

***Serapias orientalis* (Greuter) Bauman & Künkele (Orchidaceae) Tohumlarının *In Vitro* Çimlenmesi**

Vildan AKIN MUTLU¹, Yasemin ÖZDENER KÖMPE*¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Atakum/SAMSUN

*Sorumlu Yazar: : yasemino@omu.edu.tr

Geliş Tarihi: 16.09.2019 Düzeltme Geliş Tarihi: 04.01.2021 Kabul Tarihi: 10.01.2021

Öz

Bu araştırmada *Serapias orientalis* (Orchidaceae) tohumlarının simbiyotik ve asimbiyotik yöntemlerle çimlenme ve fide gelişimi koşulları belirlenmiştir. Asimbiyotik çimlendirme için beş farklı besin ortamı (Su-agar, toprak-agar, Knudson C, Murashige-Skoog ve Van Waes-Debergh) kullanılmıştır. Simbiyotik çimlendirme için köklerden fungus izolasyonu yapılmıştır. İki farklı fungus elde edilmiş, morfolojik ve moleküler tekniklerle yapılan tanımlama sonucu *Tulasnella* sp. ve *Fusarium oxysporum* oldukları belirlenmiştir. Tohumlar modifiye yulaf ortamına ekilmiş ve ayrı ayrı *Tulasnella* sp. ve *F. oxysporum* aşılanmıştır. Üç ay sonra kültür tüplerinde çimlenme ve fide oranı belirlenmiştir. *F. oxysporum* ile aşılanan tohumlar çimlenmemiş, buna karşılık kontrol grubunda %24, *Tulasnella* ile aşılanan tüplerde %68 oranında çimlenme meydana gelmiştir. Kontrol grubunda (fungus içermeyen) çimlenen tohumlar tüylü protokorm aşamasına kadar gelişmiş, fakat daha fazla gelişme olmamıştır. *Tulasnella* ile aşılanan tohumların %62.69'unun fide aşamasına geliştiği belirlenmiştir (5. ve 6. safhalar). Fideler toprağa aktarılıp doğal ortamda büyütülmüştür. Asimbiyotik kültür ortamlarından VWD ortamında en yüksek oranda çimlenme meydana gelirken fide gelişmemiştir.

Anahtar kelimeler: Salep, orkide mikorizası, simbiyotik, asimbiyotik çimlenme.

***In Vitro* germination of the seeds of *Serapias orientalis* (Greuter) Bauman & Künkele (Orchidaceae)**

Abstract

In this study, germination and seedling growth conditions of *Serapias orientalis* (Orchidaceae) seeds were determined by symbiotic and asymbiotic methods. Five different nutrient media (water-agar, soil-agar, Knudson C, Murashige-Skoog and Van Waes-Deberg) were used for asymbiotic germination. For symbiotic germination, fungi isolation was made from roots. Two different fungi were obtained, and they were identified as *Tulasnella* sp and *Fusarium oxysporum* by morphological and molecular techniques. Seeds were sown in modified oat medium and inoculated *Tulasnella* sp and *F. oxysporum* separately. After three months, germination and seedling rates were determined in culture tubes. The seeds that were inoculated with *F. oxysporum* did not germinate. In contrast, 24% of the seeds in the control group germinated 68% of the inoculated with *Tulasnella*. Germinated seeds in the control group (without fungi) developed to the stage of hairy protocorm but no further development. It was determined that 62.69% of the seeds inoculated with *Tulasnella* sp. developed into the seedling stage (5th and 6th stages). Symbiotic seedlings were transferred to soil and grown in natural environment. The highest rate of germination occurred in asymbiotic culture media in VWD medium, while seedling did not develop.

Key words: Salep, orchid mycorrhiza, symbiotic, asymbiotic germination.

Giriş

Orchidaceae çiçekli bitkilerin en geniş familyalarından biridir. Dünyada yaklaşık 800 cins ve 27 binden fazla tür ile temsil edilmektedir (Govaerts ve ark., 2011). En zıt iklim ve habitat koşullarında yetişebilen türleri içermektedir.

Türkiye'de Orchidaceae familyasına dahil 24 cins ve yaklaşık 170 civarında tür yayılış göstermektedir (Güner, 2012). Türkiye, İran ve Yunanistan'da yumrulu orkideler, "salep" olarak özel önem taşımakta ve bu amaçla doğadan toplanmaktadır (Kasperek ve Grimm, 1999; Sezik, 2002; Ghorbani

ve ark., 2014; Kreziou ve ark., 2016). Orkideler yasalarla koruma altına alınmış olsa da kaçak olarak binlerce yumru toplanmaktadır. Buna karşılık bir orkide bitkisi her yıl yalnızca bir yumru vermekte, bu yumru da toplanınca doğadan bir birey azalmaktadır (Sezik, 2002). Tohumları çok küçük, besin içeriği çok az, farklılaşmamış bir proembriyoya sahip olması sebebiyle doğal şartlarda uygun bir fungus ile simbiyotik ilişki kurmadan çimlenememektedir (Rasmussen, 1995). Aşırı toplama, çayır ve meraların aşırı otlatılması, kentleşme ve turizm, orkideleri yok olma tehdidi ile karşı karşıya bırakmaktadır (Sezik, 2002; Park ve ark., 2012; Aewsakul ve ark., 2013).

