



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***DACTYLORHIZA NIESCHALKIORUM* H. BAUMANN &
KÜNKELE (ORCHIDACEAE) TOHUMLARININ ÇİMLENME
VE MİKORİZA FİZYOLOJİSİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Doktora Tezi

Hamdiye ŞEHİRLİ

Danışman
Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE

SAMSUN
2025

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI



***DACTYLORHIZA NIESCHALKIORUM* H. BAUMANN &
KÜNKELE (ORCHIDACEAE) TOHUMLARININ ÇİMLENME
VE MİKORİZA FİZYOLOJİSİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Doktora Tezi

Hamdiye ŞEHİRLİ

Danışman

Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE

PYO.FEN.1904.15.007 nolu proje ile Tübitak tarafından desteklenmiştir.

SAMSUN
2025

TEZ KABUL VE ONAYI

Hamdiye ŞEHİRLİ tarafından, Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE danışmanlığında hazırlanan “*DACTYLORHIZA NIESCHALKIORUM* H. BAUMANN& KÜNKELE (ORCHIDACEAE) TOHUMLARININ ÇİMLENME VE MİKORİZA FİZYOLOJİSİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 28.1.2025 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Yasemin Özdener Kömpe Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Ş. Fatma Aygün Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kimya Ana Bilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Hamdi Güray Kutbay Ondokuz Mayıs Üniversitesi biyoloji Ana Bilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Tuğba Özbucak Ordu Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Birsen Aydın Amasya Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Faik Ahmet SESLİ
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

İmza

28/01/ 2025

Hamdiye ŞEHİRLİ

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: *DACTYLORHIZA NIESCHALKIORUM* H. BAUMANN & KÜNKELE (*ORCHIDACEAE*) TOHUMLARININ ÇİMLENME VE MİKORİZA FİZYOLOJİSİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 26.12.2024 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

İmza

28/01/ 2025

Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE

ÖZET

DACTYLORHIZA NIESCHALKIORUM H. BAUMANN & KÜNKELE (ORCHIDACEAE) TOHUMLARININ ÇİMLENME VE MİKORİZA FİZYOLOJİSİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Hamdiye ŞEHİRLİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Ocak/2025

Danışman: Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE

Bütün dünyada olduğu gibi Türkiye’de de orkideler çok ciddi yok olma tehdidi altındadır. Ilıman iklim orkidelerinin yumruları salep ve dondurma için aşırı toplanmaktadır. Özellikle nadir ve endemik orkideler bu tahribat ile yok olmaktadır. Bu çalışmada endemik *Dactylorhiza nieschalkiorum*’un tohum çimlenmesi yoluyla üretim koşulları araştırılmıştır.

Öncelikle Bolu ve Rize’den kök örnekleri alınıp fungus izolasyonları yapılmış ve elde edilen fungal izolatlar ile simbiyotik, ex vitro, ve ex situ çimlendirme testleri gerçekleştirilmiştir. Asimbiyotik çimlenme testleri Knudson C (KC), Murashige-Skoog (MS), Van Waes Deberg temel ortamı ve modifikasyonları, toprak-agar ortamlarında yapılmıştır. Simbiyotik testler için modifiye yulaf ortamı kullanılmıştır. Ex vitro testler çalışma alanlarından alınan topraklardan yapılan kültür ortamında yapılmıştır. Habitatında ve habitat dışında tohum çimlenmesi gözlemleri gerçekleştirilmiştir.

Simbiyotik çimlendirme testlerinde, Rize’den izole edilen *Tulasnella* sp., *Trichoderma* sp. ve *Pezizaceae* sp.’nin çimlenmede etkili olmadığı, Bolu’dan izole edilen *Ceratobasidium* sp.’nin çimlenmeyi teşvik ettiği görülmüştür. İn vitro ve ex vitro simbiyotik çimlendirme testlerinde tohumların çimlenip fide aşamasına ulaştığı belirlenmiştir. Habitatında ve habitat dışında tohum çimlenmesi gözlenememiştir.

Anahtar Sözcükler: Orkide, fungus, çimlenme, asimbiyotik, simbiyotik, toprak kültürü.

-ABSTRACT

A RESEARCH ON GERMINATION AND MYCORRHIZAL PHYSIOLOGY OF DACTYLORHIZA NIESCHALKIORUM H. BAUMANN& KÜNKELE (ORCHIDACEAE) SEEDS

Hamdiye ŞEHİRLİ

Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Biology

PH.D., January/2025
Supervisor: Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE

As in the whole world, orchids in Turkey are under serious threat of extinction. The tubers of temperate climate orchids are over-picked for salep and ice cream. Especially rare and endemic orchids are destroyed by this destruction. In this study, the production of endemic *Dactylorhiza nieschalkiorum* by seed germination was investigated.

First, root samples were taken from Bolu and Rize and fungal isolations were made and then the obtained fungal isolates were used in symbiotic, ex vitro, and ex vivo germination tests. Knudson C (KC), Murashige-Skoog (MS), Van Waes Deberg base medium and its modifications and soil-agar medium were used for asymbiotic germination. Modified oat medium was used for symbiotic tests. Culture media made from soils taken from the study areas were used in ex vitro tests. Seed germination observations were made in its habitat and outside the habitat.

In symbiotic germination tests, isolated from Rize, *Tulasnella* sp., *Tricoderma* sp. and *Pezizaceae* sp. were not effective in germination. It was observed that *Ceratobasidium* sp. isolated from Bolu promoted germination. In in vitro and ex vitro symbiotic germination tests, it was determined that the seeds germinated and reached the seedling stage. No seed germination was observed in its habitat or outside the habitat.

Keywords: Orchid, Fungus, Germination, Asymbiotic, Symbiotic, Soil Culture

TEŞEKKÜRLER

Dactylorhiza nischalkiorum (Orchidaceae) tohumlarının çimlenme ve mikoriza fizyolojisi üzerine olan bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak hazırlanmıştır.

Doktora eğitimime başladığım günden beri büyük bir sabırla bana yol gösteren, desteğini her zaman hissettiren çok değerli sevgili hocam Prof. Dr. Yasemin Özdener Kömpe' ye şükran ve sevgilerimi sunarım.

Ömrün boyunca hep yanımda olan babam ve anneme, arazi çalışmalarında benimle yol alan kardeşim Hüseyin, eşi Esra, yeğenlerim Asım ve Şevval'le

Araştırma materyalini arama, bulma ve inceleme aşamasında bana rehber olan Kaçkar Dağcılık ve Rafting Kulübü Başkanı Erdoğan Muradoğlu nezdinde bütün kulüp üyelerine, her ihtiyacımda Atatürk Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü' ndeki doku kültürü laboratuvarını kullanmama izin veren Ayhan Haznedar'a, birçok konuda danıştığım sevgili arkadaşım Dr. Atilla Polat'a,

Laboratuvar çalışmalarında her daim yanımda olup yardımını esirgemeyen dostum Dr. Vildan Akın Mutlu ve ailesine,

Tüm yüreğimle sonsuz teşekkür ederim.

Hamdiye ŞEHİRLİ

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	8
2. GENEL BİLGİLER.....	11
3. MATERYAL VE METOT.....	40
3.1. ARAŞTIRMA ALANI VE MATERYAL.....	40
3.2. TOHUMLARIN TOPLANMASI.....	43
3.3. TOHUM PAKETLERİNİN HAZIRLANMASI.....	44
3.4. TTC (2,3,5-TripHenyl Tetrazolium Chloride) İLE TOHUM CANLILIK TESTLERİ	44
3.5. FUNGUS İZOLASYONU.....	44
3.6. İZOLE EDİLEN FUNGAL İZOLATLARIN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ	45
3.6.1. İZOLE EDİLEN FUNGAL İZOLATLARIN MORFOLOJİK YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ.....	45
3.6.2. FUNGAL İZOLATLARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ.....	46
3.7. TOHUM ÇİMLENMESİ TESTLERİ.....	49
3.7.1. SİMBİYOTİK TOHUM ÇİMLENME TESTLERİ.....	49
3.7.2. ASİMBİYOTİK TOHUM ÇİMLENME TESTLERİ.....	50
3.7.3. IN SİTU SİMBİYOTİK ÇİMLENME TESTİ.....	52
3.7.4. EX SİTU TOHUM ÇİMLENME TESTLERİ.....	52
3.7.5. EX VİTRO TOHUM ÇİMLENME TESTLERİ.....	52
3.8. TOPRAK ANALİZLER.....	53
3.9. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM.....	54
4. BULGULAR.....	55
4.1. TTC (2,3,5-TRİPHENYL TETRAZOLİUM CHLORİDE) İLE TOHUM CANLILIK TESTLERİ	55
4.2. FUNGUS İZOLASYONU.....	56
4.2.1. FUNGAL İZOLATLARIN MORFOLOJİK YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ.....	57
4.2.2. FUNGAL İZOLATLARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ.....	58
4.3. TOHUM ÇİMLENME TESTLERİ.....	61
4.3.1. SİMBİYOTİK TOHUM ÇİMLENME TESTLERİ.....	62
4.3.2. ASİMBİYOTİK TOHUM ÇİMLENME TESTLERİ.....	64
4.3.3. IN SİTU (YERİNDE-DOĞAL HABİTATINDA) SİMBİYOTİK ÇİMLENME TESTİ.....	65
4.3.4. EX VİTRO TOHUM ÇİMLENME TESTLERİ	68

