmiştir.

3.6. Simbiyotik Besin Ortamlarına Tohumların Ekilmesi ve Fungusun Aşılması

Tohumlar kültür ortamına ekilmeden önce steril edilmiştir.

Sterilizasyon işlemi;

Kurutma kağıtları arasına bir miktar tohum konup paketler hazırlanmış ve tohumların sterilizasyon esnasında dökülmemesi için paketler dikilmiştir.

Steril hava kabininde, tohum paketleri, içinde %1.5'lik NaOCl çözeltisi ve bir damla tween 80 bulunan kavanozda 15 dakika steril edildikten sonra iki kez steril saf su içinde çalkalanarak çamaşır suyunun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Tohum paketleri steril bir cam petri içerisine alınıp açılmış ve yine steril bir öze ucu ile bir miktar tohum simbiyotik besin ortamı tüplerine ekilmiştir. Tohum ekildikten sonra tüplerin ağız kısmı ve alüminyum folyo kapak aleve tutularak steril edilmiştir. Karanlıkta, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de bir hafta kadar inkübasyona bırakıldıktan sonra saf olarak geliştirilen funguslar her üç tüpe farklı bir fungal izolat olacak şekilde ekilmiştir. Her bir fungal izolat ile üç bağımsız deney ve 3 tekrarlı olmak üzere deney setleri hazırlanmıştır. Bütün simbiyotik deney serileri üç ay süre ile iklimlendirme odasında 16: 8 saat fotoperiyotta inkübe edilip çimlenme ve fide gelişimleri takip edilmiş, gerekli sayım ve değerlendirmeler yapılmıştır.

Deney süresi sonunda her deney tüpü binoküler mikroskop altında incelenmiş ve sayım yapılmıştır. Sonuçlarda öncelikle yüzde çimlenme oranları (% çimlenme= Bir tüpte çimlenen tohum sayısı/ tüpteki toplam tohum sayısı x100) belirlenip sonrasında ise bir istatistik programı (SPSS: Statistical Pack age for the Social Sciences) kullanarak çimlenmeler arasında önemli bir farklılık olup olmadığı belirlenmiştir.

3.7 Simbiyotik Kültür Ortamında Gelişen Fidelerin Sera Ortamına Aktarılması

Svl 22 kodlu izolat ile aşılanan tüplerde gelişen fideler, içeriğinde toprak ve perlit bulunan saksılara aktarılmıştır. Simbiyotik kültürlerde gelişen fideler kökleri hafif su ile muamele edildikten sonra saksı ortamına alınmıştır.

3.8 Gelişen Fidelerin Farklı Karbon Kaynakları İçeren Saksı Ortamına Aktarılması

Daha önce fungusu sabit tutularak farklı karbon kaynaklarında çimlendirilen ve gelişen fideler 8' er adet fide olmak üzere aynı içerikli saksı ortamına alınmıştır. Her bir saksıya fidenin alındığı kültür ortamında bulunan karbon kaynağı eklenmiştir. Simbiyotik koşullarda gelişen fidelerdeki gelişimler incelenmiştir. Toprak ortamlarda ise cocopit, toprak ve fungus sabit tutulurken; sükröz, ksiloz, selüloz, maltoz (2 'şer gram olacak şekilde) ayrı saksılara eklenerek toprakla harmanlanmıştır, kontrol grubu olarak ise hiçbir şekerin kullanılmadığı toprak ortamı kullanılmıştır. Fideler iklimlendirme odasında 20-30 gün kalmıştır. Ve saksılar güneşli olmak üzere dinlendirilmiş musluk suyu ile sulanmıştır. Saksılardaki (Şekil 4.5) fidelerde birbirinden farkı çok belirgin olmayan gelişme görülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. Fungus İzolasyonu

Serapias vomeracea subsp. *laxiflora* türüne (Şekil 4.3.a) ait köklerden yapılan aylık izolasyonlarda endofitik funguslar izole edilmiştir. Kökün farklı kısımlarından alınan kesitlerde, endofitik fungus hifleri kök hücrelerinin bazı kısımlarında sindirilmiş hif yumakları halinde iken bazı kısımlarında ise birkaç korteks hücresinde aktif fungus hifleri görülmüştür (Şekil 4.3.f)

Elde edilen izolatlardan gelişen saf fungus kültürlerinin mikroskopik incelemeleri sonucu moniloid oluşturduğu, hif yapılarının 90° açı ile dallanma gösterdiği, dallanma noktasında bir daralma ve dallanan hif üzerindeki septum belirlenmiştir. Elde edilen izolatların karakteristik hif ve moniloid yapısı, *Rhizoctonia* benzeri funguslar olduğunu ortaya koymaktadır. Bu fungusların izole edildikleri ay, koloni tipi ve rengi, hif çapı ve çekirdek tipi Çizelge 4.1 'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. İzolasyon döneminde elde edilen fungal izolatların morfolojik özellikleri

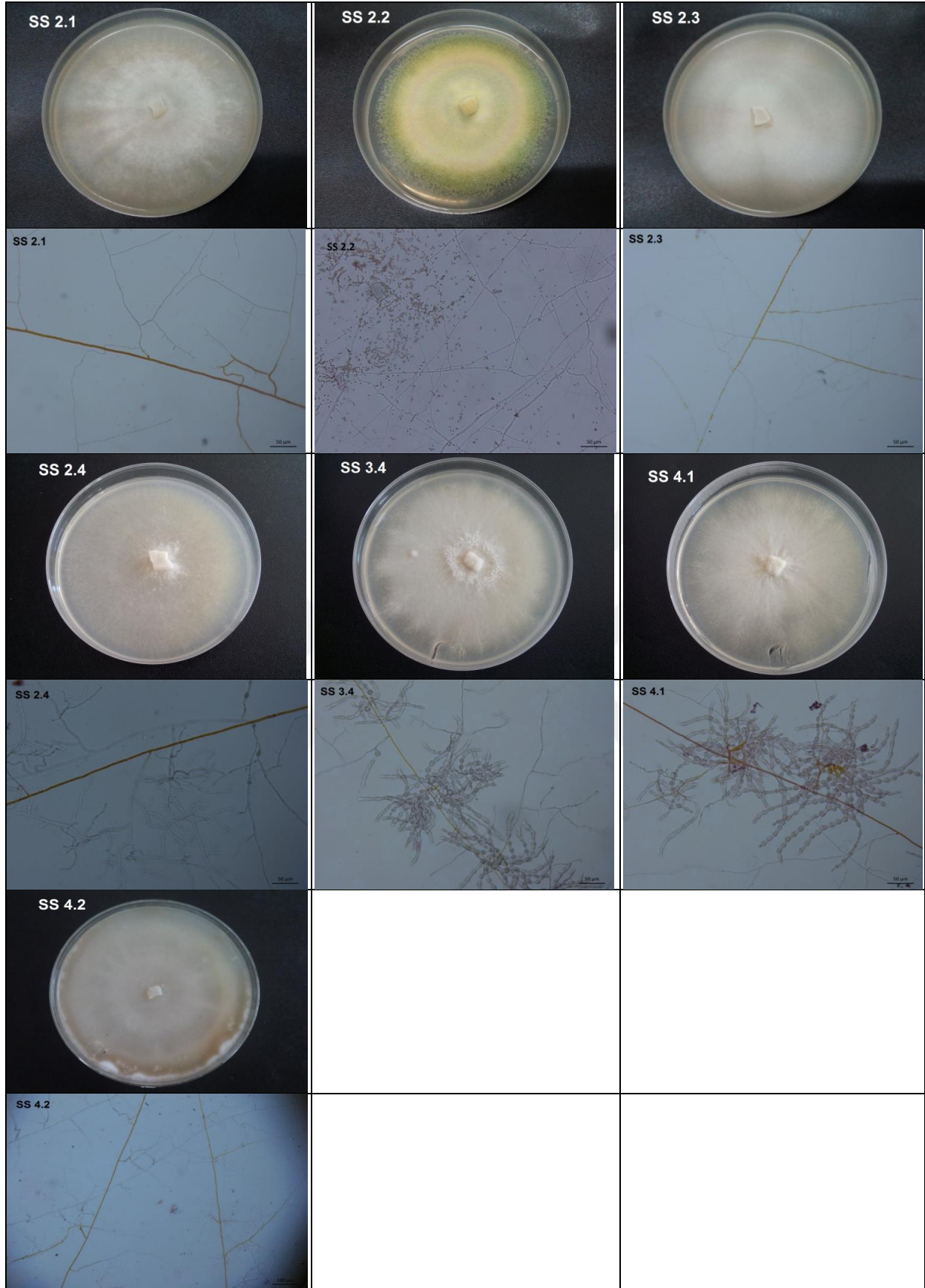
İzolat No	Aylar	Koloni Tipi	Koloni Rengi	Çekirdek tipi	Hif Genişliği (µm)
SS 2.1 (svl 19)	Şubat	Pudramsı Hif	Sarı Beyaz Grup 158 A	Binükleat	4,0251
SS 2.2 (svl 20)	Şubat	Pudramsı Hif	Grimsi Sarı grup 160 C	Binükleat	4.4576
SS 2.3 (svl 21)	Şubat	Pudramsı Hif	Grimsi Sarı Grup 161 A	Binükleat	2,7477
SS 2.4 (svl 22)	Şubat	Pudramsı Hif	Grimsi Sarı Grup 161 A	Binükleat	3,4307
SS 3.4 (svl 29)	Mart	Pudramsı Hif	Sarı Beyaz Grup 158 D	Binükleat	3,5386
SS 4.1 (svl 30)	Nisan	Pudramsı Hif	Grimsi Sarı Grup 160 C	Binükleat	3,1062
SS 4.2 (svl 31)	Nisan	Pudramsı Hif	Grimsi Sarı Grup 160 C	Binükleat	3,4524