Tohumların doğal şartlarda çimlenmesi zor ve uzun zaman gerektirdiği için kültür koşullarında çimlendirme ve fide gelişimi üzerine çok sayıda araştırma yapılmış ve hâlâ da yapılmaktadır. Orkide tohumları laboratuvarında steril koşullarda asimbiyotik ve simbiyotik olmak üzere iki yöntem ile çimlendirilmektedir (Arditti, 1982). Asimbiyotik yöntem, farklı içeriklerde hazırlanan doku kültürü ortamlarında tohumların çimlendirilmesi ve alt kültürlerle aktarmak suretiyle fide elde edilmesi, simbiyotik yöntem ise, uygun fungus ile tohumların birlikte aşılması ve çimlenmenin ardından yine alt kültürler yaparak fide elde edilmesi şeklindedir. Asimbiyotik tohum çimlendirme tekniği Lewis Knudson tarafından geliştirilmiştir (Johnson ve ark., 2007; Yam ve Arditti, 2009). Gümüş ve Ellialtıoğlu (2012) doku kültürü yöntemiyle *Serapias vomeracea* (Burm.fil.) Briq. ssp. *orientalis* Greuter tohumlarında % 83.44 çimlenme ve % 72.75 protokorm oluşum oranlarını elde ettiklerini bildirmiştir. Kamçı ve ark (2015) 'ı *Orchis sancta* L. salep orkidesi tohumlarını *in vitro* ortamda farklı azot kaynağı içeren besiyerlerinde bitkicik oluşturmayı başarmıştır. Kemeç ve ark (2018)'nin yaptığı bir çalışmada *A. morio* subsp. *morio*, *A. pyramidalis* ve *D. romana* tohumlarının en iyi Ca₃ (PO₄)₂ içeren SV besiyerinde çimlendiği ve oluşan fidelerin toprağa aktarıldıktan iki hafta sonra ilk yaprakların kurduğu belirtilmiştir. Asimbiyotik yöntem ile pek çok tropikal orkide türünün tohumu başarılı bir şekilde çimlendirilmiş olsa da özellikle karasal orkidelerin asimbiyotik fidelerinin doğal ortamda gelişme başarısı oldukça düşüktür. Diğer yandan *in vitro* simbiyotik yöntem ile daha yüksek oranda çimlenme meydana geldiği gibi protokormlar asimbiyotik olanlardan daha hızlı fide haline gelişmektedir (Rasmussen, 1995; Johnson ve ark., 2007). Ayrıca *in vitro* simbiyotik fidelerin dış koşullara adaptasyonu asimbiyotik koşullarda elde edilen fidelerden daha başarılıdır, çünkü mikorizal funguslar etkili bir şekilde su ve besin taşır, ardından fotosentetik aktivite artar (McCormick ve ark., 2004; Smith ve Read, 2008; Mala, 2019). Buna

karşılık simbiyotik çimlendirme yönteminde en önemli konu, uygun fungusun izole edilebilmesidir. Uygun fungus inoküle edilmediği orkide tohumlarında simbiyotik çimlenme meydana gelmez. Bu bağlamda hem asimbiyotik hem de simbiyotik çimlendirme yöntemlerinin üstün ve eksik yönleri bulunmaktadır (Ozdener, 1994). Doğada orkidelerin kökleriyle mikorizal ilişki kuran funguslar orkidelerin topraktan su ve besin maddelerinin emiliminde rol oynar (Rasmussen, 1995). Hatta yeni büyüme döneminde bitki fotosentetik safhaya ulaşıncaya kadar fungusların yakındaki ağaçlardan orkideye karbon taşıdığı da kanıtlanmıştır (McCormick ve ark., 2009). Bu mikorizal fungusların yetişkin orkide bitkisine su ve besin sağlaması yanında tohumlarının çimlenmesini de teşvik edebildiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (Warcup, 1973; Ozdener, 1994; Sazak ve Ozdener, 2006; Johnson ve ark., 2007). Çeşitli inorganik ve organik besin maddelerinin dengeli karışımından oluşan bir simbiyotik kültür ortamında funguslarla aşılana tohumlar steril koşullarda kolaylıkla çimlenip gelişmektedir (Rasmussen, 1995). Fakat her orkide türünün tohumlarının çimlenmesini teşvik eden fungus farklı olabilmektedir (Rasmussen, 1995; Sazak ve Ozdener, 2006). Başarılı bir simbiyotik çimlenme ve fide gelişimi için öncelikle çimlenmeyi teşvik edecek uygun fungus belirlenmelidir. Bunun için yetişkin orkidenin köklerinden fungus izolasyonu yapılması gerekir (Clements ve ark., 1986).

Türkiye, salep ve dondurma yapmak amacıyla orkidelerin çok fazla miktarda toplandığı bir ülke olması sebebiyle orkide üretimi özel önem arz etmektedir. Orkide tohumlarının asimbiyotik olarak çimlendirilmesi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılırken köklerden fungus izolasyonunun zorluğu, izole edilen her fungusun tohum çimlenmesini teşvik etmemesi gibi sebeplerle simbiyotik çimlendirme çalışmaları daha az yapılmaktadır. Ayrıca Türkiye'de orkide mikorizası ve orkide-fungus ilişkisi ile ilgili önemli bilgi eksikliği vardır. Orkide mikorizal fungus çeşitliliğinin ve orkide tohum çimlenmesine etkilerinin belirlenmesi, orkidelerin tohumdan üretimi yoluyla kültüre alınmasını oldukça kolaylaştıracaktır.