4.4.	TOPRAK ANALİZLERİ.....	75
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	71
6.	KAYNAKLAR.....	82



SİMGELER VE KISALTMALAR

MS	Murashing Skoog
KC	Knutson C
WVD	Wan Ves Deberg
SA	Su Agarı
TSA	Topraklı Su Agarı
OrM	Orkide Mikorizası
EM	Erikoid Mikoriza
ArM	Arbusküler Mikoriza
BAP	Benzil Amino Pürin
NAA	Naftalen Asetik Asit
pH	Asitlik Bazlık Derecesi
%	Yüzde
°C	Derece santigrat
g	Gram
mL	Mililitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
cm	santimetre
m	metre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil:3.1 Bolu- Abant Gölü Haritası (http://www.arasikackm.com/m/bolu-abant).....	40
Şekil 3.2 İkizdere Yaylaları Haritası (http://www.sanlier-zando.com).....	41
Şekil 3.3 <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i>	43
Şekil 3. 4. <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> tohumları.....	43
Şekil 3.5. Çalışma alanındaki bitki kökleri arasına gömülen tohum paketleri.....	52
Şekil 4.1 A) TTC ile boyamadan önce ve B) Boyamadan sonra <i>D. neschalkiorum</i> tohumlarının mikroskop görüntüsü.....	55
Şekil 4.2 A ve B) fungus hiflerinin hücreye girişi C) fungus hiflerinin hücreden hücreye geçişi.....	56
Şekil 4.3 Coton blue ile boyanmış izole edilen fungusların mikroskop görüntüsü A) Rize 4 (<i>Tulasnella</i> sp.) C) Rize 4 (<i>Tulasnella</i> sp.) ve B) Rize 4 (<i>Tulasnella</i> sp.) D) Rize 4 (<i>Tulasnella</i> sp.) fungal izolatlarının PDA besi ortamındaki görüntüsü.....	57
Şekil 4.4 Bolu Tem2 (<i>Ceratobasidium</i> sp.) izolatının aşılama çimlenmenin gözlemlendiği modifiye yulaf besi ortamı.....	62
Şekil 4.5 Simbiyotik doku kültüründe Bolu Tem2 (<i>Ceratobasidium</i> sp.), Rize 4 (<i>Tulasnella</i> sp.), Cimil Tem 19 (<i>Tricoderma</i> sp.) ve Garzavan Tem 19 (<i>Pezizaceae</i> sp.) funguslarının ve Kontrol grubunun gelişim aşamalarına göre çimlenmeye etkisi.....	63
Şekil 4.6 WVD temel ortam ve düzenlemeleri (-aa, -ia ve -iaa), SA, TSA, KC ve MS besi ortamlarının gelişim aşamalarına göre çimlenmeye etkisi.....	65
Şekil 4.7 <i>Dactylorhiza neschalkiorum</i> 'un yaşam döngüsü. A) Tohum, B) Mikorizal fungusla aşılanmış çatlamış tohum, C) Protokorm, D) Yaprak primordiumu, E) Kök çıkışı, F) Sürgün ucu ve kök oluşumu, G) İlk fotosentetik yaprak, H) Ergin birey I) Mikorizal fungus.....	66
Şekil 4.8 Doğal ortamında ana bitkiye yakın ekilen tohum paketi (çimlenme gözlenmemiş).....	67
Şekil 4.9 Doğal ortamında bitki kökleri arasına ekilen tohum paketi (çimlenme gözlenmemiş).....	67
Şekil 4.10 A) Doğal ortamında bireylerin bulunmadığı habitata toprağın 3-4cm derinine gömülen tohumların mikroskop görüntüsü, B) Toprak yüzeyinde bitki döküntüleri arasına bırakılan tohumların mikroskop görüntüsü.....	68
Şekil 4. 11 Rize Garzavan yaylası topraklarına ekilerek aynı alandan izole edilen Rize 4 (<i>Tulasnella</i> sp.) izolatının aşılandığı saksıdaki tohum paketi.....	69

Şekil 4.12 Bolu-Abant Gölü topraklarına ekilerek aynı alandan izole edilen Bolu3(<i>Ceratosporium</i> sp.) izolatu ile aşılınmış saksıdaki tohum paketi.....	69
Şekil 4.13 A) Bolu-Abant gölü topraklarına ekilen tohum paketlerine Bolu3, BoluTem2 ve BoluTem3 (<i>Ceratosporium</i> sp.) izolatının aşılınıp çimlenmenin gözlendiği saksı ve B) Bu saksıda gelişen fide.. ..	70
Şekil 4.14 A,B) İklim odasında Bolu3 (<i>Ceratosporium</i> sp.) izolatının aşılınıp çimlenmenin gözlendiği saksıdaki protokormun enine kesiti (boyama; Coton blue) C) Fungus tarafından kolonize olmuş parankima hücreleri.....	70
Şekil 4.15 Ex vitro (iklim) şartlarda <i>D. nieschalkiorum</i> tohumlarının bulunduğu saksılara inkübe BoluTem2(<i>Ceratosporium</i> sp.), Rize 4 (<i>Tulasnella</i> sp.), Cimil Tem 19 (<i>Tricoderma</i> sp.) ve Garzavan Tem 19 (<i>Pezizaceae</i> sp.) funguslarının ve Kontrol grubunun gelişim aşamalarına göre çimlenmeye etkisi.....	65
Şekil 4.16 Ex vitro (sera) koşulda <i>D. nieschalkiorum</i> tohumlarının bulunduğu saksılara inkübe edilen BoluTem2 (<i>Ceratosporium</i> sp.) fungusunun ve Kontrol grubunun gelişim aşamalarına göre çimlenme etkisi.	73
Şekil 4.17 Ex vitro, sera ve iklim odası koşullarında <i>D. nieschalkiorum</i> tohumlarının bulunduğu saksılara inkübe edilen BoluTem2 (<i>Ceratosporium</i> sp.) fungusunun gelişim aşamalarına göre çimlenmeye etkisi.....	74

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1 Çalışma alanları ve rakımları	40
Tablo 3.2. Fungus izolasyon ortamı ve modifiye yulaf besi ortamının içeriği (Clements vd. 1986).....	44
Tablo 3.3 CTAB (Hekzadesil trimetil amonyum bromit) buffer hazırlama (100 ml).....	47
Tablo 3.4 PCR için karışım.....	48
Tablo 3.5 PCR reaksiyon şartları.....	49
Tablo 3.6 Asimbiyotik tohum çimlenmesinde kullanılan temel besin ortamları WVD (Wan Ves Deberg), KC (Knutson C), MS(Murasing Skoog) ve WVD ortamındaki bazı düzenlemeler (-aa (amino asit eksik), -ia (inorganik asit eksik) , -iaaa (ingorganik asit eksik), su agarı (SA), TSA (Topraklı su agarı).....	51
Tablo 3.7 İn vitro gelişim aşamaları	53
Tablo 3.8 PH (TS 8332), Azot (Nelson, D.W. and Sommers, L.E., 1973), Potasyum (Jackson, M.L., 1967), Organik Madde (Smith, H.W. And Weldon, M.D., 1941) ve toprak tekstürü analizlerinin (Bouyoucos, G.J., 1951) göre değerlendirilmesi.....	54
Tablo 4.1 Rize’ den izole edilen fungal izolatlar ait morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi.....	59
Tablo 4.2 Bolu’ dan izole edilen fungal izolatlar ait morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi.....	60
Tablo 4.3 Çalışma alanlarından izole edilen fungusların filogenetik ilişki GenBank ile en yakın eşleşmesi.....	61
Tablo 4.4 Simbiyotik doku kültüründe BoluTem2 (<i>Ceratobasidium</i> sp.), Rize 4 (<i>Tulasnella</i> sp.), Cimil Tem 19 (<i>Tricoderma</i> sp.) ve Garzavan Tem 19 (<i>Pezizaceae</i> sp.) funguslarının ve Kontrol grubunun çimlenme ve yüzde değerleri.....	63
Tablo 4.5 WVD temel ortam ve düzenlemeleri (-aa, -ia ve -iaa), SA, TSA, KC ve MS besi ortamlarında çimlenme ve gelişim oranları.....	64
Tablo 4.6 <i>D. nieschalkiorum</i> tohumlarının ex vitro (iklim odası) şartlarda bulunduğu saksılara inkübe edilen BoluTem2(<i>Ceratobasidium</i> sp.,), Rize 4 (<i>Tulasnella</i> sp.), Cimil Tem 19 (<i>Tricoderma</i> sp.) ve Garzavan Tem 19 (<i>Pezizaceae</i> sp.) ve Kontrol grubunda altı ay sonra çimlenme ve gelişim oranları.....	71

Tablo 4.7 Ex vitro (sera) şartlarda <i>D. nieschalkiorum</i> tohumlarının bulunduğu saksılara inkübe edilen BoluTem2 (<i>Ceratobasidium</i> sp.) ve Kontrol grubunda altı ay sonra çimlenme ve gelişim oranları.....	72
Tablo 4.8 Ex vitro (Sera ve iklim odası) koşullarında <i>D. nieschalkiorum</i> tohumlarının bulunduğu saksılara inkübe edilen BoluTem2 (<i>Ceratobasidium</i> sp.) fungusun altı ay sonra çimlenme ve gelişim oranları karşılaştırması.....	72
Tablo 4.9 Independent samples T test ile BoluTem2(<i>Ceratobasidium</i> sp.) ‘nin sera ve iklim koşullarında çimlenmeye etkisi.....	74
Tablo 4.10 Çalışma alanlarından ve bireylerin bulunmadığı habitattan alınan toprak örneklerinin kimyasal içeriği.....	75

1. GİRİŞ

Orchidaceae familyası, tür sayısı en fazla olan çiçekli bitki familyalarından biri (Chase vd., 2015; Givnish vd., 2015; Willis, 2017) olup dünyada 800 cins ve 29.199 tür ile temsil edilmektedir (Govarets vd. 2017). Ülkemizde ise tamamı karasal olan 24 cinse ait 170 orkide türü olduğu bilinmektedir (Djordjevic ve Tsiftsis 2020). Orkideler epifitler, litofitler ve toprakta kök salan karasal orkideler olmak üzere üç grupta toplanabilir (Arditti 1979). Epifit orkideler tropikal orman bitkilerinin kabukları üzerinde yaşayan, klorofilli ya da klorofilsiz bitkilerdir (Gravendeel vd., 2004; Swarts ve Dixon 2009). Litofitler kayalar üzerinde yaşarlar ve kayalar üzerinde oluşan boşluklardan besin elde etmeyi sağlayan rizomlara sahiptirler (Weston vd, 2005). Ilıman kuşak orkideleri toprak altında yumru (tuber), rizom ya da kök taşır (Rasmussen ve Whigham, 2002; McCormick vd, 2004). Orkide türlerinin yaklaşık %70'i epifitik/litofitik, %25'i karasal ve %5'i büyüme alışkanlıklarında çeşitlilik göstermektedir (Arditti, 1992). Epifitik orkidelerin çoğu tropikal ormanlarda görülür ve karasal orkidelerin çoğu Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'nın daha soğuk bölgelerinde bulunur, birkaç karasal cins ise ılıman ve tropikal enlemlere yayılır (Givnish vd., 2015).

Tüm orkideler çok yıllıktır ve birçok tür uzun ömürlüdür (Tamm, 1972; Inghe ve Tamm, 1988). Ayrıca, orkideler orkide mikorizası (OM) adı verilen benzersiz bir mikorizaya sahiptir. Orkideler binlerce tohum üretebilir, ancak çok azı olgunluğa ulaşacak kadar hayatta kalır (Shefferson vd. 2020). Orchidaceae tohumları bütün çiçekli bitki tohumları arasında en küçük olanıdır, rüzgârla dağılır ve besleme fonksiyonlu bir doku olan endospermi gelişmemiş küçük bir embriyo ile karakterize edilmektedir (Eriksson ve Kainulainen 2011). Bu nedenle doğal şartlar altında tohumlar fotosentetik olmayan protokormun gelişimini kolaylaştırmak için bir karbonhidrat kaynağı olarak mikorizal funguslarla kolonileşmeye ihtiyaç duyarlar, ancak yaşamları boyunca bu kaynaktan karbon almaya da devam edebilirler (Leake 1994; Smith ve Read 2008; Gebauer vd., 2016). Bazı türler mikorizayı tek karbon kaynakları olarak kullanacak şekilde evrimleşmişlerdir (Bidartondo, 2005; Jacquemyn ve Merckx, 2019). Orkideler tohum çimlenmesi için funguslara bağımlı olup bazı funguslarla da spesifik bir ilişkiye sahiptir (PHillips vd., 2014). Bu nedenle çimlenme, uygun fungusun varlığında köklerde mikorizal birlik kurulduğunda gerçekleşebilmektedir. Fakat köklerdeki mikorizal birliğe katılan her fungus orkide tohumlarının çimlenmesini teşvik etmeyebilir ve mikorizal birliğe katılan funguslar,

mevsimsel olarak da değişebilmektedir (Rasmussen, 2002). Uyumlu orkide mikorizal funguslarının varlığı, orkidelerin belirli bir habitatta bulunup bulunamayacağını belirleyen en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmiştir ve bu nedenle orkide popülasyonlarının dağılımını ve bolluğunu yönlendiren önemli bir faktör olarak görülmektedir (McCormick ve Jacquemyn, 2014; McCormick vd., 2018).