4.2. Fungusların renk skalasına ve hif yapısına göre gruplanması

Çizelgede belirtilen izolasyon dönemlerinde toplam 7 fungal izolat elde edilmiştir. Bu izolatların morfolojik değerlendirmeleri sonucunda beyaz sarı grup ve grimsi sarı grup olmak üzere 2 grup belirlenmiştir. PDA ortamında gelişmeye bırakılan saf fungus izolatları, ürettikleri pigmentlere göre petri altı görüntüleriyle (Şekil 4.1) renk skalasına (Olaya ve Abawi,

1994) göre gruplandırılmıştır. Ayrıca fungusların sahip oldukları hiflerin; pudramsı olması, havai olması, besiyerine batık olması gibi özellikler de yine morfolojik ayırimda kullanılmıştır.





Şekil 4.1. İzole edilen fungusların petri ve hif görüntüleri (2016)

Şubat ayında köklerden 4 fungus izole edilmiştir;

SS 2.1 (svl 19) kodlu fungal izolatin genel petri görüntüsünde hifler pudramsı sarı-beyazdır. Hücre çekirdekleri binükleat olarak tesbit edilmiştir. Mikroskopik hif görüntüsünde ise hifal dallanmaların 90° dik açı olduğu görülmüştür. Dallanan hif üzerindeki septum belirlenmiştir Şubat ayı içerisinde izole edilen diğer izolatlar SS2.3 (svl 21) ve SS2.4(svl 22), grimsi-sarı renktedir ve benzer hif morfolojileri görülmüş olmasına rağmen hif çapları farklılık göstermiştir (Şekil 4.1). SS 2.2 (svl 20)'de ise, yukarıda belirtilen (dallanmaların 90° dik olma durumu, moniloid oluşumu, dallanan hif üzerinde septum) *Rhizoctonia* benzeri özellikler görülmemiştir (Şekil 4.1).

Mart ayında köklerden 1 fungus izole edilmiştir;

SS 3.4(svl 29) kodlu izolatin genel petri görüntüsünde hifler pudramsı sarı-beyaz renktedir. Mikroskopik hif görüntüsünde hifal dallanmaların 90° açı oluşturduğu görülmüştür. Hücre çekirdekleri binükleat olarak tesbit edilmiştir. İzolatin mikroskop çekimlerinde şişkin moniloidler görülmüştür (Şekil 4.1).

Nisan ayında köklerden 2 fungus izole edilmiştir;

SS 4.1 (svl 30) ve SS 4.2 (SVL 31) kodlu izolatların genel petri görüntüsünde hifler pudramsı grimsi-sarı renktedir. Hücre çekirdekleri binükleat olarak tesbit edilmiştir. Mikroskopik hif görüntüsünde ise hifal dallanmaların 90°dik açı olduğu görülmüştür. Ayrıca şişkin moniloidler SS 4.1 (svl 30)'da görülmüştür (Şekil 4.1).

Mayıs ve haziran aylarında fungus izole edilememiştir.

4.3. Mikorizal fungusların tohum çimlenmesine etkisi

Şubat ayında vejetatif kısımların toprak üstünde görülmesinden, köklerin tamamen kuruduğu haziran ayına dek yapılan izolasyonlarda elde edilen fungal izolatlar, uygun şekilde tohumların bulunduğu tüplerdeki kültür ortamlarına aşıl原因mıştır. 10-14 gün süre sonrasında tohum kabuğu çatlamış ve protokorm oluşumu görülmüştür. 45-60 gün sonunda ise çimlenen tohumlar fide aşamasına ulaşmıştır (Şekil 4.3.e). Fungal izolatlarla bağlı olarak çimlenen tohumlarda en yüksek çimlenme oranları sırasıyla Svl 22, Svl 30, Svl 29, Svl 21, Svl 31 ve svl 19 kodlu fungal izolatlarda görülmüştür. *Rhizoctonia* dışı olan Svl 20 kodlu izolat ise çimlenmeyi teşvik etmemiştir.

Protokormlardan enine kesit alınıp aşılanan fungusun tohuma girip girmediği kontrol edilmiş ve protokormda korteks hücrelerinde fungal yumakların olduğu görülmüştür (Şekil4.3.d)

Çizelge 4.2. Elde edilen mikorizal fungusların tohum çimlenmesine etkileri

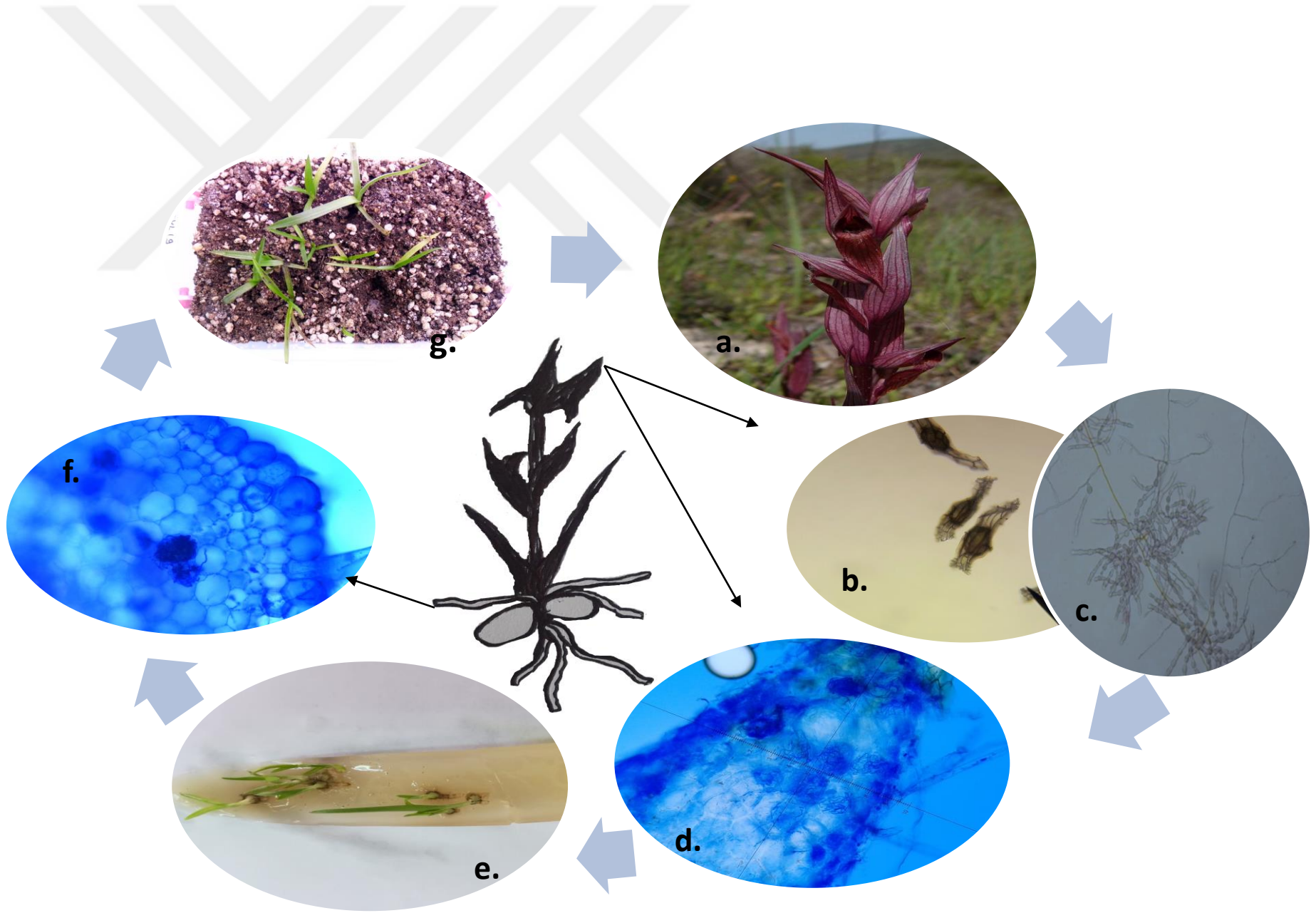
Fungus (2016)	Çimlenme(%)
Kontrol	00,00±00,00 b
Svl 19	23,33±6,38 a*
Svl 20	00,00±00,00 b
Svl 21	25,56±4,45 a*
Svl 22	32,95±17,73a*
Svl 29	30,71±6,26 a*
Svl 30	31,99±10,93 a*
Svl 31	24,08±14,06 a*
Önemlilik	(p<0.05)