Bu amaçla bu çalışmada Karadeniz bölgesinde yaygın olan ve salep yapımı amacıyla toplanan *Serapias orientalis* (sin: *Serapias vomeracea* subsp. *orientalis*) türüne ait bitkilerin köklerinde mikorizal birliğe katılan funguslar ve tohumdan üretim yolları (simbiyotik ve asimbiyotik) karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırma alanı ve materyallerin toplanması

Serapias orientalis Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Kurupelit kampüsünde yaygın olarak yetişmektedir. Taze kök örnekleri Mayıs 2017, tohumlar ise Temmuz 2017 yılında toplanmıştır. Tohum kapsülleri alınıp laboratuvarında açılarak tohumlar ayrılmış birkaç gün oda sıcaklığında kurutulduktan sonra içinde kahverengi şişelere konup buzdolabında saklanmıştır.

Fungus izolasyonu ve morfolojik özelliklerin belirlenmesi

S. orientalis çiçekli safhada iken aynı populasyon içinde rastgele seçilen 5 bitkinin kökleri musluk suyu ile yıkanıp % 2'lik NaOCl ile 10 dakika yüzeysel sterilizasyonu yapılmış ve birkaç kez steril su ile yıkanmıştır. Steril ortamda kökler küçük parçalara ayrılıp içinde fungus izolasyon ortamı (Clements ve ark., 1986) bulunan petrilere aktarılmıştır. 27 °C ve karanlıkta bir hafta inkübe edildikten sonra kök parçalarından besiyerine doğru gelişen fungus hiflerinin bulunduğu küçük besiyeri parçaları alt kültüre alınarak saflaştırılmıştır. Elde edilen mikorizal fungusların morfolojik özellikleri (koloni görüntüsü ve rengi, çekirdek sayısı, hif çapı, hif özellikleri) belirlenmiştir.

Moleküler tanımlama

İzolatların kuru misellerini elde etmek için PDB (Patates Dekstroz Broth) besiyeri aşılana fungus miselleri çalkalayıcı su banyosunda 25 °C'de 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gelişen fungus miselleri kurutulmuş ve azot yardımıyla toz haline getirilmiştir. DNA izolasyonu, Pascual ve ark., (2000)'nin yöntemine göre yapılmış ve DNA pelleti kurutulup 25 ml TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) tamponda çözülmüştür. DNA'ların varlığını doğrulamak amacıyla %1'lik agaroz (Amresco) jel elektroforezi 80 voltta 20dk yapılmış olup agaroz jeldeki DNA bantlarının gözlenmesi için GEL Red (10 mg/ml stok) kullanılmıştır.

DNA'sı elde edilen her izolatın ITS1-5.8S-ITS2'i kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için primer ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) (Qiagen), primer IT4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Qiagen) kullanılmıştır (White ve ark., 1990). Her bir örnek için reaksiyon karışımına (50 µL) 37.75 µL ddH₂O, 5 µL 10X PCR tampon, 1 µL primer 1 (ITS1) (20pmol), 1 µL primer 2 (ITS4) (20pmol), 1 µL dNTP mix (2,5 mM), 3 µL MgCl₂, 0.25 µL *Taq* polimeraz (5U) ve 1 µL kalıp DNA eklenerek karışım elde edilmiştir. PCR ependorflarının her birine 49 µL karışım ve 1 µL kalıp DNA koyulduktan sonra Thermal Cycler'a (Primus 25) yerleştirilerek, başlangıç

denatürasyonu 94 °C 3dk, denatürasyon 94 °C 1dk, yapışma 49 °C 2dk, uzama 74 °C 3dk, son uzama 72 °C 7dk olacak şekilde 30 döngülük reaksiyonun gerçekleştirildiği program uygulanmıştır. Amplifikasyonu gerçekleştirilen her bir PCR ürünü %1'lik agaroz jelde 80 voltta 20 dk koşturularak ürün varlığı doğrulandıktan sonra elde edilen ürünler dizileme (sekans) işlemleri için MacroGen firmasına gönderilmiş olup MacroGen tarafından automatic sequencer 3730XL kullanılarak ABI 1.6.0 analizi ile elde edilen dizileme verileri ise internet ortamında teslim edilmiştir. İzolatların ITS1 ve ITS 4 primerleri kullanılarak iki yönlü okunan ham sekans verileri konsensusunu elde etmek amacıyla Sequencher 4.7 Demo programı kullanılmıştır ve son olarak elde edilen sekansların NCBI veri tabanında yakın ilişkili olduğu (%99'in üzeri) taksonlar belirlenmiştir.

Simbiyotik tohum çimlenmesi

Simbiyotik tohum çimlendirme yönteminde modifiye yulaf ortamı (Clements ve ark., 1986) kullanılmıştır. İçinde steril modifiye yulaf ortamı bulunan tüplere öze ucu ile bir miktar tohum ekilmiş, bir hafta karanlıkta inkübasyondan sonra fungus kültüründen bir parça alınıp tohumların yanına aşılansmıştır. 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyotta iklim odasında 12 hafta boyunca çimlenme ve gelişme durumu takip edilerek değerlendirilmiştir.