Funguslar orkide köklerinde kortikal hücrelerde peletonlar olarak adlandırılan yoğun miselum yumakları oluştururlar (McCormick ve Jacquemyn, 2014; McCormick vd., 2018; Rasmussen ve Rasmussen 2009). Orkideler hem canlı hem de bozulmuş haldeki pelotonlardan besin elde eder (Bougoure vd., 2014; Kuga vd., 2014). Çoğu orkide, serbest yaşayan ve saprofit olan ve Basidiomycota'ya ait *Rhizoctonia* benzeri funguslarla simbiyoz oluşturur (Rasmussen 2002). Bu funguslar genellikle *Rhizoctonia*, *Ceratobasidium* ve *Tulasnella* cinslerine aittir. Orkideler ile mikorizal birlik oluşturan funguslar topraktan çeşitli besinleri ve suyu almada bitkiye yardımcı olurken, bitki fungusa fotosentez ürünlerini aktarmaktadır (Rasmussen, 1992).

Orkide tohumları basit bir tasarıma sahiptir; ancak, tohum kabuğu çok serttir ve nüfuz etmesi zor olabilir, bu da çimlenme ve canlılık testleri için sorunlar yaratır (Van Waes ve Debergh, 1986). Orkide tohumunun canlılığı tozlaşma zamanından olgunluğa kadar değişir, zaman ilerledikçe tohum kabuğu giderek daha çok suyu nüfuz edemez hale gelir ve bu da daha az çimlenme yüzdesine yol açar (De Stefano vd., 2022; Dowling ve Jusaitis, 2012). Çimlenme sırasında orkide tohumlarının farklı büyüme aşamaları vardır: tohum tarafından suyun emilimi, tohumun su alarak şişmesi, protokorm oluşumu, gelişmekte olan yapraklar, fide oluşumu ve belirgin köklere ve iki veya daha fazla yaprağa sahip fide aşaması (Srivastava vd., 2015).

Orkideler tohumların çimlenmesine göre üç kategoriye ayrılabilir:

a) Asimbiyotik koşullar altında, örneğin Knudson C ve Vacin- Went ortamları gibi besi yerlerinde kolayca çimlenen,

b) Asimbiyotik olarak çimlenmesi daha zor olan ve asimbiyotik çimlenme için örneğin Murashige ve Skoog (1962) ortamı gibi, özel ortam ve kültür koşullarına gereksinim duyan,

c) Asimbiyotik olarak çimlenmeyen ve çimlenme için simbiyontlara bağımlı olan (Arditti 1967; Arditti ve Ernst 1984).

Knudson (1946) tarafından asimbiyotik bir tohum çimlenme yönteminin ve Morel (1960) tarafından sürgün ucu kültürünün yapılması, orkide çoğaltma yöntemlerinin geliştirilmesinde bir başlangıç olmuştur (Lo vd. 2004).

İn vitro asimbiyotik tohum çimlenmesi ve protokorm gelişiminin başarısını etkileyen temel unsurlar arasında makro ve mikro element bileşimleri, vitaminler, sakkaroz, nitrojen, karbonhidratlar ve organik besinler bulunur (Dutra vd. 2008; Paul vd. 2012). Benzil aminopurin (BAP) ve naftalin asetik asit (NAA), gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin faydalı etkileri, bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenmiş çeşitli bazal ortamlar kullanılarak başarılı tohum çimlenmesi rapor edilmiştir (Hossain 2008;Roy vd., 2011).

Bu çalışmada, Türkiye için endemik olan *D. nieschalkiorum*'un Doğu ve Batı Karadeniz popülasyonlarındaki mikorizal fungus çeşitliliği, bu fungusların tohum çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkileri, tohumların canlılık süresi (ömürleri), in situ çimlenme süreci, in vitro simbiyotik ve asimbiyotik çimlenme ve fide gelişim koşulları araştırılmıştır.

Habitatında yapılan gözlemlerde yayılış alanındaki birey sayısının oldukça düşük olması tohum çimlenmesinin zorluğunu ortaya koymaktadır. Bu amaçla in vitro ve ex vitro koşullarda çimlenme ve gelişiminin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle doku kültüründe asimbiyotik, simbiyotik gelişim testleri için Murashing Skoog (MS), Knutson C (KC), Wan Ves Deberg (WVD) ve modifikasyonları ve topraklı su agarı (TSA) besi ortamları kullanılmıştır. Ayrıca doğal ortamda çimlenmesinin gözlenmesi için izole edilen fungusların aşılандığı toprak kültüründe çimlenme testleri iklim odası ve sera koşullarında gerçekleştirildi. Habitatında da tohum çimlenmesinin gözlenmesi amacıyla bireylerin bulunduğu alanlara tohum paketleri gömülerek izlenmiştir.

Çalışmamız bu tür için ilk olup yayılış alanının Trabzon iline kadar olduğu bilinmekteydi (İşler., 2022). Tezimiz için yapılan ön araştırmada ve daha sonra çalışma esnasında Rize ve çevresinde türün varlığı tespit edilmiş ve pek çok yaylada yayılış gösterdiği gözlenmiştir. Türün doğada seyrek bulunuşu ve birey sayısının az oluşu çimlenme zorlukları ile karşı karşıya olduğunu göstermekteydi ve bu sorunun çözülmesi gerekliydi. Çalışmamızda daha önce çalışılmamış endemik bir türün çimlenme sorunlarına çözüm bulmaya çalışılmış ve daha sonraki çalışmalar için yol gösterici olması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Orchidaceae, Asteraceae'den sonra en büyük ikinci çiçekli bitki familyasıdır, tahminen 25.000-30.000 tür ile tüm damarlı bitki türlerinin %8'ini oluşturur. (Dressler 1981; Govaerts vd., 2021). Antarktika hariç tüm kıtalarda ve çok çeşitli tropikal ve ılıman habitatlarda, dünyanın biyolojik çeşitliliğine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Chase vd., 2015; Givnish vd., 2015; Hassler, 2022). Orkide bakımından zengin alanlar arasında Güney Amerika'nın kuzey And Dağları, çoğunlukla epifitik türler bulunduran Madagaskar, Sumatra ve Borneo, hem epifitik hem de karasal türler bulunduran Çinhindi ve karasal orkide zenginliğinin merkezi olarak Güneybatı ve Batı Avustralya yer almaktadır (Cribb vd., 2003).

Orkideler epifitler, litofitler ve toprakta kök salan karasal orkideler olmak üzere üç grupta toplanabilmektedir. Epifit orkideler tropikal orman bitkilerinin üzerinde yaşayan, hayatta kalmak için konakçı ağaçlara bağımlı orkideklerdir (Hu vd., 2022a, Zotz, 2013). Litofitler kayalar üzerinde yaşamaktadırlar. Ilıman kuşak orkideleri (karasal orkideler) toprak altında yumru (tuber), rizom ya da kök taşır. Epifitik orkideler genellikle kalın hücre duvarlarına, kütiküllere ve batık stomalara sahip etli yapraklarla karakterize edilirken, karasal orkideler rizomlara, soğanlara veya yumrulara sahiptir (Zhang vd. 2018).

Dünya Koruma Birliği'ne (IUCN, 1999) göre soyu tükenmiş türlerin neredeyse yarısı karasal türlerdir. Bu nedenle, karasal orkideler, özellikle mevcut iklim değişikliği nedeniyle çok sayıda tehdit oluşturan süreçlerin bir sonucu olarak daha büyük bir yok olma riski altındadırlar (Swart ve Dixon, 2009; Wraith ve Pickering, 2019, Phillips vd., 2020). Ayrıca, birçok tür aşırı toplama, habitat kaybı veya iklim değişikliği nedeniyle de vahşi doğada yok olma eşiğindedir (Liu vd., 2015a, 2020; Gale vd., 2018; Hinsley vd., 2018; Wang vd., 2019). Bunların yanında, çoğu orkide özel habitatlar gerektirir ve genellikle tozlayıcılara, simbiyotik çimlenme funguslarına ve epifitik türler için konukçu ağaçlara yüksek oranda bağımlı olan küçük popülasyonlarda bulunur, bu da onları özellikle yok olmaya karşı savunmasız hale getirir (Roberts ve Dixon, 2008; Selosse, 2014; Rasmussen vd., 2015).

Orkideler yüzyıllardır insanlar tarafından çeşitli amaçlarla özellikle tıbbi amaçlı kullanılmakta olup, son yıllarda, sıcak salep içecekleri ve salep bazlı dondurmalar ile diğer yiyecek ve tıbbi ürünlere olan yüksek talep nedeniyle yabani karasal ve yumrulu orkidelerin yumrularının toplanmasına ilgi artmıştır. Bu nedenle karasal orkidelerin

diğer orkide türlerine göre daha fazla sayıda türün nesli tükenme tehdidi altındadır (Anghelescu vd. 2023).

En egzotik yapıları, her yerde bulunmaları nedeniyle önemi her geçen gün artan orkidelerin ticari düzeyde yetiştirilmesi dünya çapında ivme kazanmıştır. Orkide endüstrisi, süs ve estetik değerinin yanı sıra, gelişmekte olan ülkelerdeki insanlar için de istihdam yaratmıştır. Özellikle çiçekçilik, gıda sektörü ve tıptaki kullanımının artması ve önemi multimilyon dolarlık bir küresel pazarla orkidelerin ticarileşmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (Hossain vd., 2013; De 2015).

Orkidelerin melezlerinin oluşturulmasında kullanılan biyoteknolojik müdahalelerdeki son gelişmeler, yeni özelliklere sahip egzotik çeşitlerin geliştirilmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Buna ek olarak, orkide biyolojisindeki bilimsel gelişmeler, orkide sınıflandırması, fitokimyası ve yetiştirme stratejileri alanlarındaki bilgi boşluklarını önemli ölçüde kapatmıştır (Tiwari vd. 2024).

Ülkemizde her yıl yaklaşık 20 ton kadar bitki salep üretmek amacıyla doğadan sökülmetedir. Bu da yaklaşık 30-40 milyon orkidenin yok edildiği anlamına gelmektedir (Sezik, 2002). Son yıllarda salep kullanımının çeşitlenmesi (dondurma ve sıcak salep içeceği yapımı), orkidelerin yetiştigi alanlara; ulaşımın kolaylaşması, turistik tesislerin artması, nüfus artışı, şehirleşme gibi nedenlerle orkideler aşırı bir şekilde tahrip edilmektedir (Sezik vd., 2007). Sezik (2014) çalışmasında her geçen yıl orkidelerin sayılarının azalmasının yanında bazı türlerin uzun aramalara rağmen artık bulunamadığını belirtmiştir.

Ülkemizde salep elde etmek için *Anacamptis*, *Dactylorhiza*, *Himantoglossum*, *OpHrys*, *Orchis* ve *Serapias*, *Comperia*, *Barlia*, *Aceras* ve *Neotinea* cinslerine dahil türler toplanmaktadır (Sezik, 2002; Parlak ve Tutar, 2011).