4.4. Simbiyotik kültürde elde edilen fidelerin toprağa aktarılması

Simbiyotik kültürde gelişen fideler önce içinde toprak karışımı bulunan saksılara dikilmiş toprağa adaptasyonu sağlandıktan sonra seraya aktarılmıştır. Seraya Svl 22 kodlu izolat ile aşılanan fideler aktarılmıştır. Şekilde de görüldüğü gibi serada iyi bir gelişme gösteren fidelerde ilk yumrular yaklaşık 8 ay sonra oluşmuştur (Şekil 4.2a).



Şekil 4.2. Seraya aktarıldıktan 8 ay sonra gelişen yumrulu fide (a,b)








Şekil 4.3. *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* fidelerinin yaşam döngüsü; simbiyotik etkileşim için tohumların (b) uygun fungusla (c) infekte olması, protokorm gelişimi ve protokormda aktif endofitler (d), simbiyotik kültür ortamında gelişen fideler (e), fidelerin köklerinde fungal endofitler (f) fidelerin seraya aktarılması (g), doğal ortamında yaşama adapte olmuş çiçeklenme döneminde erişkin orkide fidesi (a)

4.5. Orkide tohumlarının çimlenmesinde farklı karbon kaynaklarının etkisi

Önceki çalışmalarda belirlenen ve gelişimi en iyi desteklediği tesbit edilen SVL 22 kodlu izolat tüm tüplerde sabit olarak kullanılmıştır. Değişken olarak sükroz ksiloz selüloz ve maltozun, simbiyotik besin ortamlarındaki *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* tohumlarının gelişmesine (Şekil 4.4) etkisindeki istatistiksel anlamlılık (Çizelge 4.3), Duncan testi (Tek yönlü anova SPSS 15) ile tesbit edilmiştir. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi farklı karbon kaynaklarında gelişen fidelerin tamamında klorofil bulunduran ilk yaprak gelişmiştir. Fakat farklı karbon kaynaklarında gelişen fidelerin çimlenme yüzdelerinde ise nispeten istatistiksel fark görülmektedir.

Çizelge 4.3. Modifiye yulaflı simbiyotik ortamında farklı karbon kaynaklarının çimlenme üzerine etkisi

Karbon Kaynağı	Çimlenme(%)
Maltoz	26,08b*
Şekersiz	26,02b*
Seluloz	26,81ab*
Ksiloz	27,91ab*
Sükroz	29,18a*
Önemlilik	(p<0.05)

Farklı karbon kaynaklarına göre simbiyotik ortamlar	Çimlenen tohumlar
Selüloz	
Maltoz	
Ksiloz	
Sükroz	
şekersiz	

Şekil 4.4. Farklı karbon kaynaklarında gelişen fidelerin görüntüleri

Karbon kaynakları	Saksılar
Sükroz	
Maltoz	
Ksiloz	
Selüloz	
şekersiz	

Şekil 4.5. Farklı karbon kaynaklarında gelişen fidelerin saksı ortamındaki gelişmeleri

5. TARTIŞMA

Türkiye karasal orkideler bakımından zengin bir ülkedir. Türkiye’de rizomlu orkideler olarak, *Neottia*, *Limodorum*, *Goodyera*, *Epipogium* ve *Corallorrhiza* cinslerine ait 1’er tür *Cephalanthera*’ ya ait 6 tür, *Epipactis*’e ait 7 tür ve *Listera*’ ya ait 2 tür bulunmaktadır. Yumrulu orkideler olarak *Aceras*, *Barlia*, *Comperia*, *Gymnedinea*, *Neotinea*, *Traunsteinera*, *Anacamptis*, *Coeloglossum*, *Steveniella*, *Spiranthes*, cinslerine ait 1’ er tür, *Orchis* cinsine ait 20 tür, *Serapias* cinsine ait 3 tür, *Dactylorhiza* cinsine ait 9 tür, *Himantoglossum* cinsine ait 2 tür, *Ophrys* cinsine 27 tür, *Platanthera* cinsine ait 2 tür olmak üzere 24 cinse ait 72 tür bulunmaktadır (Davis, 1984). Güner’ in (2012) Türkiye Bitkileri Listesine göre; *Epipactis* cinsine ait 3 yeni tür, *Orchis* cinsine ait 5 yeni tür, *Serapias* cinsine ait 2 yeni tür, *Traunsteinera* cinsine ait 1 yeni tür, *Dactylorhiza* ve *Himantoglossum* cinsine ait 2’şer yeni tür, *Ophrys* cinsine ait 14 yeni tür, *Platanthera*, *Spiranthes* ve *Gennaria* cinslerine ait 1’ er yeni tür listeye eklenmiştir. Güner’e (2012) göre 25 cinse ait 101 tür ülkemizde bulunmaktadır. Hibrit türler ile birlikte toplamda 170 tür mevcuttur.

Yıl içinde ortalama ihracat miktarının 10 ton olduğu, bazen bu rakamın 15 tona ulaşabildiği, yurtiçi kullanım da dahil edildiğinde yıllık salep kullanımının 20 ton olduğu bildirilmiştir. Bir salep yumrusu 0.5 g ağırlığındadır ve bu da salep yapımı için yaklaşık 40 milyon yumrunun doğadan toplandığını göstermektedir. (Sezik, 2002). Salep yapımı amacıyla doğal orkide habitatlarının tahribatı büyüktür. Habitat alanlarının bozulması ve habitat kaybı, orkideler için ana tehditlerden biridir. Bu durum, arazi kullanımındaki değişiklikler, arazilerin terk edilmesi ve ağaçlandırma çalışmaları, artan tarım faaliyetleri, topraktaki suyun drenajı, istilacı türlerin geniş alanlara yayılması gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir (www.eastmedorchids).

Ülkemizde salep elde edilen orkide türlerinin korunması kapsamında oluşturulan hukuksal tedbirler, 1974 yılında salep elde edilen orkide türlerinin ihracının yasaklanması ile başlamıştır. CITES (Nesli Tehlikede Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme) 27 Eylül 1994 tarih ve 4041 sayılı Kanun ile onaylanmış ve 20 Haziran 1996 tarih ve 22672 sayılı Resmi Gazetede yayınlanmıştır.