Asimbiyotik kültür ortamlarının hazırlanması ve tohumların çimlendirilmesi

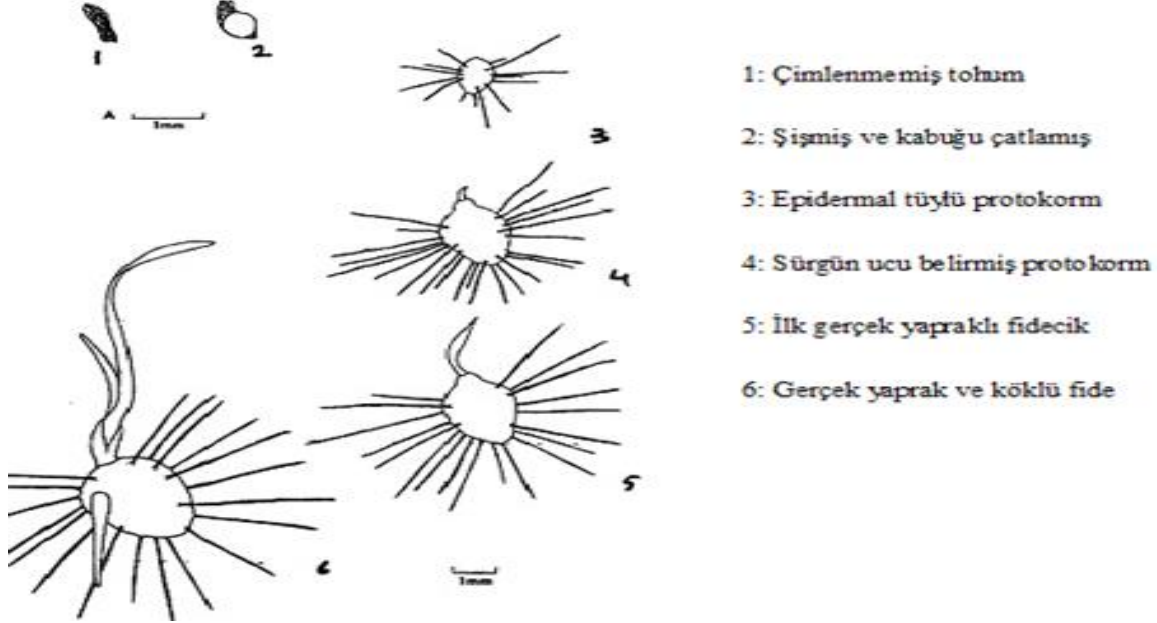
Araştırmanın bu aşamasında Van Waes-Debergh (VWD) (1986), Knudson C (KC) ve Murashige ve Skoog (MS) ortamları kullanılmıştır. KC ve MS ortamları Arditti (1982)'e göre hazırlanmıştır. Ayrıca Su agarı (SA) musluk suyuna 6 gr agar ilave edilerek, toprak agar (TA) bu orkidinin yetiştiği yerden 5 g toprak 1 L su içinde karıştırılıp 6 g agar ilave edilerek hazırlanmış, kullanılan bütün besiyerleri (simbiyotik ve asimbiyotik) otoklavda 20 dk steril edilmiştir.

Tohumlar, kurutma kağıtları içinde paketlenildikten sonra %2'lik NaOCl ile 30 dakika yüzeysel olarak steril edilmiş ve ardından üç kez steril saf su içinde çalkalanarak NaOCl uzaklaştırılmıştır (Gümüş, 2009). Steril hava kabini içinde bir miktar tohum, içinde besiyeri bulunan tüplere ekilmiştir. Her kültür ortamı için 6 tekrar yapılmıştır. Daha sonra tüpler 25-27 °C'de ve karanlıkta 1 ay inkübe edildikten sonra 16:8 saat aydınlık: karanlık fotoperiyoda bırakılmıştır. Toplam 12 ay sonra tüplerdeki çimlenme sayısal olarak değerlendirilmiştir. Çimlenmeden itibaren gelişme 6 safhaya ayrılarak değerlendirilmiştir

(Clements ve ark., 1986) Gelişme aşamaları Şekil 1'de verilmiştir.

Farklı kültür ortamlarında tohum çimlenme oranları SPSS-15 istatistik programında tek yönlü varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey testi ile karşılaştırılmıştır ($p=0.05$).

İstatistiki analiz



Şekil 1. Orkide tohumlarından protokorm oluşumu ve çimlenme aşamaları

Çizelge 1. *S. orientalis* köklerinden izole edilen fungusların morfolojik özellikleri ve moleküler blast sonuçları

İzolat No	Sekans Uzunluğu (bp)	Accession No (GenBank)	No	Benzerlik (%)	Koloni rengi	Koloni tipi	Vejetatif hif rengi	Hif çapı (μm)	Çekirdek sayısı
G1	562	<i>Tulasnella</i> sp. MUT4217 (KC525058)		100	Grimsi sarı	Hif besiyerine batık	Hyaline	4,0	İki çekirdekli
G2	520	<i>Fusarium oxysporum</i> izolatı CBPPR054 (KT211546)		99	Pembemsi kırmızı	Pamuksu havai hif	Hyaline	6,1	Çok çekirdekli

Bulgular ve Tartışma

S. orientalis çiçekli safhada iken canlı fungal koloni bulunan köklerden izole edilen funguslar incelenmiş ve morfolojik benzerliklerine göre iki gruba ayrılmıştır. Bu fungusların koloni ve hif görüntüleri Şekil 2'de, diğer morfolojik ve moleküler özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir.