Orkidelerin özellikle salep ve tıbbi amaçla doğadan aşırı bir şekilde sürdürülemez/ yasadışı toplanması, iklimsel dalgalanmalar ve tehdit altındaki yaşam alanları ve tahribatı, karmaşık yaşam döngülerini araştırmak için önemli zorluklara yol açmaktadır. IUCN Küresel Kırmızı Liste istatistiklerine göre 948 orkide türü için 2017 yılında %56,5'i tehdit altında olarak sınıflandırılmıştır (Uluslararası Doğayı Koruma Birliği, 2017). Ayrıca orkidelerin, restorasyonu/koruması büyük zorluk teşkil etmekte ve daha geniş düzeylerde entegre koruma önlemlerine yönelik acil bir gerekliliğin altın çizilmektedir (Tiwari vd. 2024).

Sonuç olarak, orkidelerin büyük bir kısmı hala doğal ortamlarında yetişmektedir. Tüm orkideler, yasa dışı ticareti yasaklamak için 2017 yılında Nesli Tehlike Altında Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme'nin (CITES) I ve II. Eklerinde yer almıştır (Gale vd., 2018; Hinsley vd., 2018). Küresel Uluslararası Doğayı Koruma Birliği (IUCN) tarafından Tehdit Altındaki Türlerin Kırmızı Listeleri için 2021 yılında dünya çapında 1770 orkide türü üzerindeki değerlendirmelere göre, orkide türlerinin yaklaşık yarısı (%46,5) üç tehdit kategorisinden (hassas, tehlikede ve kritik olarak tehlikede) biri kapsamındadır (IUCN, 2021). Yeniden yerleştirme (Reintroduction), nesli tükenmekte olan bir türün in vitro ya da ex vitro koşullarda üretilen bireylerinin, yeni populasyonlar oluşturmak üzere doğal habitatına veya kontrollü ekolojik alanına yerleştirilmesi anlamına gelir (Zhao vd., 2021). Nesli tükenmekte olan orkideler için reintrodaction çalışmalarının zorunluluğu ortaya çıkmıştır.

Ex situ ve in situ koruma, yeniden yerleştirme ile birlikte, tehdit altındaki bitki türlerinin korunması için başvurulacak yöntemlerdir (Oldfield, 2009). Orjinal doğal yaşam alanlarından yoksun bırakılan bitkiler için, botanik bahçelerinde ex situ koruma, kısa ve orta vadede hayatta kalmalarının tek yolu olabilir (Ren vd., 2014).

Ex situ korumanın aksine, in situ korumanın sürdürülebilir biyoçeşitliliğin korunması için daha etkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, prosedürler karmaşık ve çok yönlüdür. Korunan alanların hem bakımını ve yönetimini hem de tür ve popülasyon seviyelerinde gerekli eylemleri içerir. Şimdiye kadar, tür düzeyindeki önlemler, tehdit altındaki bitkilerin yalnızca çok küçük bir yüzdesi için birkaç ülke tarafından üstlenilmiş ancak sınırlı bir başarı elde edilmiştir (Heywood, 2015). Aslında, söz konusu türlerin çok sayıda olması ve geniş coğrafi dağılımları nedeniyle, nesli tükenmekte olan orkidelerin çoğu için etkin bir yerde koruma sağlamak zordur (Zhao vd., 2021).

Nesli tükenmekte olan türleri korumak için temel ve etkili bir önlem olarak, tek tek bitkilerin doğal yaşam alanlarına yeniden yerleştirilmesi, özellikle birçok orkide türü gibi nesli tükenme tehlikesiyle karşı karşıya olan bitkiler için, dünya çapında daha önemli bir hal almıştır (Oldfield, 2009).

Orkidelerin Plio Plestosende (5 milyon yıl önce erken buzul devri) epifitik olarak, tersiyer dönem boyunca dağılmış olduğu ve Kreteas dönemde Malezya' da ortaya çıktığı düşünülmektedir (Janssen ve Bremer 2004). Orkidelerin kökenleri milyonlarca yıl öncesine gittiği ileri sürülse de buna dair bilgiler zayıf fosil kanıtlarına

dayanmaktadır ve bu familyanın kaç yaşında olduğu uzun süredir tartışılmaktadır (Ramirez vd., 2007). 2005 yılında Harvard Üniversitesi bilim adamları Dominik Cumhuriyeti'nde soyu tükenmiş, 15-20 milyon yaşında olan, bir arı fosilinin yanında buldukları polenin orkidelere ait olduğunu keşfetmiştir (Ramirez vd., 2007). Hem polenlerin morfolojisine hem de ilgili fosil bitkilerinin moleküler genetiğine dayanan bazı analiz yöntemleri kullanılarak yapılan araştırmada bulunan polenin *Mellorchis caribea* 'a ait olduğuna karar verilmiştir. Schiff (2018) günümüz orkidelerinin ortak atalarının ortaya çıkışını 76-84 (ortalama 80) milyon yıl olarak hesaplamıştır. Bu çalışmanın sonuçları 2016 yılında, on beş “orkide sistematigi, filogenetik, ekoloji ve biyocoğrafya uzmanından” oluşan uluslararası işbirliğiyle yapılan araştırmalarla dikkat çekici bir şekilde tutarlılık göstermektedir. Orkideler, Avustralya'da 102 ila 120 milyon yıl önce ortaya çıkmış gibi görünüyor, daha sonra, 79.7 ila 99.5 milyon yıl önce, Antarktika üzerinden Neotropiklere yayıldığı düşünülmektedir (Givnish vd., 2016).

Orkidelerin varlığına dair en eski referans Çin tıbbının babası olarak kabul edilen Shen Nung (yaklaşık M.Ö. 2695) tarafından *Materia Medica* adlı eserde yapılmıştır. Bu eserde *Dendrobium* türlerinin tıbbi özelliklerinden bahsedilmektedir. Daha sonra Çinli filozof Konfüçyüs (M.Ö. 551-479) yazılarında orkidelerden ve onlara olan sevgisinden bahsetmiştir (Schiff, 2018).

Avustralya 1700 türden oluşan zengin ve oldukça endemik orkide florasına sahip bir ada kıtasıdır; Dünyada nesli tükenmiş orkidelerin % 25'i Avustralyalıdır (Koopowitz, 2001). Kuzey ve doğu yağmur ormanlarında ve sık sarılıcı bitki çalılıklarında epifit ve litofitlerle, güney ılıman bölge karasal orkideleri tarafından temsil edilmektedir (Dixon ve Hopper, 1996; Jones, 2006).

Avrupa orkideyi, Akdeniz Bölgesinde yer altında büyüyen oval şekilli yumrulara sahip bazı orkide cinslerinin çeşitli türleri ile tanımışlardır. Büyük Yunan bilgini Theophrastos (yaklaşık M.Ö 371-287), on ciltlik muhteşem *Historia Plantarum*'un dokuzuncu cildinde, orkide yumrularının tıbbi özelliklerinden ilk kez söz etmiştir. Yunan doktor ve bitki uzmanı Pedanius Dioscorides (yaklaşık MS 40-90) *De Materia Medica* adlı eserinde orkidelerin afrodisyak etkisinden bahsetmiştir (Schiff, 2018).

En eski Avrupa orkidelerinin varlığı bir bitkinin tıbbi kullanıma dayalı sınıflandırmasının yapıldığı antik Yunan ve Roma'ya kadar uzanmaktadır. Yunanlılar

ve Romalılar, bitkinin insan anatomisine benzeyen kısmının vücudun o kısmını tedavi edebileceğine inanıyorlardı (Schiff, 2018).

Birkaç Botanikçi on dokuzuncu yüzyılın ikinci yarısında orkide mikorizasını görmüştür, fakat bunlardan sadece biri önemini anlamıştır. Chatin (1856, 1858) kök hücrelerindeki funguslara işaret eden iki makale yayınlamıştır (Yam ve Arditti, 2009).

Orkide çimlenmesi için ilk metot 160 yıl önce David Moore (1849) tarafından geliştirilmiştir (Arditti 1984; Yam vd. 2002). Moore' un keşfinden sonraki yüzyılın ikinci yarısında Noel Bernard (1874-1911) *in vitro* koşullarda orkide tohumlarının simbiyotik çimlenmesi için bir metot geliştirmiştir (Boullard 1985; Arditti 1990; Rasmussen 1995; Yam vd. 2002).

Lewis Knudson'nın orkide tohumlarının asimbiyotik çimlenme için geliştirdiği metod (saf kültürde herhangi bir bitkinin *in vitro* çoğaltılması için) ilk yöntem olmuştur (Knudson 1921, 1922; Yam vd. 2002). Genellikle epifitik ve karasal türler için farklı teknikler kullanılır, ancak büyüme ortamı ve koşulları türe özgü olabilmektedir, bu da çoğu tür için özelleştirilmiş protokollerin gerekli olacağını göstermektedir (Jolman vd. 2022).

Karasal orkideler hem Türkiye'de hem de dünyada birçok yönden büyük önem taşımakta ve üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bir bitki popülasyonunun canlılığı ve devamlılığı için tohum çimlenmesi ve fide büyümesi çok önemlidir. Orkide tohumlarının en ayırt edici özellikleri çok küçük, endospermsiz ve gelişmemiş embriyoya sahip olmalarıdır. Orkidelerin 'toz' gibi tohumları çok küçük boyutta olduğu için meyveden çıktığı andan itibaren hareketini takip etmek zor olmaktadır. Çok sayıda tohum çok geniş alana yayılmakla birlikte nasıl ve ne kadar sürede çimlendiği, ne kadar süre canlı kaldığı ile ilgili bilgiler hala yetersizdir. (Batty vd., 2001; Rasmussen 2002; Kömpe vd. 2020; Kömpe vd. 2021). Orkide tohumları besin rezervi içermediğinden, simbiyont funguslar tarafından karbon ve mineral sağlandığında başarılı olarak çimlenme gerçekleşir (Ingold ve Hudson, 1993; Dearnaley vd, 2012).

Orkide tohumlarının testaları tohumun suda yüzmesini sağlayan hidrofobik lipit tabakasıyla kaplı ve hava ile doludur (Arditti ve Ghani, 1999). Testa dış integumentlerden meydana gelir, ancak *PapHiopedilum delenatii*'de testa hem iç hem de dış integumentlerden meydana gelir (Molvray ve Kores 1995; Lee vd, 2006). Çoğu türde testa genellikle yalnızca bir hücre kalınlığında olup, 20 ile 600 hücreden oluşur (Molvray ve Kores, 1995; Prutsch vd, 2000). Orkide tohumlarının testası çökmüş

hücre duvarları nedeniyle havaya direnci artıran yüzeysel oyuklar bulundurur (Barthlott, 1976; Boesewinkel ve Bouman, 1984).