Türkiye orkide habitatlarının korunması amacıyla yapılan diğer bir girişim Salep Eylem Planı’dır (<https://www.ogm.gov.tr>). Salep Eylem Planı’na göre,

orkideleri tehdit eden unsurlar; ağaç kesim ve nakliyatı, Tarım ve ağaçlandırma, yetiştirme ortamının parçalanması, kentlerin gelişmesi madencilik faaliyetleri, bilinçsiz toplayıcılar, drog ve kozmetik alanlarda kullanımının son yıllarda artmasıdır. Salep Eylem Planı, Salep'in doğal ortamında çoğaltılması, salep fertlerinin fidanlıklarda yetiştirilmesini takiben doğal yayılış alanlarına taşınması, tohum bahçelerinin oluşturulması, toplumun bilinçlendirilmesi gibi amaçlar belirlemiş olsa da 2018 yılı itibarıyla hedeflerine ulaşamamıştır.

Son yıllarda İzmir Menemen Tarımsal Araştırma Enstitüsünün başlattığı orkide yumrularının doğal ortamlarından sökülerek tarla koşullarında kültüre alınması (Tutar, 2012) yönündeki çalışmalar tüm Türkiye'de de yaygınlaşmaya başlamıştır. Birden fazla yumru veren *Serapias vomeraca* ve *Orchis sancta* türleri ile başlayan bu denemeler Türkiye genelinde bütün orkide türlerini kapsar duruma dönüşmüştür. Bu da yakın gelecekte çok ciddi olumsuz sonuçlar doğuracaktır. Yukarıda bahsedilen orkideler dışındaki orkidelerin büyük çoğunluğu tek yumru üretmektedir. Dolayısıyla her yıl doğal alanlardan tekrar tekrar sökülmesi bireylerin kısa zaman içinde tamamen yok olmasına sebep olacaktır. Bütün bu olumsuzluklar toprak koşullarında tohumdan orkide üretiminin başarılabilmesi ile büyük oranda ortadan kalkacaktır.

Bilimsel orkide topluluğu, 10 yıldan uzun bir süre önce *ex situ* koruma tekniklerinin önemini kabul eden bir Koruma Eylem Planı oluşturmuştur (Hågsater ve Dumont, 1996). Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesinde (CBD) tüm taraflarca oybirliğiyle kabul edilen Küresel Bitki Koruma Stratejisi (GSPC) Hedef 8, 2002 yılında kabul edilmiştir (www.bcgi.org/worldwide/gspc/). İlk Uluslararası Orkide Koruma Kongresi'nde (IOCC), 2010 yılında tehdit altındaki orkidelerin % 90'ının güvenli *ex situ* koleksiyonlarda tutulması gerektiğine karar verilmiştir (Dixon ve Phillips, 2007). Bunun yanı sıra botanik bahçeleri ve tohum bankaları da dünya çapında orkidelerin korunması adına büyük öneme sahiptir.

Türkiye'de ise doğa koruma alanları, milli parklar, tabiat parkları var olan orkide habitatlarının korunması adına önemlidir. Fakat orkide tohum bankası çalışmaları için gerekli girişimler çok azdır.

Bu bilgilerden de anlaşılacağı gibi, Türkiye'de orkideler için çok ciddi yok olma tehdidi söz konusudur ve kendi habitatları dışında (*ex situ*) korunması ve

üretimi için acil araştırma ve uygulama çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Laboratuvar şartlarında çok sayıda çimlendirme deneyleri yapıp başarılı sonuçlar alınmış fakat elde edilen fidelerin doğal şartlara adaptasyonu mümkün olamamıştır. Gümüş (2009), *Serapias vomeraceae*'nin tohumlarının asimbiyotik kültür çalışmalarında % 57.65 oranında çimlenme elde etmiş, fakat dış koşullara adaptasyonda tam bir başarı sağlanamamış, bitkiler en fazla birkaç ay içerisinde canlılıklarını yitirmişlerdir.

Bitki topluluklarının simbiyotik birlikler olmadan, çevresel strese karşı hayatta kalamayacağı düşünülmektedir (Otero vd., 2000).

Tohumdan üretilen fidelerin doğal ortamlarına adapte olabilmeleri için en uygun yöntem simbiyotik çimlendirme yöntemi olarak kabul edilmektedir (Kauth vd., 2008).

Bu çalışmada, *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* bireylerinin vejetatif kısımları toprak üstünde görüldüğü aydan (Şubat), köklerin tamamen kuruduğu aya (Haziran) kadar olmak üzere onbeş gün ara ile köklerden fungus izolasyonları sonucu saf olarak elde edilen izolatların morfolojik özelliklerine göre ayrımı yapılmış ve buna göre bir tane *Rhizoctonia* dışı fungusun izole edildiği, diğerlerinin *Rhizoctonia* benzeri olduğu ve bu fungusların binükleat oldukları görülmüştür. Dünyada (Alexander, 1983; Salazar vd., 1999; Rasmussen, 2002; Bonnardeaux, 2007; Kristiansen, 2004) ve Türkiye'de orkide funguslarının belirlenmesine yönelik araştırmalar (Özkoç ve Dalcı, 1992; Özdener, 1994; Sazak ve Özdener, 2006; Kömpe ve Mutlu, 2017) çimlenmeyi teşvik eden fungusların *Rhizoctonia* form cinsine dahil olduğunu göstermiştir. Elde edilen bu fungusların tohum çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkileri belirlenmiş daha sonra elde edilen fideler serada toprağa aktarılmıştır. Fidelerin serada toprak koşullarına adaptasyonu çok başarılı olmuş ve ilk gerçek yumrular elde edilmiştir. Yumru oluşumu ile hem salep üretimi için hem de tahribatı iyileştirme yönünde önemli bir adım atılmış olduğu düşüncesindeyiz.

Araştırmamızda çimlenme için protokorm oluşumu, gelişme içinde klorofil taşıyan ilk gerçek yaprakların oluşması esas alınmıştır. Tohumlar simbiyotik kültürlerle ekildikten bir hafta sonra funguslar eklenmiş ve funguslar ile inokulasyondan bir hafta sonra çimlenme gerçekleşmiş ve protokormlar oluşmuştur. Üç ay sonra ise yaprak ve köklere sahip tam bir fide gelişmiştir. 8 ay sonunda ise

yumrular oluşmaya başlamıştır. *Rhizoctonia* benzeri fungal izolatların hepsi tohum çimlenmesini teşvik etmiş, en yüksek çimlenme oranları sırasıyla Sv1 22, Sv1 30, Sv1 29, Sv1 21, Sv1 31 ve sv1 19 kodlu fungal izolatlarda görülmüştür. *Rhizoctonia* dışı olan Sv1 20 kodlu izolat ise çimlenmeyi teşvik etmemiştir.

Özkoç ve Dalcı (1992)'de *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* tohumlarının simbiyotik kültürde bu orkidenin köklerinden izole edilen fungusların çimlenmeyi teşvik etmezken yurt dışından getirilen *Rhizoctonia* benzeri fungusların çimlenmeyi uyardığını ortaya koymuşlardır. *Dactylorhiza urvilleana* ve *Dactylorhiza iberica* tohumları ile yapılan bir başka araştırmada ise çimlenme ve gelişmesini teşvik eden fungusların *Rhizoctonia* benzeri fungus oldukları, ayrıca çimlenmedeki başarının türler arasında fark gösterdiği görülmüştür (Özdener, 1994). *Ophrys apifera* tohumlarının çimlendirilmesi çalışmasında simbiyotik kültür çalışmaları beklenen sonuca ulaşmamış; 12 aylık deneme süresince çimlenme meydana gelmemiştir. Bu durum, köklerden izole edilen fungusların aynı orkide türünün tohum çimlenmesi üzerinde etkisiz olduğunu ortaya koymaktadır (Aytaç, 1994). *Spiranthes spiralis* ve *Dactylorhiza osmanica* var. *osmanica* tohumlarının çimlendirilmesi çalışmalarında, *S. spiralis* üzerinde bazı izolatların etkisiz olmasına karşın *Rhizoctonia repens*'in çimlenme üzerinde etkili olduğu fakat gelişme üzerine etkili olmadığı tesbit edilmiştir. *D. osmanica* var. *osmanica*'da ise kendi köklerinden izole edilen *Rhizoctonia* benzeri izolatın çimlenmeyi uyarmasına rağmen fide aşamasında patojenik etki yaptığı ve fideleri öldürdüğü tesbit edilmiştir (Sazak ve Özdener, 2006).