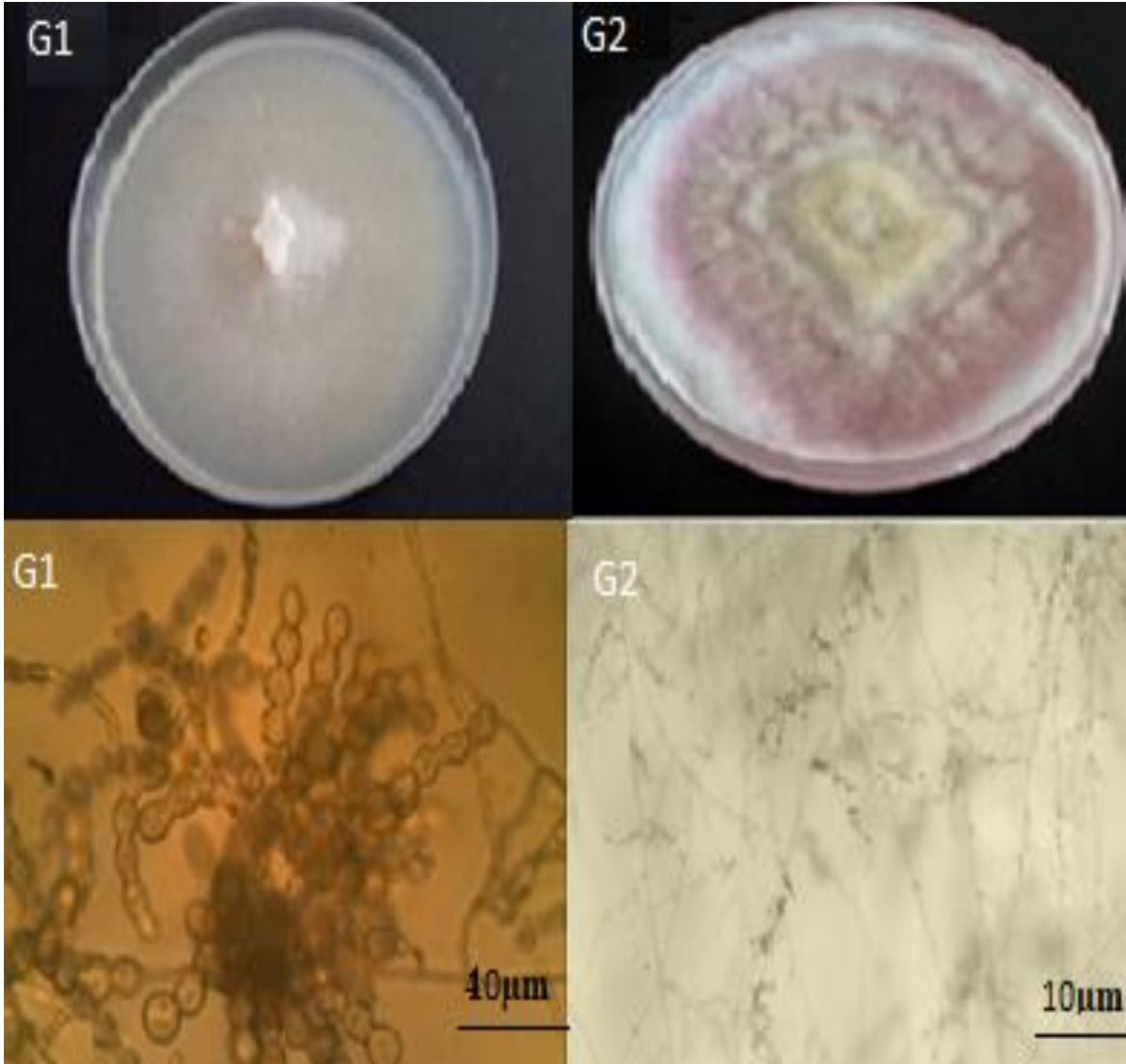
Moleküler analizler sonucu, elde edilen iki farklı fungus grubundan birinin *Tulasnella* (KC525058) cinsine %100, diğerinin de *Fusarium oxysporum* (KT211546) türüne %100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada izolasyon yapılan tüm *S. orientalis* bireylerinin köklerinde aynı fungusun mikorizal birliğe katıldığı

belirlenmiştir. *Fusarium oxysporum* sadece bir bireyin bir kökünden izole edilmiştir.