Genellikle olgun kapsül kuru havada parçalanarak, rüzgarla dağılım için optimum şartlar altında tohumlar serbest kalır. Randley (1930)' a göre orkide tohumlarının büyüklüğü ve yapısı kurduğunda rüzgârla etkili dağılım için iyi bir donanım sağlamaktadır. Aslında orkideler rüzgârla dağılan diğer çiçekli bitkilerin herhangi birinden daha fazla göç edebilir (Rasmussen 1995). *Orchis militaris* 'in İngiltere'de 100 km'den daha uzak alanlara yerleştiği ve *O. simia* fideleri bilinen tohum kaynağından 50 km kadar uzaklıkta bile gözlenmiştir (Willems, 1982). Randley (1930)' a göre Azor'daki Atlantik Adasının orkide florası üç tür içermektedir, bunların hepsi karasal olup Portekiz'de yaklaşık 1500 km uzakta meydana gelen türlerle yakından ilişkilidir (Rasmussen 1995). Lehaie, (1910) bu coğrafik yayılımdan çıkarılan uzun mesafeli dağılımı orkidelerde şimdiye bilinen en uç nokta olduğunu belirtmiştir (Rasmussen 1995).

Arditti ve Ghani (1999) ve Arditti ve Ernst (1993) orkide embriyosunun genellikle oval ya da küresel olduğunu belirtmiştir (Utami ve Hariyanto, 2019). Orkide tohumları küçük bir embriyoya sahip olup, endosperm dokusunu kaybetmiş ve polisakkaritleri metabolize edecek enzimlerden yoksun olmasına karşılık ana besin kaynağı olarak lipitleri kullanabilir. Ayrıca embriyo lipidi çözünür şekere dönüştürecek enzimlerden de yoksundur (Mannig ve Van Staden, 1987). Enzim yokluğundan dolayı, orkide tohumları doğal koşullar altında çimlenmek ve bitki gelişimi için mikorizal funguslarla ilişkiye bağımlıdır (Rasmussen 1995; Batty vd., 2001; Smith ve Read 2008).

Fungal karbona bağımlılıklarına dayanarak yetişkin orkideler;

1) Erken gelişim aşamasında funguslara bağımlı olan ancak fotosentetik yapıları geliştikçe karbona daha az bağımlılık gösteren ototrofik orkideler

(2) Klorofilsiz olan ve yaşamları boyunca tamamen fungus karbonuna bağımlı olan mikoheterotrofik

(3) Fotosentezden ve yetişkinlikte karbon bileşikleri alabilen miksotrofik orkideler (Dearnaley vd., 2012) olarak sınıflandırılabilir.

Orkidelerin funguslarla ilişkisi tohuma karbonhidrat, besin, mineral ve su sağlar (Rasmussen, 1995). Fungusun tohuma nüfuz etmesiyle, fungal hifler embriyo gelişimi

için gerekli olan karbonhidrat kaynağını sağladıktan sonra sindirilmektedir. İmbibisyonla çimlenme başladığında funguslar bir su kaynağı da olarak hizmet edebilmektedir (Yoder vd. 2000).

Funguslar tüm damarlı bitkilerin kökleriyle etkileşime girer, bunların % 85'i mikoriza adı verilen karşılıklı simbiyotik bir ilişki oluşturur (Van der Heijden vd., 2015), bu ilişki bitki beslenmesinin yanı sıra toprak biyolojisi ve kimyası için de çok önemlidir (Smith ve Read, 2008; Brundrett ve Tedersoo 2018). Bu karşılıklı ilişkide bitkiler, fungustan su ve mineral besinleri (özellikle fosfor) alır ve biyotik ve abiyotik streslere karşı korunurken, konukçu bitkiler fotosentez sonucu elde ettiği karbonu fungusa sağlar (Smith ve Read, 2008; Köhler vd., 2018; Tedersoo ve Bahram, 2019; Kakouridis vd., 2022). Orkide fungus ilişkisinde fungus varlığı bitkinin hastalıklara direncinde etkilidir. *Bletilla striata*'da oluşturulan patojen hasarına karşı, bitki köklerinin *Tulasnella* ile kolonize edildiğinde enfeksiyonun neden olduğu fotosentetik hasarı önemli ölçüde azaltmıştır (Pujasatria vd. 2024). Orkidelerin mikorizal funguslarla ilişkisi, bitkinin hayatı boyunca devamlılık gösterir (Cameron vd. 2006; Rasmussen ve Rasmussen 2009 ; Swarts ve Dixon 2009 ; Dearnaley vd. 2012). Orkide mikorizal fungusları genellikle Basidiomycetes'e dahildir (Rasmussem 2002; Dearnaley 2007) ve çoğunluğu *Rhizoctonia* benzeri funguslar olup *Ceratobasidium*, *Sebacina* ve *Tulasnella* cinslerinin üyelerini içerir (Zelmer ve Currah, 1997; Ma vd. 2003; Otero vd. 2005; Smith ve Read 2008; Selosse vd., 2022). Ancak birkaç orkide türü, filogenetik konumları ve/veya orkide köklerinden beslenmeleriyle ilgili ekolojik özellikleri (örneğin toprak saprobik veya ektomikorizal funguslar) bakımından *Rhizoctonia*'dan farklı olan diğer fungus taksonlarıyla ilişki kurabilir (Selosse vd., 2022). Orkide tohumları sınırlı besin kaynaklarından dolayı en azından fotosentetik safhaya kadar fungal birliğe tamamen bağımlıdır (Rasmussen 1995). Orkidelerdeki mikorizal ilişkiler çimlenme sırasında zorunludur, ancak yeşil yapraklı türlerde bitkinin ototrofik yapısı nedeniyle zamanla kapsamı azalır (Cameron vd., 2008 ; Giralanda vd., 2011 ; Wang vd., 2023).

Tüm canlı organizmalar, hayatta kalabilmek için esasen çevrelerindeki organizmalarla etkileşime girer ve iletişim kurar. Tüm ortakların birliktelikten faydalanması durumunda oluşturdukları etkileşime simbiyoz denir (Mohammadi vd. 2011). Bitkilerin % 90'ından fazlası, çeşitli çevresel mikroorganizmalarla simbiyotik bir ilişki kurar (Selosse vd.2004; Bonfante ve Genre, 2010). Mikorizaların hem bitkilere hem de funguslara iyi bilinen faydalarından biri besin alış verişidir. Örneğin,

funguslar temel olarak bir arada bulundukları bitkilerden karbon (C) kaynağı elde ederler ve buna karşılık bitkinin mineral veya su alma kabiliyetini arttırmaları ve daha sonra bitki büyümesinin ve üremesinin gelişmesine katkıda bulunurlar (McCormick ve Jacquemyn 2014). Bu çift yönlü değişimi bitki kökü ile toprak arasında kritik bir bağlantı sağlar. Tüm mikorizal ilişkiler simbiyotiktir, ancak bazıları karşılıklı değildir (Brundrett, 2004). Ayrıca, fungusların simbiyotik bitkilerin kuraklık, tuzluluk, çok yüksek ve düşük sıcaklık gibi abiyotik streslere ve patojenler ve böcekler dahil biyotik streslere toleransına da katkıda bulunduğu bilinmektedir (Singh vd. 2011). Doğada, 6.000'den fazla fungus türünün, yaklaşık 240.000 bitki türü ile mikorizal ilişkiler kurabildiği bilinmektedir (Singh, 2007).

Mikorizal simbiyoz, bitkilerle fungus simbiyozunun en eski ve en yaygın şeklidir. 'Mikoriza' terimi ilk olarak 1885'de Frank tarafından orman ağaçlarının değiştirilmiş kök yapılarını tanımlamak için kullanılmıştır ve o zamandan beri funguslar ve bitki kökleri arasındaki mutualist, simbiyotik bir dizi ilişkiyi kapsayacak şekilde genişletilmiştir (Smith ve Read, 2008). Birçok karasal bitkinin köklerinde funguslarla simbiyotik ilişki meydana gelir. Mikoriza, aktif bitki büyümesi dönemlerinde köklerin kortikal dokusunu kolonize eden bitkiler ve funguslar arasındaki birliktelik veya simbiyozlar olarak tanımlanır (Brundrett, 2004). Mikoriza terimi köklerle fungusun birlikteliğini ima etmesine rağmen, ilişki topraktan besin absorpsiyonuna katılan mikorizal birlik olarak da adlandırılmaktadır (Mohammadi vd.2011).

Mikorizal fungusların asıl önemi, ekosistemlerin birincil üreticileri olan bitkilerin büyümesi için gerekli olan besin maddelerini ve bu besinlerin yer değiştirmesi için kanallar sağlamaktır. Konukçu bitki kök sistemlerinin besin emici yüzey alanını artırmanın yanı sıra, mikorizal fungusların ekstra radikal miselyumu, fotosentezle üretilen karbonun topraktaki mikrositlere taşınması için doğrudan bir yol ve diğer mikroorganizmalarla etkileşim için geniş bir yüzey alanı sağlar (Finlay, 2008). Bitkiler fungusun topraktan elde ettiği minerallere karşılık fotosentez yoluyla elde edilen karbonu değiş tokuş eder (Smith ve Read, 2008). Örneğin ektomikorizal bitkiler fikse ettiği karbonun % 30'unu, azotun çoğunu değiş tokuş etmek için kendi fungusuna transfer eder (Smith ve Read, 2008).

Orchidaceae' de bitkiler hayatlarının bir kısmında kısmen veya tamamen klorofilsizdir. Hem hayatlarının bir kısmında yeşil kalan hem de tamamen klorofilsiz olan orkideler arasında ayırım fungal birliklerinin tanımlanmasıyla öne çıkar.

Rhizoctonia cinsine ait saprofitler yeşil orkidelerin fungal birliğinde son derece etkiliyken, klorofilsiz olan orkidelerin ototrofik bitkilerdeki ektomikorizayı oluşturma olasılığı daha yüksektir (Mohammadi, 2011). Orchidaceae'nin en az 200 cinsiyle ilişkili funguslar, çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlerin etkisi altında orkidelerle ilişkili fungusların analizi ve değerlendirilmesi ile tanımlanmıştır (Ma vd., 2015).

Mikorizalar genellikle anatomik yönlerine göre gruplara ayrılırlar: örneğin, konakçı bitki hücrelerinde mikorizal fungusların internal hiflerinin varlığı;

(1) Ektomikoriza: yaklaşık 5.000 fungus türü hücrelere girmez, ancak epidermal ve dış kortikal hücreleri çevreleyen bir bitki-fungus arayüzü olarak işlev gören, bir misel kılıfı oluşturur. Arayüz, bir bitki ile fungus partneri arasında çift yönlü besin transferi için kullanılır (Cardon ve Whitbeck., 2007).

(2) Endomikoriza: Funguslar, konukçu bitkilerin kök hücrelerinin içine nüfuz etmek ve içinde büyümek için arbusküller ve yumaklar gibi spesifik hif türlerine sahiptir (Bonfante ve Genre, 2010).

Endomikorizanın ana tipleri orkide (OrM), erikoid (EM) ve arbusküler (ArM) mikorizadır (Smith ve Read 2008). Vasküler bitkilerin yaklaşık % 72'si ArM, % 1.5 EM ve % 10 OrM oluşturur (Brundrett ve Tedersoo 2018).

Endomikorizalar, bitki familyalarının özgüllüğüne ve iç hifal tipine göre ektendomikorizalar, erikoid, arbutoid, monotropoid, orkide ve arbusküler mikorizalar olarak sınıflandırılabilirler (Bonfante ve Genre, 2010).