Köklerden izole edilen fungusların tohum çimlenmesine etkileri, simbiyotik çimlenme testleri ile belirlenmiştir. *Rhizoctonia* benzeri tüm izolatlar tohum çimlenmesini teşvik ederken *Rhizoctonia* dışı fungusun çimlenmeyi teşvik etmediği belirlenmiştir. Bu konuda farklı araştırma sonuçları dikkati çekmektedir. Şöyle ki, bazı araştırma sonuçlarında orkide köklerinden izole edilen *Rhizoctonia* dışı fungusların daha ziyade mikorizal birlik içinde görev yaptığı, tohumlarla simbiyotik ilişki kurmadığı ifade edilirken (Chutima, 2011) bazı araştırmalarda *Rhizoctonia* dışı izolatların çimlenmeyi teşvik ettiği bildirilmektedir (Sebastián vd., 2014). Vujanovic vd. (2000), *Rhizoctonia* dışında farklı bir fungus olduğu belirlenen (*Fusarium*) bir fungusun *Cypripedium reginae*'nin tohum çimlenmesini uyardığı ve protokorm oluşumunu teşvik ettiği görülmüştür. Fakat Srivastava (2017), *Fusarium*' un,

orkidelerde kök çürümesi (Benyon, 1996) gibi patojen hastalıklara neden olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda *Rhizoctonia* dışında farklı bir fungus olduğu tesbit edilen fungusun ise çimlenmeyi hiçbir şekilde teşvik etmediği görülmüştür. Organik karbon kaynağını (Leake, 1994) mikorizal fungal partnerlerinden sağlayan mikoheterotrofik orkideler yüksek derecede mikorizal özgülüğe sahiptir (Bidartondo, 2005; Merckx vd., 2009; Hynson ve Bruns, 2010).

Çalışmamızda 3 ay boyunca yapılan izolasyonlarda elde edilen fungusların morfolojik özelliklerine göre farklı oldukları belirlenmiştir. *Spiranthes spiralis*'de yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş olup bir yıl boyunca yapılan fungus izolasyonlarında 5 farklı fungusun mikorizal birliğe katıldığı (Özkoç vd., 2013), ve bunların bazılarının çimlenmeyi teşvik ettiği tespit edilmiştir (Özdener vd., 2013).

Monospesifik popülasyonlar daha az sayıda fungal simbiyont bulundururken, simpatrik popülasyonlar daha fazla sayıda mikorizal fungusa sahiptir. Fotosentetik orkideler, fungal simbiyontlar için, besin açısından rekabeti azaltan funguslarla birliktelik oluşturarak daha düşük özgülük sergilerler (Pellegrino vd., 2016). Fungusun sağladığı besin kaynaklarının kalitesi ve bolluğu, fungusun ortamdaki besin elementlerini parçalama kapasitesi gibi durumlar bitkinin fungus tercihlerindeki etmenler olabilir (Rasmussen ve Rasmussen, 2009).

Orkide fideleri tam olarak fotosentetik safhaya geçtiğinde, orkide-fungus ilişkisi her iki tarafın da birbirinden bağımsız olduğu bir duruma (nötralizm) dönüşebilir (Rasmussen ve Rasmussen, 2009). Her orkidenin mikorizal fungusu/fungusları aynı orkidenin tohumlarının çimlenmesini teşvik etmeyebilir (Rasmussen, 2002). Ayrıca mikorizal birliğe katılan funguslar mevsimsel olarak değişebilmektedir (Özkoç vd., 2013; Han vd., 2016). Çalışmamızda bitkinin generatif (üreme) dönemindeki fungus çeşitliliğinin bitkinin vejetatif dönemindeki fungus çeşitliliği ile aynı olmadığı görülmüştür. Şubat ayındaki fungal çeşitlilik mart ve nisan aylarında azalmış, Mayıs ve Haziran aylarında ise köklerdeki fungusların tamamen sindirilmiş olduğu görülmüş ve fungus izole edilememiştir.

Orkide funguslarının karbon kaynağı kullanımındaki farklılıkların, bazı orkidelerin dağılımındaki nedenlerden biri olabileceği düşünülmektedir (Mehra vd., 2017). Önceki çalışmalarda belirlenen ve gelişimi en iyi desteklediği tesbit edilen

SVL 22 kodlu izolat sabit tutularak farklı karbon kaynaklarının protokorm oluşumu ve fide gelişimine etkilerinin incelendiği çalışmamızda, karbon kaynaklarına bağlı olarak çimlenen tohumlarda en yüksek çimlenme oranları sırasıyla sükrozda, ksilozda, selülozda, maltozda, şekersizdedir. Çalışmamızda en iyi gelişme sükrozda görülmüştür. Yapılan bir çalışmada da sükrozun kültür ortamına dahil edilmesi fungus büyümesi için daha iyi koşullar sağlamıştır (Perkins vd., 1995). Başka bir çalışmada ise selülozun çeşitli orkide-fungus ilişkilerinde protokorm gelişimi için mükemmel bir karbon kaynağı olduğunu görülmüştür (Hadley vd., 1969).

Araştırmamızda simbiyotik kültürde elde ettiğimiz fideleri toprağa aktardığımızda başarılı bir fide gelişimi olduğu görülmüştür. Tropikal orkidelerin doku kültürü yoluyla çok miktarda üretilip dünya pazarında ciddi bir pay sahibi olduğu düşünülürse simbiyotik kültürde de karasal orkideler için benzer üretim başarısı elde etmek mümkün olabilir. Bu yöntemin tarımsal üretim yönünde iyileştirilmesi halinde hem salep üretimi için hem de doğal alanlara yumru dikip iyileştirme çalışmaları için yeterli yumru elde etmek mümkün olabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, simbiyotik çimlendirme yöntemi kullanılarak *S. vomeracea* subsp. *laxiflora* türüne ait bireylerden alınan tohumlar başarılı bir şekilde çimlendirilmiştir. Elde edilen *Rhizoctonia* benzeri fungal izolatların tamamı tohum çimlenmesini teşvik etmiştir. Bu fungal izolatlar ile yapılan kültür çalışmasında yüksek çimlenme oranları sırasıyla Sv1 22, Sv1 30, Sv1 29, Sv1 21, Sv1 31 ve sv1 19 kodlu fungal izolatlarda görülmüştür. *Rhizoctonia* dışı olan Sv1 20 kodlu izolat ise çimlenmeyi teşvik etmemiştir. Bu bağlamda *Rhizoctonia* dışı izolatların mikorizal birliğe olabilecek olası katkıları veya zararları araştırılmalı, orkide ile ne gibi ilişkiler kurduğu açığa çıkarılmalıdır.

Elde edilen fideler toprağa aktarılarak tohum ekiminden 8 ay sonra ilk gerçek yumrular oluşmuştur. Sonrasında fidelerin doğaya adaptasyon süreci başlatılmış ve fidelerin doğaya uyum sağladığı tespit edilmiştir. Türkiye’de orkide tohumlarının simbiyotik çimlendirme sonucu gelişen fidelerinin doğaya adaptasyonu üzerine kayda değer bir başarı mevcut değildir. Simbiyotik çimlendirme yöntemi kullanılarak ulaşılan bu başarı, tehdit altındaki tüm orkide türlerine uygulanabilir.

Farklı karbon kaynağı içeren simbiyotik kültür çalışmalarının sonucunda ise sukroz içeren kültür ortamında çimlenme oranının diğer karbon kaynaklarına nispeten daha yüksek olduğu görülmekle birlikte kullanılan bütün karbon kaynaklarının çimlenme ve gelişme üzerine olumlu etki yaptığı görülmüştür.

Tahribatın biyolojik yönden iyileştirilmesi, bozulan biyolojik dengeyi doğal haline uygun olarak yeniden kurabilmekle mümkündür. Bu bağlamda tehdit altındaki bütün orkidelerden simbiyotik yolla yumru elde edilerek, bunların doğal alanlara dikilmesiyle tahribatın etkin bir şekilde iyileştirilmesi mümkün olabilir.