Yapılan araştırmalar orkide mikorizasına katılan fungusların *Rhizoctonia* benzeri (*Tulasnella*, *Sebacina* ve *Ceratobasidium*) funguslar olduğunu ortaya koymakla beraber, Ascomycetes'e dahil (örn; *Fusarium*, *Trichoderma*, *Morchella* türleri gibi) fungusların da mikorizal birliğe katıldığına dair araştırma sonuçları mevcuttur (Fracchia ve ark., 2016; Kömpe ve Mutlu, 2017). Fakat bu fungusların çimlenmeyi teşvik edip etmediği ile ilgili veriler çok yetersizdir. Vujanovic ve ark. (2000), bazı orkidelerin tohumlarının çimlenmesini teşvik eden *Fusarium* türleri belirlemiş olsalar da, protokorm

aşamasından ileri gelişme olmadığını ve *Rhizoctonia* benzeri fungusların etkisine kıyasla çok

düşük seviyede etki gösterdiğini belirlemişlerdir.



Şekil 2. Fungus görüntüleri (G1: *Tulasnella* sp. petri ve hif görüntüsü; G2: *Fusarium oxysporum* petri ve hif görüntüsü)

Araştırmamızda izole edilen *Fusarium oxysporum*, tohumların çimlenmesini tamamen inhibe etmiştir. Farklı orkidelerin köklerinden *Fusarium*, *Trichoderma*, *Pezizales* fungusları izole edilse de fizyolojik olarak orkideye ne gibi yarar sağladıkları henüz tam olarak belirlenmemiştir (Vujanovic ve ark., 2000; Kömpe ve Mutlu, 2017). Çimlendirme testlerinde, fungussuz kontrol grubunda %24 oranında çimlenme olmuş ve protokorm meydana gelmiştir. Bazı orkidelerin tohumları fungusa ihtiyaç duymadan çimlenebilmekte fakat daha ileri gelişim için mutlaka fungusa ihtiyaç duymaktadır. Bu durum Øien ve ark. (2008), McCormick ve ark. (2016) tarafından da belirlenmiştir. Simbiyotik kültür ortamında *Tulasnella* ile aşılanan tohumlar %68.2 oranında çimlenmiş ve değişik seviyelerde fide

oluşturmuştur (Şekil 3a). Gelişen fideler içinde bahçe toprağı bulunan saksılara aktarılmıştır (Şekil 3b). Dünyadaki orkide türlerinin mikorizal birliğine katılan fungusların büyük çoğunluğunun *Rhizoctonia* benzeri funguslar olduğu ve tohumların çimlenmesini etkili bir şekilde teşvik ettiği, her orkide türüne ait tohumların çimlenmesini teşvik eden uygun fungusun farklı olabildiği belirlenmiştir (Clements, 1986; Ozdener, 1994; Sazak ve Özden, 2006; Stewart ve Kane, 2006). Ayrıca yine araştırmalar ortaya koymuştur ki, uygun fungus sadece tohum çimlenmesi ve fide gelişimi için esasi olmayıp orkidenin doğaya uyumu ve canlılığını devam ettirebilmesi için de mutlak gereklidir (Zettler, 1997; Rasmussen, 2002; Leake, 2004; McCormick, 2016). Çimlenenlerin %61.47'sinin gerçek yapraklı fide, %1.32'sinin ise

köklü fide aşamasına ulaştığı belirlenmiştir (Çizelge 2, Şekil 3a,b).



Şekil 3. Simbiyotik kültür ortamında gelişen fideler (a), toprağa aktarılanlar (b)

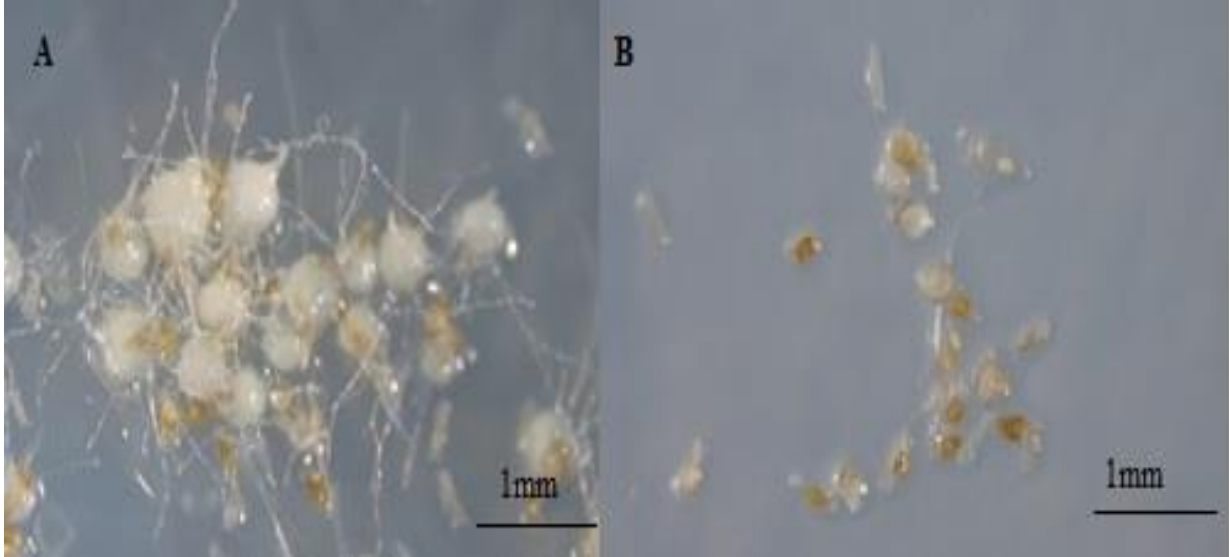
Çizelge 2. Simbiyotik çimlenme ve fide gelişme seviyeleri