Orkide türlerindeki mikorizalar, çimlenme ve gelişme dahil tüm yaşamları boyunca oldukça önemlidir (Yeh vd. 2019). Orkide üreme ve gelişiminin erken aşamaları, özellikle orkide tohumlarının çimlenmesi, uygun mikorizal funguslar ve çevre ortamıyla olan ilişkiden büyük ölçüde etkilenir. Orkide tohumlarının başarılı bir şekilde çimlenmesi ve geliştirilmesi için ışık, toprak yapısı, nem gibi abiyotik faktörler ve mikroorganizmalar gibi biyotik faktörler dahil olmak üzere birçok çevresel faktör etkili olmaktadır. Bu faktörler sadece orkide tohumlarını değil, aynı zamanda orkideler ve mikorizal funguslar arasındaki simbiyotik birlikteliğin başarısını da etkiler (Arditti, 1967; Rasmussen ve Rasmussen, 1991; Rasmussen vd., 2015). Örneğin, simbiyotik ilişkide orkide fidelerinin organ ve fotosentetik yapıların gelişiminin ışık şiddetinden etkilendiği, buna karşın mikotropik dokuların gelişiminin ışık tarafından baskılandığı gösterilmiştir (Rasmussen vd., 2015). Ayrıca, simbiyotik olmayan mikroorganizmalar, simbiyotik ortakların rakipleri olarak hareket eder (Oehl vd.,2010; , Chen vd., 2017).

Arbusküler mikoriza, en eski ve en geniş alana yayılan formdur. Paleobotanik ve moleküler sekans verileri, ilk kara bitkilerinin yaklaşık 460 milyon yıl önce Glomeromycota funguslarıyla ilişki kurduğunu gösterir (Redecker vd., 2000). Bunun, azot bağlayan bakterilerle kök nodül ortak yaşamlarının ortaya çıkmasından yaklaşık 300-400 milyon yıl önce olduğu tahmin ediliyor. Simbiyoz, konakçı plazmalemmaya nüfuz etmeden hücre içinde büyüyen oldukça dallı fungus yapıları, 'arbusküller' ile karakterize eder (Fitter, 2005 ; Santos-Gonzalez vd., 2006).

Erikoid mikorizanın görüldüğü bitkiler, prensip olarak, yüksek arazilerde cüce çalılar ve alçak arazilerde çalılar olarak ve boreal ormanların (kutup altı ormanların) orman altı vejetasyonunda besin açısından fakir olan alanlarda büyür. Ericoid mikorizalar, dünyanın her yerindeki fundalık (şaparel) vejetasyon sistemlerindeki sıcak Akdeniz iklim bölgelerinde de oluşmakta, bu da dağılımlarını iklimsel değil besleyici faktörlerin belirlediğini düşündürür. Köklerin hücre duvarlarına nüfuz eden fungus konakçı plazmalemmasına girmeden her bir hücre içinde sarmal yapılar oluşturur (Selosse vd., 2007).

Ektomikoriza, birçok uzun ömürlü çok yıllık bitki ve ağaç köklerinde oluşan mikoriza türüdür. Ağırlıklı olarak Basidiomycota ve Ascomycota'dan oluşur ve dünya çapında 10.000 kadar fungus türü ve 8000 bitki türünde görülür (Taylor ve Alexander, 2005). Bu türler genellikle geniş bir alanı kaplayan orman ekosistemlerinin baskın bileşenlerini oluşturur. İlişkili oldukları bitki türleri genellikle soğuk, ılıman boreal veya dağlık ormanlarındaki ağaçlar veya çalılardır, ancak aynı zamanda kutup-alpin cüce çalı topluluklarını, Akdeniz bitki örtüsünü de içermektedir. Konakçı hücrelere nüfuz etmeyen funguslar ve simbiyoz, kısa köklerin her birinin etrafında bir fungus mantosu veya kılıfının varlığının yanı sıra, Hartig ağı olarak adlandırılan, epidermal ve kortikal hücreler arasında nüfuz eden bir hücreler arası hif ağı ile karakterize edilir. Manto genellikle, toprak içindeki kökten birkaç santimetre uzanabilen, az çok iyi gelişmiş bir ekstra radikal miselyuma bağlıdır. Bu ekstra radikal miselyum, orman topraklarındaki toplam mikrobiyal biyokütleinin önemli bölümünü oluştur (Wallander vd., 2001).

Monotropaceae'de görülen, mikorizal ilişki monotropoid mikoriza olarak adlandırılır. Bunlar yapısal olarak, genellikle iyi gelişmiş bir mantoyla ektomikorizaya benzerler, ancak daha yüzeysel bir Hartig ağı ile epidermal hücreler içinde büyüyen tek hifleri ve sarmal yumak benzeri yapıları oluşturur. Klorofilsiz monotropoid

bitkiler, azalmış karbon ve toprak besinleri için tamamen funguslara bağımlıdır ve karbon dolaylı olarak aynı ektomikorizal miselyumla ilişkili olan ototrofik konak bitkilerden gelir (Leake, 2004; Bidartondo, 2005).

Mikorizal ilişkinin diğer iki türünün arbutoid mikoriza ve ektendomikoriza olduğu ifade edilmiştir. Ektendomikoriza hem ektomikorizalar hem de endomikorizaların, indirgenmiş veya bulunmayan bir kılıf, genellikle iyi gelişmiş bir Hartig ağı ve aynı zamanda hücre içi penetrasyon özelliklerine sahiptir (Finlay, 2008).

Orkide mikorizası (OrM); OrM fungusları, bitki metal toleransına izin vermesi ve bitki için besin ve büyüme faktörleri sağlaması, bunun yanı sıra patojenlerin gelişimini engellemesi gibi önemli ekolojik fonksiyonlara sahiptirler (Smith ve Read 2008; Bonfante ve Genre 2010; Khare vd. 2018). Tüm bunlara rağmen ArM ve EM le karşılaştırıldığında OrM birliği tam olarak anlaşılamamıştır (Favre-Favre-Godal vd., 2020).

Mikorizal simbiyozun çoğu tipinde, fungal simbiyontlar, karbon tedarik etmek için ototrofik bitki konakçılarına bağımlıdır, ancak orkideler tarafından oluşturulan orkide mikorizasında bu bağımlılık tersine çevrilebilmektedir (Favre-Godal vd., 2020). Çoğu orkidenin yeşil yaprakları olmasına ve tam olarak yerleştiğinde ototrofik olmasına rağmen, bazı türler yetişkin aşamada klorofilsizdir ve hepsi, dışarıdan besin ve organik karbon kaynağına ihtiyaç duyar. Besin rezervleri olmayan tohumlar, başlangıçta tamamen funguslardan karbon ve azot alımına bağımlıdır. Klorofilsiz orkide türleri 'miko-heterotrofik 'olarak tanımlanırlar, bütün hayatları boyunca “uygun” funguslar yoluyla karbonu elde ederler. Bu bitkilerde koloni oluşturan fungusların başlangıçta saprotrofitik veya parazitik etkili olduğu düşünülmekteydi, ancak fungusların DNA temelli çalışmaları, çoğunun aynı zamanda diğer ototrofik bitkileri kolonize eden mikorizal funguslar olduğunu gösterdi (Leake, 2004). Yeşil orkidelerin karbon kaynakları, normalde saprofit veya bitki parazitleri olarak bilinen *Rhizoctonia* türleriyle olan ilişkiyle karşılanır (Leake, 2005).

Orkide türleri ile mikorizal funguslar arasında bir özgüllüğün varlığına ilişkin elde edilen sonuçlar, tür-tür düzeyinde kesin bir özgüllük bulunmadığını, ancak orkide-fungus ilişkisinin de tamamen rastgele olmadığını ortaya konmuştur. Batty vd. (2001), karasal orkidelerde dar veya geniş bir potansiyel özgüllüğün olabildiğini açıklamış olmasına rağmen (Arcidiacono vd., 2021)

Muir, 1989), doğal habitatlarda orkide- fungus ilişkisinin özgülüğü hala araştırılmaktadır. Orkide-mikoriza ilişkisinin özgülüğü türler arasında değişkendir (Steinfert vd., 2010). Bir orkide, birden fazla fungus türü ile mikorizal ilişki oluşturabilir (Bonnardeaux vd., 2007; Otero vd., 2004). Orkide türlerinin çoğunun birden fazla fungusla ilişki kurması ve fungus türündeki değişkenliğe konak orkide, lokaliteden daha büyük bir etkiye sahiptir (Minneken vd. 2024; Xing vd., 2020). Xing vd., (2020) orkide türlerinin aynı anda birden fazla fungusla ilişkili olduğunu göstermiştir. Çoklu fungusla ilişki kurmanın epifitik habitata yerleşen bitkilerin hayatta kalma oranını artırması için başarılı bir strateji olabileceğini öne sürmüştür.

OrM'da kolonizasyon ve konakçı penetrasyonu esnasında fungal hifler kök tüylerinin hücre duvarına veya kortikal parankima hücrelerine girmek için epidermise nüfuz etmektedir (Rich vd.. 2014). Orkidelerdeki mikorizal funguslar septat hif formundadır ve köklerde helezon şeklinde kıvrımlı yapı korteks hücreleri içinde bulunan peloton olarak bilinmektedir (Urcelay vd.,2005).

Kortikal parankimaya girdikten sonra peloton olarak adlandırılan karakteristik hif yumakları oluşur. Buna karşılık arbuskul olarak adlandırılan karakteristik arbuskular yumaklar ArM simbiyosizinde oluşur (Favre-Godal vd., 2020).

Fungusların oluşturduğu koloniler bitkinin çeşitli yaşam aşamalarında oluşur (Meng vd.. 2019b). Karasal orkidelerde, mikorizal fungusların Basidiomycetes dahil olduğu bulunmuştur (Dearnaley vd. 2012).

Rhizoctonia benzeri funguslar *Ceratohiza*, *Epulorhiza*, *Moniliopsis*, *Rhizoctonia*, *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Tulasnella* ve *Sebacina* cinsleriyle temsil edilmektedir (Warcup ve Talbot, 1967).

Tohum çimlenmesinde çimlenmeyi teşvik eden fungus türleri bazen tek başına etkiliyken bazen birden fazla fungus çimlenmede etkili olabilmektedir. Calevo ve Duffy (2023) *Anacamptis papilionacea*'nin tohum çimlenmesini orkide köklerinden izole ettikleri *Tulasnella* ve *Ceratobasidium* türlerinin teşvik ettiğini, ancak *Tulasnella* fungus türlerinin *Ceratobasidium* türlerinden daha etkili olduğunu açıklamışlardır. Ayrıca Jacquemyn vd. 'de (2014), Güney İtalya'daki farklı popülasyonlarda *Ceratobasidiaceae* ve *Tulasnellaceae* üyelerinin çoğunlukla *A. papilionacea* ile ilişkili olduğunu, Harzlı ve Kömpe (2024) de Türkiye'de *A. coriophora* tohumlarının *Ceratobasidium* sp. izolatu ile doğal koşullarda çimlenip fide aşamasına ulaştığını bulmuşlardır.