Yalnızca üretim çalışmaları değil aynı zamanda koruma çalışmalarına da gereken önem gösterilmelidir. Orkide tohum, fungus ve polen bankaları kurulmalı, tohumdan üretim çalışmalarına özellikle önem verilmelidir.

Habitat tahribatına karşı, yapılacak imar çalışmalarında alanlarında uzman botanikçiler ile arazinin ekolojik önemi belirlenmeli ve ortaya çıkacak değerlendirmelere göre hareket edilmelidir.

Unutulmamalıdır ki doğal biyoçeşitliliğe gereken önem verilmez ise ülkemiz bu ayırt edici güzellerini sonsuza dek kaybedip, zincirleme bir yokoluş tetiklenecektir. Orkideler için bu yokoluş zinciri; habitatında uyum sağladığı polinatörlere, diğer bitkilere ve simbiyotik ilişki içerisinde olduğu toprak mikroflorasının biyoçeşitliliğine değin uzanacaktır.



KAYNAKLAR

- Alexander, C., and Hadley, G. 1983. Variation in symbiotic activity of *Rhizoctonia* isolates from *Goodyera repens* mycorrhizas. *Transactions of the British Mycological Society*, 80/1, 99-106.
- Anonymous 2014. Project Facts. www.eastmedorchids.org (Erişim tarihi: 25.05.2018)
- Anonymous 2015. Botanic Gardens Conservation International. http://www.bgci.org/garden_search.php (Erişim tarihi: 02.05.2018)
- Anonim 2018. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼. <https://arastirma.tarim.gov.tr/etae> (Erişim tarihi: 15.01.2018)
- Arditti, F.D. 1967. Risk and the required return on equity. *The Journal of Finance*, 22/1, 19-36.
- Arditti, J., Michaud J.D. and Healey, P.L. 1979. Morphometry of orchid seeds. I. *Paphiopedilum* and native California and related species of *Cypripedium*. *American Journal of Botany*, 1128-1137.
- Arditti, J.1992. *Fundamentals of orchid biology*. Wiley, New York.
- Arditti, J. and Ghani, A.K.A. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 146/3, 569-569.
- Aytaç, A. 1994. Bazı *Ophrys* L. (Orchidaeeae) t¼rlerinden simbiyotik fungus izolasyonu ve *Ophrys apifera* Hudson tohumlarının asimbiyotik ve simbiyotik ortamlarda ęimlendirilmesi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstit¼s¼*.
- Benyon, F., Summerell, B. A., and Burgess, L. W. 1996. Association of *Fusarium* species with root rot of *Cymbidium* orchids. *Australasian Plant Pathology*, 25/4, 226-228.
- Bernard, N. 1904. R¼cherches experimentale sur les orchid¼es. *Revue g¼n. Botany*, 16, 405.
- Bernard, N. 1909. L'evolution dans la symbiose. Les orchid¼es et leur champignons commenseux. *Annals Science and nature*, series 9,9,1.
- Beyrle, H.F. and Smith, S.E. 1993. Excessive carbon prevents greening of leaves in mycorrhizal seedlings of the terrestrial orchid *Orchis morio*. *Lindleyana*, 8/2, 97-99

- Beyrle, H. 1995. The role of phytohormones in the function and biology of mycorrhizas. In *Mycorrhiza* 365-390.
- Benzing, D.H. 2004. Vascular epiphytes. *Forest canopies (Second edition)*, Lowman and Rinker, Academic Press, 175-211, Florida.
- Bidartondo, M.I. 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist*, 167/2, 335-352.
- Bonnardeaux, Y., Brundrett, M., Batty, A.L. 2007. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycological Research*, 111, 51–61.
- Brundrett, M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*, 79/3, 473-495.
- Burgeff, H. 1936. Die Wurzelpilze der Orchideen. Ihre Kultur und ihr Leben in der Pflanze. Jena: Gustav Fischer 1909. *Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanzen. Jena.*
- Cameron, D.D., Leake, J.R. and Read, D.J. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid, *Goodyera repens*. *New Phytol* 171/405,416.
- Cameron, D.D., Johnson, I. Read, D.J. and Leake, J.R. 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist*, 180/1, 176-184.
- Carling, D.E., Pope, E.J., Brainard, K.A., and Carter, D.A. 1999. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopathology*, 89/10, 942-946.
- Chung, M.Y., Nason, J.D. and Chung, M. G. 2004. Implications of clonal structure for effective population size and genetic drift in a rare terrestrial orchid, *Cremastra appendiculata*. *Conservation Biology*, 18/6, 1515-1524.
- Chutima, R., Dell, B. and Lumyong, S. 2011. Effects of mycorrhizal fungi on symbiotic seed germination of *Pecteilis susannae* (L.) Rafin (Orchidaceae), a terrestrial orchid in Thailand. *Symbiosis*, 53/3, 149-156.
- Clements, M.A., Muir, H. and Cribb, P.J. 1986. A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bulletin*, 437-445.
- Comber, J.B. 1990. Orchids of java. *Kew: Bentham-Moxon Trust, Royal Botanic Gardens, Kew 407p.col. illus. ISBN, 947643214.*

- Crackles, E. 1975. The monkey orchid in Yorkshire. *Naturalist*, 932, 25-26.
- Cribb, P.J., Kell, S.P., Dixon, K.W. and Barrett, R.L. 2003. Orchid conservation: a global perspective. Orchid conservation. *Natural History Publications, Kota Kinabalu*, 1-24.
- Currah, R.S. Zelmer, C.D. Hambleton, S. and Richardson, K.A. 1997. Fungi from orchid mycorrhizas. *In Orchid Biology*, 117-170.
- Curtis, J.T. 1939. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. *American Journal of Botany* 26, 390.
- Darwin, C. 1862. On the Three remarkable sexual forms of *Catasetum tridentatum*, an Orchid in the possession of the Linnean Society. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 6/24, 151-157.
- Davis, P.H. 1984. *Flora of Turkey and the East Aegan Island*, 8. *Edinburg Univ. Press*
- Dressler, R.L. 1981. The orchids. *Natural History and Classification*. *Harvard Univ. Press: Cambridge, Mass. and London, England*, 332.
- Dijk, E. and Eck, N.D. 1995. Effects of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species. *Canadian Journal of Botany*, 73/8, 1203-1211.
- Dixon, K. and Phillips, R.D. 2007. The orchid conservation challenge. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 7/1-2, 11-12.
- Dunn, R.R., Harris, N.C., Colwell, R.K., Koh, L.P. and Sodhi, N.S. 2009. The sixth mass coextinction: are most endangered species parasites and mutualists. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276/1670, 3037-3045.
- Eken, C., Ercişli S., Eşitken, A., Demirci, E., Yuen, GY. 2005. First report of crown and stem rot of orchid (*Orchis palustris*) caused by *Sclerotinia minor*. *Plant Disease*, 89/8: 913.
- Foster, P. 2001. The potential negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth-Science Reviews*, 55/1-2, 73-106.
- Frank, A.B. 1891. Über die auf Verdauung von Pilzen abziehende Symbiose der mit endotrophen Mykorrhizen begabten Pflanzen, sowie der Leguminosen und Erlen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 9/244–253.
- Hadley, G. 1969. Cellulose as a carbon source for orchid mycorrhiza. *New Phytologist*, 68/4, 933-939.