Fungus	Çimlenme(%)	Gelişme seviyeleri (%)					
		1	2	3	4	5	6
Kontrol	24.6±4.57	73.3±3.17*	8.73±1.41*	15.9±3.19*	-	-	-
<i>Tulasnella</i> sp.	68.2±3.86*	32.4±9*	-	1.62±0.8*3	3.8±0.8*	61.47±3.88	1.32±0.36*
<i>F. oxysporum</i>	0±0.00	100±0.0*	-	-	-	-	-

*: Gruplar arasındaki farklılıklar 0.05 seviyesinde önemlidir.

Asimbiyotik kültür ortamlarındaki çimlenme durumu Çizelge 3’de verilmiştir. En yüksek oranda çimlenme VWD ortamında olmuş (% 62 oranı), fakat sadece 4. gelişme aşamasına ulaşmıştır (Şekil-4a). Gelişme yavaş ve zayıf olduğu için gelişme

aşamaları istatistiki olarak değerlendirilmemiştir. Su-agar ortamında % 21 oranında çimlenme olmuş, fakat 2. ve 3. aşamadan ileri gelişme olmamıştır (Şekil 4b).



Şekil 4. Stabilite yöntemleri ile bitki tane verimi (Y) arasındaki ilişkiler

Çizelge 3. Farklı asimbiyotik kültür ortamlarında çimlenme oranları

Asimbiyotik ortam	Çimlenme (%)
KC	17.3±0.61*
MS	33.5±1.02*
SA	21±0.89*
TA	40.6±1.05*
VWD	62±1.6*

KC, MS ve toprak-agar ortamlarında da değişen oran arda çimlenme meydana gelmiş fakat 2.aşamadan sonra gelişme olmamıştır. Yapılan araştırmalar, özellikle karasal orkidelerin tohumlarının asimbiyotik koşullarda çimlenebilmesi kültür ortamına bitki büyüme düzenleyicileri ve çeşitli katkı maddelerinin (hindistan cevizi sütü, patates ekstraktı gibi) eklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Arditti, 1982; Ozdener, 1994).

Araştırmamızda simbiyotik ve asimbiyotik çimlenme süreci karşılaştırıldığında simbiyotik yöntemin, asimbiyotik yöntemle göre belirgin şekilde üstün olduğu görülmektedir. Benzeri sonuçlar *Spiranthes spiralis* (Sazak ve Ozdener, 2006), bazı *Dactylorhiza* türleri (Ozdener, 1994) ve *Orchis laxiflora* (Ozkoç ve Dalci, 1993)'da yapılan araştırmalarda da elde edilmiştir.

Sonuç

Sonuç olarak bu çalışmada öncelikle *S. orientalis* köklerinde mikorizal birliğe katılan funguslar belirlenmiş ve ardından yapılan simbiyotik çimlenme testlerinde *Tulasnella* sp. ile arasında spesifik ilişki olduğu ortaya konmuştur.

Simbiyotik fideler doğal ortama da kolaylıkla uyum sağlayıp gelişmeye devam etmiştir. Orkideler Türkiye'de önemli bir tarım bitkisi olma potansiyeline sahiptir. Fakat tohumdan üretiminin zorluğu ve uzun zamana ihtiyaç duyulması sebebiyle kültüre alınamamıştır. Simbiyotik üretim modeli ve her orkide için spesifik fungus belirlenerek salep elde edilen orkidelerin kültüre alınması mümkün olabilecektir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

- Aewsakul, N., Maneesorn, D., Serivichyaswat, P., Taluengit, A. ve Nontachaiyapoom, S., 2013. Ex vitro symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates. *Scientia Horticulturae*, 160: 238-242.
- Arditti, J. 1982. Orchid Biology Reviews and Perspectives, II, Comstock Publishing Associates a division of Cornell University press/Ithaca and London.
- Clements, M.A., Muir, H. ve Cribb, P. 1986. A preliminary report on the symbiotic germination of european terrestrial orchids. *Kew Bulletin*, 41: 437-445.
- Fracchia, S., Aranda-Rickert A., Rothen C. ve Silvana, S. 2016. Associated fungi, symbiotic germination and in vitro seedling development of the rare Andean terrestrial