Orkide protokormlarında ve fidelerinde sıklıkla birkaç farklı fungus taksonu bulunduğundan (Bidartondo ve Read 2008), birden fazla mikorizal taksonun tohum çimlenmesini ve daha sonra fide gelişimini teşvik etmek için birlikte işlev görmesi mümkün olabilmektedir. Ancak Shao vd. (2020b), OrM ortak kültürlerinin, monokültürlere kıyasla *Dendrobium nobile*'de daha yüksek tohum çimlenme oranları ve fide gelişimi ile sonuçlanmadığını buldu. Benzer şekilde Gao vd. (2020), birkaç OrM taksonlarının protokorm aşamasına kadar tohum çimlenmesini başlatabilmesine rağmen, bir *Ceratobasidium* taksonunun fotosentetik bitki aşamasına kadar çimlenme ve gelişmeden sorumlu olduğunu buldu. Bu nedenle, OrM'nin ortak kültürlerinin, monokültürlerle karşılaştırıldığında orkide tohumlarının çimlenmesinde mutlaka daha verimli olduğu söylenemez.

Çimlenme ve fide aşamasına dahil olan OrM fungusları bazen ergin haldeki bitkide hala kalabilmektedir (Favre-Godal vd., 2020).

Hayat döngülerinde, mikotrofik protokorm aşamanın bulunması sadece orkidelere ait bir özelliktir. Orkide tohumları normal bir monokotil fide üretmez, mikorizal fungusla ilişkili birkaç milimetre uzunluğunda, küresel gövdeli, köksüz ve kotiledonsuz konik şekilli bir yapı meydana getirir ve bu yapıya protokorm adı verilmektedir. Bu gövde ilk kez Beer (1863) tarafından tanımlanmıştır. Original olarak belirli likopodların genç sporofitlerinde gözlenen bir yapı için kullanılan protokorm terimi daha sonra orkide protokormlarının belirleyici bir özelliği olarak bir primer kökün bulunmadığını vurgulayan Bernard (1909) tarafından orkidelerin bu ilk fidecik aşaması için kabul edilmiştir (Arditti, 2009).

Çimlenme sonucu oluşan, protokorm yeni yaprak ve köklerin art arda olduğu bir meristematik alanla küçük küresel yumru benzeri yapıdır (Fang vd. 2016).

Bitki embriyoları genellikle ototrofik ana bitkinin fotosentezle depoladığı tohum rezervlerini kullanarak hayata başlamaktadır. Oysa orkide fideleri hem ana bitkinin rezervlerine hem de mikotrofinin (su, besin ve karbon kaynağının bir kısmını veya tamamını fungusdan simbiyotik yolla alan bitkilerin beslenmesi) karbonhidratına ihtiyaç duyar. Aksi takdir fideler doğada gelişemez. Bundan dolayı tüm yaşamı düşünülürse orkideler tamamen ototrof değildir. Bütün orkidelerde bir derece mikoheterotrofi bulunmaktadır. Bunlar tamamıyla fungusa bağımlı türler olup klorofilleri yoktur, “tamamen mikoheterotrof”. bunun yanısıra fotosentetik orkidelerde protokormlar ilk gerçek yaprak oluşuncaya kadar fungusa bağımlı olup bunlara “kısmi mikoheterotrof” denir (Ramussen ve Rasmussen, 2007).

Yaprak döküntüsü, ağaç artığı veya bazı canlı konukçu ağaçların temel besin kaynakları olabileceği tespit edildiğinden beri fungusun tanımlanması orkide türlerinin doğal gereksinimleri hakkında oldukça çok bilgi vermiştir (Batty vd. 2001).

Fotosentetik bireylerin fungal karbon kaynağına bağımlılıkları tartışma konusudur (Selosse ve Martos 2014). Fotosentez yeteneğine sahip bazı karasal orkidelerin fakültatif mikoheterotrofik olduğu; ek olarak karbon kaynağı olarak mikorizal fungusları kullandığı gösterilmiştir (Gebauer ve Meyer 2003; Selosse ve Martos 2014; Tesitel vd. 2018; Lallemand vd. 2019). Orkidelerin fungal ortağından aldığı karbon kaynağı çeşidi, bitki türleri (Zimmer vd. 2008; Cameron vd. 2009), bitki organları (Gonneau vd. 2014), yaprak klorofil konsantrasyonu gibi fizyolojik özellikler (Stöckel vd. 2011; Roy vd. 2013) ve mikro habitatlarındaki ışık gibi çevresel özelliklere (Preiss vd., 2010; Gonneau vd., 2014; Liebel vd., 2015) bağlıdır.

Epifitik *Lepanthes rupestris* çimlenmeden sonra fungusa bağımlılığını en kısa sürede bitirmektedir (Bayman vd., 2002). Küçük fungus yumakları genç köklerde oldukça nadir meydana gelmektedir. Benzerlik *Cypripedium*' un çeşitli türleri ve birçok epifitik tür içinde geçerli gibi görünmektedir (Ramussen ve Rasmussen, 2007).

Diğer bitkilerin aksine orkideler tohum çimlenmesi ve protokorm oluşumu için funguslara bağımlı olduğundan, uygun fungusun varlığı orkide popülasyonlarının dağılımını güçlü bir şekilde etkileyebilmektedir. Böylece uygun mikorizal fungusla tohumun birlik oluşturması çimlenme, büyüme ve doğada orkidelerin yerleşimi için hayati önem taşımaktadır (McCormick ve Jacquemyn, 2014, Selosse ve Roy 2009).

Fungal kök endofitine sahip orkideler fitopatogenlere karşı direnç geliştirmiş olabilir (Favre-Godal vd. 2020). Erken protokorm gelişimiyle karşılaştırıldığında *Gastrodia elata*' nın olgunlaşmamış yumrudan olgun yumruya doğru olan yaşam döngüsünde, artan bir mikroorganizma çeşitliliği tanımlanmıştır (Yuan vd., 2018).

Orkide tohumlarının kolayca uzak mesafelere taşınmasına rağmen olgun bitkilerin oluşumunu tohumun düştüğü yerdeki fungal çeşitliliğin, fide gelişiminin ve adaptasyon başarısının etkilediği gösterilmiştir (Jacquemyn vd. 2007; Jacquemyn vd. 2015).

Orkidelerdeki fungal çeşitliliği belirlemek için yürütülmüş daha önceki çalışmalar toprağa gömülen tohumlardan ve/veya orkide dokularından elde edilen fungal DNA sekans deneylerine dayanmaktadır (Dearnaley 2007, McCormick ve Jacquemyn 2014).

McCormick vd. (2016) üç karasal orkide türünde (*Goodyera pubescens*, *Liparis liliifolia* ve *Tipularia discolor*) yaptıkları çalışmada doğaya gömülen tohum paketlerindeki çimlenme testlerinde topraktaki hedef mikorizal fungusların dağılımı, bolluğunu ve çimlenmede etkili olan fungusları incelemiştir. Çalışmada uygun fungusların, çimlenme olan alanlarda, tohumların çimlenmediği alanlardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Orkide tohum çimlenme modellerinin, uygun mikorizal fungusların dağılımı ve bolluğu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (McCormick vd. 2016). McCormick vd. (2016) lokal dağılım ve bazı orkidelerdeki düzensizliğin muhtemelen mikorizal funguslardan etkilendiğini göstermiştir. Tohum paketlerinin kullanıldığı çalışmalarda çimlenme, sadece uygun fungusun dağılımını değil bolluğunu da yansıtmaktadır (McCormick vd., 2012).

Uygun çevre koşullarına ve funguslara sahip alanların genellikle orkideler tarafından kolonileştirildiğini ileri süren çalışmalarda destekleyici sonuçlar alınmış olup orkide bireylerine yakın alanlara yerleştirilen tohum paketlerinde benzer yüksek çimlenme gözlenmiştir (Jacquemyn vd., 2007; Jersáková ve Malinova 2007; Harzlı 2024). Bu, bitki dağılımını sınırlayan diğer faktörleri engellemekle birlikte (örneğin toprak nemi ve besin maddeleri, tohum üretiminin başarısı, toprakta uzun ömürlülük veya başka olası faktörler), fungus kısıtlamasının önemli bir rol oynadığını göstermektedir (McCormick vd., 2016).

Orkide mikorizasını oluşturan fungusların, *Rhizoctonia* cinsinin bazı türlerinin diğer bitkiler için patojen olduğu halde orkidelerle başarılı simbiyotik ilişki kurduğu ve laboratuvarındaki çimlendirme çalışmalarında çok etkin bir şekilde çimlenmeyi teşvik ettiği ortaya konmuştur (Rasmussen 1995; Kömpe vd 2020). Ancak son çalışmalar göstermiştir ki sadece *Rhizoctonia* cinsi funguslar değil diğer cinslere ait funguslar da orkidelerle mikorizal ilişki kurmaktadır (Tesitelova vd. 2012; Waud vd. 2017; Mutlu and Kömpe 2020). Fakat bu fungusların orkide tohum çimlenmesine etki etmedikleri belirlenmiş olup daha ziyade ergin orkide bitkilerine su ve besin aktardıkları düşünülmektedir (McCormick vd. 2006; Jacquemyn vd. 2011).

"*Rhizoctonia* benzeri fungus kompleksine" çok sayıda orkide mikorizal fungus katılmıştır. *Tulasnella*, *Epulorhiza*, *Ceratobasidium*, *Ceratorhiza*, *Thanatephorus*, *Monilliospora* ve *Serendipita* gibi cinsler orkidelerle ilişkilendirilmiştir (Taylor vd., 2003). Cruz vd. (2014), karasal orkidelerle mikoriza oluşturan en yaygın cinslerden birinin *Tulasnella* olduğunu ileri sürmüştür (Beltran-Nambo vd., 2018).

Tropikal dağ yağmur ormanlarındaki ototrofik karasal ve epifitik orkidelerin Serendipitaceae (Sebacinales), Tulasnellaceae ve Ceratobasidiaceae (Cantharellales) ile sınırlı bir oranda ilişkili olduğu bulunmuştur (Otero vd. 2007; Kottke vd., 2013). Tulasnellaceae en zengin türe sahip ve en bol bulunan gruptur. Ektomikorizayı şekillendiren Sebacinaceae üyeleri (Shefferson vd., 2005; Tedersoo vd., 2006) ağırlıklı olarak klorofilsiz ve mikсотrofik orkidelerle ilişkilidir (McKendrick vd., 2002; Selosse vd., 2004; Taylor vd., 2003).

Ceratobasidium ile orkidelerin oluşturduğu birlik Antarktika hariç her kıtadan kaydedilmiştir (Jacquemyn vd., 2017) ve fotosentetik karasal orkidelerle en sık ilişkilendirilen fungus cinslerinden biridir (PHillips vd., 2020).