- Hadley, G. and Purves, S. 1974. Movement of carbon 14 from host to fungus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*, 73, 475–482.
- Hadley, G. 1983. Symbiotic germination of orchid seed. *Orchid Review*, 91, 44-47.
- Han, J.Y., Xiao, H. and Gao, J. 2016. Seasonal dynamics of mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum spicerianum* (Rchb. f) Pfitzer—A critically endangered orchid from China. *Global Ecology and Conservation*, 6, 327-338.
- Hanning, E. 1904. Über die kultur von Cruciferne, Embryonen ausenhalb des Embryosachs. *Botany Ztg*, 62, 45-80.
- Harris, S.A. and Abbott, R.J. 1997. Isozyme analysis of the reported origin of a new hybrid orchid species, *Epipactis youngiana*, in the British Isles. *Heredity*, 79/4, 402.
- Hietala, A.M., Vahala, J. and Hantula, J. 2001. Molecular evidence suggests that *Ceratobasidium bicorne* has an anamorph known as a conifer pathogen. *Mycological Research* 105/555–562.
- Hollick, P.S., Taylor, R.J., McComb, J.A. and Dixon, K.W. 2005. If orchid mycorrhizal fungi are so specific, how do natural hybrids cope. *Selbyana*, 159-170.
- Huynh, T.T., Lawrie, A.C., Coates, F. and McLean, C. B. 2004. Effect of developmental stage and peloton morphology on success in isolation of mycorrhizal fungi in *Caladenia formosa* (Orchidaceae). *Australian Journal of Botany*, 52/2, 231-241.
- Hynson, N.A. and Bruns, T.D. 2010. Fungal hosts for mycoheterotrophic plants: a nonexclusive, but highly selective club. *New Phytologist*, 185/3, 598-601.
- Graham J.H. and Eissenstat D.M. 1998, Field evidence for the carbon cost of citrus mycorrhizas. *New Phytologist*, 140/1,103-110
- Gümüş, C. 2009. Batı Karadeniz Bölgesi'nde salep elde edilmesinde kullanılan bazı orkide türlerinin (Orchidaceae) çoğaltım yöntemleri üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniversitesi, (221), Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Güner, A. Özhatay, N. Ekim, T. Başer, K.H.C. 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands *Edinburgh University Pres, Edinburgh*. Vol, 11.
- Güner, A. 2012. *Türkiye bitkileri listesi: (darmarlı bitkiler)*. *ANG Vakfı*.
- Jacquemyn, H. Honnay, O. Cammue, B. Brys, R. and Lievens, B. 2010. Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations

- in five closely related species of the genus *Orchis*. *Molecular Ecology*, 19/18, 4086-4095.
- Julou, T., Burghardt, B., Gebauer, G. Berveiller, D. Damesin, C. and Selosse, M.A. 2005. Evolution of mixotrophy in orchids: insight from a comparative study of green and achlorophyllous *Cephalanthera damasonium*. *New Phytologist*, 166, 639-653.
- Kauth, P.J., Dutra, D., Johnson, T.R., Stewart, S.L., Kane, M.E. and Vendrame, W. 2008. Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*, 5, 375-391.
- Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical gazette*, 73/1, 1-25.
- Kompe, Y.O. and Mutlu, V.A. 2017. Mycorrhizal diversity in some species of *Dactylorhiza* genus (Orchidaceae). *Biological Diversity and Conservation*, 10/1, 55-64
- Kristiansen, K.A., Freudenstein, J.V., Rasmussen, F.N. and Rasmussen, H.N. 2004. Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Neuwiedia veratrifolia* (Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33/2, 251-258
- Lan, J., Xu, J. and Li, J. 1996. Study on the infecting process of *Mycena osmundicola* on *Gastrodia elata* by autoradiography. *Acta Mycologica Sinica*, 15/3, 197-200.
- Leake, J.R. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*, 127/2, 171-216.
- Leake, J.R. 2005. Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the 'saprophytic' plant myth. *Mycologist*. 19/3, 113-122.
- Lee, S.S. Park, S.S. Kim, T.J. and Paek, K.Y. (1997). Effect of orchid habitat soil on growth of tissue cultured *Cymbidium kanran* and *C. goeringii*, and root infection of orchid mycorrhizal fungus. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*.
- Liebel, H.T. and Gebauer, G. 2011. Stable isotope signatures confirm carbon and nitrogen gain through ectomycorrhizas in the ghost orchid *Epipogium aphyllum* Swartz. *Plant Biology*, 13/2, 270-275.

- Löki, V. Tökölyi, J. Süveges, K. Lovas-Kiss, Á. Hürkan, K. Sramkó, G. and Molnár, V.A. 2015. The orchid flora of Turkish graveyards: a comprehensive field survey. *Willdenowia*, 45/2, 231-243.
- Masuhara, G, Katsuya, K. 1994. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon.) Ames. var. *amoena* (M. Beiberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist*, 127, 711–718.
- McKendrick S.L, Leake J.R, Taylor D.L, Read D.J. 2000a. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterisation of its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 145/523–537.
- McCormick, M.K. Whigham, D.F. and O'Neill, J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163/2, 425-438.
- McCormick, M.K. Taylor, D.L. Whigham, D.F. and Burnett, R. K. 2016. Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology*, 104/3, 744-754.
- Mccormick, M. K. Lee Taylor, D. Juhaszova, K. Burnett, R. K., Whigham, D. F. And O'Neill, J.P. 2012. Limitations on orchid recruitment: not a simple picture. *Molecular Ecology*, 21/6, 1511-1523.
- Mehra, S. Morrison, P.D. Coates, F. and Lawrie, A.C. 2017. Differences in carbon source utilisation by orchid mycorrhizal fungi from common and endangered species of *Caladenia* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 27/2, 95-108.
- Meléndez-Ackerman, E.J. Ackerman, J.D. and Rodríguez-Robles, J.A. 2000. Reproduction in an orchid can be resource-limited over its lifetime. *Biotropica*, 32/2, 282-290.
- Merckx, V., Bidartondo, M.I. and Hynson, N.A. 2009. Myco-heterotrophy: when fungi host plants. *Annals of Botany*, 104/7, 1255-1261.
- Miyoshi, K. and Mii, M.1995. Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae*, 63/3-4, 263-267.
- Nemesio, A. and Rasmussen, C. 2011. Nomenclatural issues in the orchid bees (*Hymenoptera: Apidae: Euglossina*) and an updated catalogue. *Zootaxa*, 3006/1, 1-42.

- Ochora, J., Stock, W. D., Linder, H. P. and Newton, L. E. 2001. Symbiotic seed germination in twelve Kenyan orchid species. *Systematics and Geography of Plants*, 585-596.
- Ogura-Tsujita, Y. and Yukawa, T. 2008. High mycorrhizal specificity in a widespread mycoheterotrophic plant, *Eulophia zollingeri* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 95/1, 93-97.
- Olaya, G. and Abawi, G.S. 1994. Characteristics of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* species causing foliar blight and root rot on table beets in New York State. *Plant disease*.
- Olson, B.E. 1999. Impacts of noxious weeds on ecological and economic systems, *Biology and Management of Noxious Rangeland Weeds*, Oregon State University Press.
- Otero, J.T., Ackerman, J.D. and Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89/11, 1852-1858.
- Otero, J., Ackerman, J., Bayman, P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13, 2393–2404.
- Özdener, Y. (1994). *Dactylorhiza urvilleana* (Steudel) Bauman ve Künkele ve *D. iberica* (Bieb. Ex Willd) Soo (Orchidaceae) Türlerinin Köklerinden Fungusların İzole Edilmesi, Bu Türlerle Ait Tohumların Simbiyotik ve Asimbiyotik Kültür Ortamlarında Çimlenme ve Gelişmesi Üzerinde Bir Araştırma (Doktora Tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 136, *Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun*.
- Özdener, Y., Özkoç, İ. and Mutlu, V.A. 2013. Symbiotic germination of the seeds of *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. Orchid Population dynamics. 17-19 May. *International Orchid Workshop. Rende, Italy*.
- Özkoç, İ. and Dalcı, M. 1992. İki farklı kültür ortamında *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Brig. Subsp. *laxiflora* (500) Gözl et. Rein hard (Orchidaceae) tohumlarının çimlenme ve gelişmesi üzerine bazı fungusların etkisi. *Turkish journal of Biology*, 16, 158-164.
- Özkoç, İ. Özdener, Y. and Mutlu, V.A. 2013. Molecular characterization of endophytic fungi from the roots of *Spiranthes spiralis* in Turkey. Orchid Population dynamics. 17-19 May. *International Orchid Workshop. Rende, Italy*.