- orchid *Chloraea riojana*. *Flora*, 224: 106-111.
- Ghorbani, A., Gravendeel, B., Naghibi, F. ve de Boer, H. 2014. Wild orchid tuber collection in Iran: a wake-up call for conservation. *Biodiversity and Conservation*, 23 (11): 2749-2760.
- Govaerts, R. Pfahl, J., Campacci, M. A., Holland Baptista D., Triggles, H., Shaw, J., P., Cribb, P.J., George, A., Kreuz K. ve Wood, J. 2011. World Checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Gümüş, C. 2009. Batı Karadeniz Bölgesi'nde salep elde edilmesinde kullanılan bazı orkide türlerinin (*Orchidaceae*) çoğaltım yöntemleri üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara, 221 s.
- Gümüş, C., Ellialtıoğlu, S. 2012. Seed Germination and Development of *Serapias vomeracea* (Burm.fil.) Briq. ssp. *orientalis* Greuter in Tissue Culture. *Research Journal of Biotechnology* 7(3):4-8
- Güner, A. 2012. The List of Turkey Plants (Vascular Plants). Nemaş, Istanbul, Turkey.
- Johnson, T.R., Stewart, S.L., Dutra, D., Kane, M.E. ve Richardson, L. 2007. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) – preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 90: 313–323.
- Leake, J.R. 2004. Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 422-428.
- Kamçı, H., ve Karakuş, B. 2015. Orchis sancta L. tohumlarının in vitro koşullarda çimlenme, protokorm oluşumu ve bitkiye dönüşümü üzerine araştırmalar, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4(1),24-30.2).
- Kasperek, M. ve Grimm, U. 1999. European trade in Turkish salep with special reference to Germany. *Economic Botany*, 53: 396-406.
- Kemeç Hürkan, Y., Hürkan, K. ve Akı, C. 2018. Comparative Growth Media Performances On In Vitro Propagation of Some Salep Orchids. *Anadolu University of Sciences & Technology-C: Life Sciences & Biotechnology*, 7(1).
- Kömpe Y.Ö. ve Mutlu V.A. 2017. Mycorrhizal diversity in some species of *Dactylorhiza* genus (Orchidaceae). *Biological Diversity and Conservation*, 10(1): 55-64.
- Kreziou, A., Boer, H.D. ve Gravendeel, B. 2016. Harvesting of salep orchids in North-western Greece continues to threaten natural populations. *Oryx*, 50(3): 393-396.
- Mala, B., Kuegkong, K., Sangiaemsri, N., Nontachaiyapoom, S., 2017 Effect of germination media on *in vitro* symbiotic seed germination of three *Dendrobium* orchids. *South African Journal of Botany* 112, 521-526.
- McCormick, M. K., Whigham, D. F.ve O'Neill, J. 2004. Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163, 425–438.
- McCormick, M. K, Whigham, D. F., O'Neill, J. P., Becker, J. J., Werner, S., Bruns, T. D. and Taylor, D. L. 2009. Abundance of *Corallorhiza odontorhiza* (Orchidaceae) within an established population reflects abundance of ectomycorrhizal root tips and fungal community composition. *Ecological Monographs*, 79: 619–635.
- McCormick, M. K., Taylor, D. L., Whigham, D. F., Burnett, R.K. 2016. Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology*, 104(3), 744-754.
- Øien, D., O'Neill, J.P., Whigham, D.F. ve McCormick, M.K. 2008. Germination ecology of the boreal-alpine terrestrial orchid *Dactylorhiza lapponica* (Orchidaceae). *Annales Botanici Fennici*, 45: 161–172.
- Ozdener, Y. 1994. *Dactylorhiza urvilleana* (Steudel) Bauman ve *D.iberica* (Bieb. ex.Wild) SOO (ORCHIDACEAE) türlerinin köklerinden fungusların izole edilmesi, bu türlere ait tohumların simbiyotik ve asimbiyotik kültür ortamlarında çimlenme ve gelişmesi üzerinde bir araştırma. Doktora Tezi. OMÜ Fen Bil. Enst. Samsun.
- Özkoç, I. ve Dalcı, M. 1993. *Orchis laxiflora* tohumlarının iki farklı ortamda çimlenmesi ve gelişmesi üzerine bazı fungusların etkisi. *DOĞA Türk Biyoloji Dergisi* 17(1):23-28.
- Park, E. J., Lee, W.Y. ve Ahn J.K. 2012. In vitro propagation of myco- heterotrophic *Gastrodia elata*. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 53(5): 415-420.
- Pascual, C.B., Toda, T., Raymondo, A.D. ve Hyakumachi, M. 2000. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathology*, 49: 108-118.
- Rasmussen, H.N. 1995. Terrestrial Orchids From Seed to Mycotrophic Plant. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

- Rasmussen, H.N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil*, 244: 149–163.
- Sazak, A. ve Ozdener, Y. 2006. Symbiotic and Asymbiotic Germination of Endangered *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. and *Dactylorhiza osmanica* (Kl.) Soó var. *osmanica* (Endemic). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9 (12): 2222-2228.
- Sezik, E. 2002. Turkish orchids and salep. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44:151-157.
- Smith, S.E. ve Read, D. 2008. The mycorrhizas of green orchids. In SES Read, ed, Mycorrhizal Symbiosis, Ed 3. Academic Press, London, pp 419– 457.
- Stewart, S. L., Kane, M. E. 2006. "Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 159-167.
- Van Waes, J.M. ve Debergh, H. 1986. In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*, 67(2): 253-261.
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabe, D. ve Thibeault, G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*, 86: 79-86.
- Warcup, J.H. 1973. Symbiotic germination of some Australian terrestrial orchids. *New Phytologist* 72: 387–392.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. ve Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in PCR protocols: a guide to methods and applications, New York: Academic Press.
- Yam, T.W.ve Arditti, J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports* 3: 1–56.
- Zettler, L.W. 1997. Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: techniques and perspectives. *Selbyana*, 18: 188–19