- Pellegrino, G., Luca, A. and Bellusci, F. 2016. Relationships between orchid and fungal biodiversity: Mycorrhizal preferences in Mediterranean orchids. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 150/2, 180-189.
- Pemberton, R.W. 2010. Biotic resource needs of specialist orchid pollinators. *The Botanical Review*, 76/2, 275-292.
- Pereira, O.L., Rollemberg, C.L., Borges, A.C., Matsuoka, K. and Kasuya, M.C. 2003. *Epulorhiza epiphytica* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of epiphytic orchids in Brazil. *Mycoscience*, 44/2, 0153-0155.
- Perkins, A. J., Masuhara, G. and McGee, P.A. 1995. Specificity of the associations between *Microtis parviflora* (Orchidaceae) and its mycorrhizal fungi. *Australian Journal of Botany*, 43/1, 85-91.
- Phillips, R.D., Brown, A.P., Dixon, K.W. and Hopper, S.D. 2011. Orchid biogeography and factors associated with rarity in a biodiversity hotspot, the Southwest Australian Floristic Region. *Journal of Biogeography*, 38/3, 487-501.
- Phillips, R.D., Peakall, R., Hutchinson, M. F., Linde, C.C., Xu, T., Dixon, K. W. and Hopper, S.D. 2014. Specialized ecological interactions and plant species rarity: the role of pollinators and mycorrhizal fungi across multiple spatial scales. *Biological Conservation*, 169, 285-295.
- Pope, E. J. and Carter, D.A. 2001. Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isolates belonging to AG-6 and AG-12 in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia*, 712-719.
- Primack, R. B. and Corlett, R. 2005. Tropical rain forests: an ecological and biogeographical comparison (No. Sirsi i9780632045136). *Blackwell Pub*.
- Ramsay R.R, Sivasithamparam K, Dixon KW 1986. Patterns of infection and endophytes associated with Western Australian orchids. *Lindleyana*, 1, 203–214.
- Rasmussen, H.N. 1995. Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant. *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Rasmussen, H. N. and Whigham, D.F. 1998. The underground phase: a special challenge in studies of terrestrial orchid populations. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126/1-2, 49-64.

- Rasmussen, H.N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and soil*, 244/1-2, 149-163.
- Rasmussen, H.N. and Whigham, D.F. 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist*, 154/3, 797-807.
- Rasmussen, H.N. and Rasmussen, F.N. 2009. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118/3, 334-345.
- Rasmussen, H.N. and Rasmussen, F.N. 2014. Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 175/3, 313-327.
- Remy, W. Taylor, T.N. Hass, H., and Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91/25, 11841-11843.
- Reinecke, T. 1994. Inducible enzymes of the 9, 10-dihydro-phenanthrene pathway. Sterile orchid plants responding to fungal infection. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*. 7/4, 449-454.
- Ridley, H.N. 1930. *The Dispersal of Plants throughout the World*. Ashford, Kent.
- Roberts, P. 1999. *Rhizoctonia-forming fungi*. Herbarium, Royal Botanic Gardens.
- Roche, S.A., Carter, R.J., Peakall, R. Smith, L.M., Whitehead, M.R. and Linde, C.C. 2010. A narrow group of monophyletic *Tulasnella* (Tulasnellaceae) symbiont lineages are associated with multiple species of *Chiloglottis* (Orchidaceae): implications for orchid diversity. *American Journal of Botany*, 97/8, 1313-1327.
- Salazar, G.A. 1999. Novedades en Orchidaceae de México, en especial de la región Uxpanapa-Chimalapa, Veracruz y Oaxaca. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 70/1, 1-12.
- Sandal, G., and Söğüt, Z. 2010. Türkiye orkideleri (Salepler). *Mediterranean agricultural sciences*, 23/2, 109-116.
- Sazak, A. and Ozdener, Y. 2006. Symbiotic and Asymbiotic Germination of Endangered *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. and *Dactylorhiza osmanica* (Kl.) Soó var. *osmanica* (Endemic). *Pak. J. Biol. Sci*, 9, 2222-2228.
- Seaton, P.T., Hu, H., Perner, H. and Pritchard, H.W. 2010. Ex situ conservation of orchids in a warming world. *The botanical review*, 767/2, 193-203.

- Sebastián, F., Vanesa, S., Eduardo, F. and Graciela, T. 2014. Symbiotic seed germination and protocorm development of *Aa achalensis* Schltr., a terrestrial orchid endemic from Argentina. *Mycorrhiza*, 24/1, 35-43.
- Sezik, E. 1984. Orkidelerimiz: Türkiye'nin orkideleri. *Sandoz kültür yayınları*.
- Sezik, E. 2002. Turkish orchids and salep. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44, 151-157.
- Shan, X.C. Liew, E.C.Y. Weatherhead, M.A. and Hodgkiss, I.J. 2002. Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*, 94/2, 230-239.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C. and Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, 363/6424, 67.
- Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. *APS press*
- Smith, S.E. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytologist*, 65/4, 488-499.
- Solomon, D.K., Genereux, D.P., Plummer, L.N. and Busenberg, E. 2010. Testing mixing models of old and young groundwater in a tropical lowland rain forest with environmental tracers. *Water resources research*, 46/4.
- Srivastava, S., Kadooka, C., and Uchida, J.Y. 2017. *Fusarium* species as pathogen on orchids. *Microbiological Research*. 188-195
- Stewart, S.L., and Kane, M.E. 2006. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86/2, 147-158.
- Swarts, N.D. and Dixon, K.W. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of botany*, 104/3, 543-556.
- Swarts, N.D. Sinclair, E.A. Francis, A. and Dixon, K.W. 2010. Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology*, 19/15, 3226-3242.
- Taylor, D.L. and Bruns, T.D. 1997. Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94/9, 4510-4515.

- Tutar, M., Sarı, A.O. ve Çiçek, F. 2012. Ege Bölgesi salep orkidelerinin tarla şartlarında yetiştirilme olanakları, *I. Salep Çalıştayı, 24-25 Mayıs 2011, Kahramanmaraş*.
- Umata, H. 1997. Formation of endomycorrhizas by an achlorophyllous orchid, *Erythrorchis ochobiensis*, and *Auricularia polytricha*. *Mycoscience*, 38/3, 335-339.
- Umata, H. 1997. In vitro germination of *Erythrorchis ochobiensis* (Orchidaceae) in the presence of *Lyophyllum shimeji*, an ectomycorrhizal fungus. *Mycoscience*, 38/3, 355-357.
- Umata, H., Ota, Y., Yamada, M. Watanabe, Y. and Gale, S.W. 2013. Germination of the fully myco-heterotrophic orchid *Cyrtosia septentrionalis* is characterized by low fungal specificity and does not require direct seed-mycobiont contact. *mycoscience*, 54/5, 343-352.
- Vujanovic, V., Arnaud, M., Barabé, D. and Thibeault, G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*, 86/1, 79-86.
- Walter, K.S. and Gillett, H. J. 1998. *IUCN Red List of threatened plants*. IUCN.
- Warcup, J.H. 1971. Specificity of mycorrhizal association in some Australian terrestrial orchids. *New Phytologist*, 70/1, 41-46.
- Waterman, R.J. and Bidartondo, M.I. 2008. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *Journal of Experimental Botany*, 59/5, 1085-1096.
- Waud, M., Busschaert, P., Lievens, B. and Jacquemyn, H. 2016. Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to co-existence of orchid species. *Fungal Ecology*, 20, 155-165.
- Willems, J.H. 1982. Establishment and development of a population of *Orchis simia* Lamk. in the Netherlands, 1972 to 1981. *New Phytologist*, 91/4, 757-765.
- Yancheva, S. and Kondakova, V. 2016. Plant Tissue Culture Technology: Present and Future Development. *In Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*, 1-26.
- Yoder, J.A., Zettler, L.W. and Stewart, S.L. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science*, 156/2, 145-150.

- Zelmer, C.D., Cuthbertson, L. and Currah, R. S. 1996. Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds and protocorms. *Mycoscience*, 37/4, 439.
- Zettler, L.W., Burkhead, J.C. and Marshall, J.A. 1999. Use of a mycorrhizal fungus from *Epidendrum conopseum* to germinate seed of *Encyclia tampensis* in vitro. *Lindleyana-west palm beach*, 14, 102-105.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı

: Sevim DEMİRAY

Doğum Yeri ve Tarihi

: Kayseri / 29.10.1992

Adres

: Ondokuzmayıs Üniversitesi

Fen Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Bölümü

55139, Atakum / SAMSUN

E-Posta

: svmdmry@gmail.com

Lisans (2010/2015)

: Ondokuzmayıs Üniversitesi

Eğitim Fakültesi

Ortaöğretim Biyoloji Öğretmenliği

Yüksek Lisans (2015-2018)

: Ondokuzmayıs Üniversitesi

Fen Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Bölümü

Botanik Anabilim Dalı