Nonfotosentetik orkidelerle az sayıda çalışma yapılmıştır (Taylor ve Bruns, 1999; McKendrick vd., 2000). Ancak her bir nonfotosentetik tür çalışması sadece tek bir cinsle yakından bağlantılı çok az fungusla ilişkilendirilmiştir McKendrick vd., 2000; Taylor vd., 2002). *Corallorhiza*'nın iki türünün her birinin birkaç *Russula* spp. ile ilişkili olduğu bulunmuş, fakat her iki orkide de yüksek spesifiklik gösteren fungusla ortaklık yapmamıştır (Taylor ve Bruns, 1999)

Fungal ilişkiyi tanımlamak için moleküler tekniklerin kullanımı nonfotosentetik orkidelerle ilişkili fungus çalışmalarına hakim olmuştur, çünkü bu bitkilerin funguslarla ortaklıkları büyük ölçüde genellikle zordur veya sıklıkla Russulaceae ve Thelephoraceae ait olan saf kültürleri elde etmek imkansız görünmektedir (McCormick vd., 2004). Ayrıca benzer bir şekilde diğer miko-heterotrofik bitkilerle çalışan araştırmacılar moleküler teknikleri kullanmış ve temel fungal spesifikliği bulmuştur (Bidartondo ve Bruns, 2001; Bidartondo vd., 2003). Sonuç olarak fotosentetik olmayan orkidelerin fungal spesifikliği onları yaşamları boyunca miko-heterotropizme bağımlı bırakmıştır ve birkaç tür ile ilgili çalışmalar bu orkideleri temsil etmek için genelleştirilmiştir (McCormick vd., 2004).

Orkide fungal çeşitliliği hakkındaki teoriler orkideleri fotosentetik kabiliyetlerine (Taylor vd., 2002; Zettler vd., 2004) ve ekolojilerine (karsal, epifitik gibi) bağlı olarak gruplara ayırır. Bütün orkideler başlangıçta miko-heterotrofiktir (Leake, 1994), fakat çoğu sonunda yaprak üretir ve fotosenteze başlar. Orkide fungus ilişkisine ait çoğu çalışma ergin karasal fotosentetik orkidelere odaklanmıştır (Richardson vd., 1993; Otero vd., 2002). Önceki bazı araştırma sonuçları fungal spesifikliğin çoğu orkide de yetersiz olduğunu düşündürmüştür, çünkü tohumlar

fungusların geniş bir oranıyla laboratuvarında düzenli olarak çimlenmekteydi (Knudson, 1922). Orkidelerin ortaya çıktığı habitatların dar bir aralığında mevcut olan fungusların bazı fotosentetik orkidelerle fungal spesifikliğinin olduğu öne sürülmüştür (McCormick vd., 2004).

Orkide kökleriyle fungusların mikorizal birliğini belirlemek üzere bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğunluğu çiçeklenme döneminde yapılmıştır. Oysa bir vejetasyon döneminin başlangıcında kökler henüz oluştuğunda mikorizal birlik kurulabilmektedir. Orkidelerin tohumdan üretimi sadece uygun bir fungusla simbiyotik ilişki kurmasıyla sağlanmamakta aynı zamanda çeşitli doku kültürü ortamlarına tohumların ekimi yapılarak da üretim üzerinde çalışılmaktadır (Clements vd., 1986; Özkoç ve Dalcı 1992; Özden Y., 1994)

1800'lerin sonlarında araştırmacılar, orkide tohumlarının çimlenmesi konusunu araştırmaya başlamışlardır. Genellikle tohum, çimlenme beklentisiyle ağaç kabuğu ve çürümüş yaprak gibi organik maddelerin üzerine yerleştirildi, ancak bu yöntem genellikle başarısız oldu (Arditti, 1967). Bernard ve Burgeff gibi ilk araştırmacılar, orkideler ve mikorizal fungus arasındaki simbiyotik ilişkiyi araştırmıştır ve *in vitro* koşullar altında orkide tohumlarının sadece bir fungus varlığında çimlendiği sonucuna varmışlardır (Kauth, 2005). Orkide tohumlarının sadece uygun fungusla çimlenebileceği kabul edilmesine rağmen, çimlenme oranları genellikle düşüktü ve fide ölümleri yaygındır (Knudson, 1922). Ancak Bernard karasal bir orkide cinsi olan *OpHrys*'in yumrularından elde edilen bir toz olan salebi kullanarak fungus yokluğunda *Cattleya* ve *Laelia* tohumlarını çimlendirmeyi başarmıştır (Arditti, 1967; Knudson, 1922).

Orkide tohumlarının ilk görüldüğü zamandan, ilk kez Dr. Lewis Knudson tarafından 1922'deki başarılı asimbiyotik çimlenmesine kadar yaklaşık 400 yıllık bir boşluk vardır (Balilashaki vd, 2015). Knudson'dan beri, birçok orkide türü için *in vitro* tohum çimlenme protokolleri oluşturulmuş ve çimlenme ve çoğaltma için bir dizi ortam ve tuz kullanılmıştır (Arditti ve Ernst 1993). Asimbiyotik *in vitro* kültürler doğada çimlenmesi ve gelişmesi zor olan orkidelerin ve benzeri bitkilerin daha hızlı ve daha verimli üretimi için bir alternatif sunmaktadır (Paul vd. 2012).

Knudson (1922), çimlenmenin "embriyo içindeki fungus tarafından değil, fungusun sindirimi üzerine harici olarak üretilen ürünler tarafından" indüklenebileceğini açıklamıştır (Kauth, 2005). Orkide tohumlarını çimlendirmek ve

vahşi doğada yeniden yetiştirilmek için yeterince canlı bitki elde etmek zordur. Özellikle ılıman kökenli karasal orkidelerin spesifik besin ve çevresel ihtiyaçlardan dolayı in vitro ve ex vitroda çimlenmesi güçleşir (Van Waes ve Debergh 1986a; Rasmussen 1995). Nesli tükenmekte olan ve tehdit altındaki birçok orkide taksonunun korunmasında asimbiyotik olarak üretilen bitkileri kullanma başarısına rağmen (Mohanty vd., 2012), asimbiyotik in vitro çimlenme yöntemlerinin türlere göre geliştirilmesi gerekmektedir. Çünkü her aşamadaki doku kültürü koşulları büyük ölçüde türe özgüdür (Arditti, 1967 , Zeng vd., 2013).

Asimbiyotik çimlenme başarısı, tohum olgunluğu gibi tohum koşullarına, fiziksel çimlenme koşullarına ve büyüme ortamındaki bileşenlere bağlıdır (Arditti, 1967; Kauth vd., 2008; Zeng vd., 2013; Balilashaki vd., 2015).

PapHiopedilum cinsinde, tohum kapsülünün olgunluğunun çimlenme başarısı üzerindeki etkisi türe göre değişmektedir (Lee, 2007, Long vd., 2010). *PapHiopedilum*'daki çapraz tozlaşmanın, kendi kendine tozlaşma yoluyla elde edilen tohumlara kıyasla daha yüksek çimlenme başarısına sahip tohumlar ürettiği gösterilmiştir (Stimart ve Ascher, 1981). Ayrıca, besi yeri içeriği, karbon kaynağı, bitki büyüme düzenleyicileri, organik besin katkı maddeleri (Chen vd., 2004a, Chen vd., 2004b, Long vd., 2010; Paul vd., 2012), tohum sterilizasyonu süreci (Lee, 2007) gibi büyüme ortamı koşulları ve ışık bulunabilirliği (Stimart ve Ascher, 1981) türlerin başarılı çimlenmesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Minerallerin içeriği ve kültür ortamındaki kullanılabilir formları, bitki doku kültüründe en önemli ön koşullardır. Birçok çalışma, asimbiyotik çimlenmenin ortamdaki azot ve azot bileşiklerinin varlığına bağlı olduğunu göstermiştir (Stewart ve Kane, 2006 ; Arcidiacono vd., 2021). Azot içeriğine ek olarak, aminoasit kaynağı sağlayan çeşitli organik katkı maddelerinin varlığı da karasal orkide tohumlarının çimlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. Asimbiyotik tohumların çimlenmesinde kullanılan en yaygın katkı maddeleri hindistan cevizi suyu , kazein hidrolizat , pepton , muz tozu, maya özütü ve ananas suyudur. Bununla birlikte, olumlu etkilerine ek olarak, bunlardan bazılarının bazı orkide türlerinin çimlenmesi üzerinde engelleyici etkisi de olabilir (Gupta, 2016).

Nesli tükenmekte olan türler için asimbiyotik çimlenme protokolleri geliştirmek zaman ve kaynak gerektirmektedir. Chen vd. (2015)'nin nadir ve nesli tükenmekte olan orkidelerin neslinin tükenmesinin önlenmesi için yaptıkları çalışmada, *PapHiopedilum spicerianum* için asimbiyotik in vitro tohum çimlenme protokolü geliştirilerek, tohum çimlenmesinin her aşaması için hangi ortamın en iyi olduğunu test

ettiler. Diğer *PapHiopedilum* türleri için bildirildiği gibi (Chen vd., 2004a; Chen vd., 2004b; Long vd., 2010; Zeng vd., 2012), *P. spicerianum* tohumları düşük tuz ortamında en iyi şekilde çimlenmiştir. *PapHiopedilum* türlerinin tohum çimlenmesi için ideal ortamın türe özgü olduğu bilinmektedir. Çimlenme testlerinde *P. spicerianum* protocormlarının 1/4 MS ortamında düşük tuz konsantrasyonları altında canlı protokorm oluştuğunu, ancak 1/4 MS'de çimlenen tohum sayısının RE ortamındakinden daha düşük olduğunu bulmuştur (Chen vd. 2015). Pierik ve ark. (1988) , KC ve 1/4 MS'yi karşılaştırdığında; KC'de çimlenme oranının daha yüksek olduğunu, ancak fide gelişiminin devam etmediğini bulmuşlardır (Chen vd. 2015). Chen vd. çalışmasında RE ortamındaki çimlenmenin devam etmediğini ve fidelerin klorofil geliştiremeyip, daha sonra kahverengileşip öldüğünü bildirmiştir. Aynı çalışmada 24 saatlik karanlık fotoperiyot uygulamanın 12:12 aydınlık: karanlık fotoperyoda kıyasla çimlenmeyi daha fazla uyardığı bulunmuştur. Pierik vd. (1988) *P. ciliolare* için tohum çimlenmesi ile ışığın yoğunluğundaki artış arasında negatif bir korelasyon olduğunu bildirmiştir. Zeng vd. (2012) karanlık ön işlem süresinin çimlenme yüzdesini önemli ölçüde etkilediğini bildirmiştir; 45 günlük karanlık ön işleme tabi tutulmuş tohumlar en yüksek çimlenme yüzdesine sahip olup, besi ortamının ışığın çimlenme üzerindeki etkisini değiştirebileceğini bildirmiştir. Stimart ve Ascher (1981), karanlıkta modifiye edilmiş Thomale GD ortamının *PapHiopedilum* hibritlerinin tohum çimlenmesini ve protocormun hayatta kalmasını güçlü bir şekilde desteklediğini, tohumlara ışık verildiğinde en iyi çimlenme Burgeff EG-1'de gerçekleşirken, daha sonra öldüğünü bildirmiştir. Zeng vd. (2012) , tohumların sürekli karanlıkta kaldığında fide üretmediğini bildirerek, ışığın fide gelişiminde önemli bir ekolojik işaret olduğunu öne sürdüler, ancak karanlık muamelenin karasal orkidelerin tohum çimlenmesini neden teşvik ettiği açık değildir. Epifitik orkidelerin tohum çimlenmesi için ışığa ihtiyaç duyduğu, karasal türlerin ise karanlık koşullara ihtiyaç duyduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. *PapHiopedilum* cinsinde çimlenme için ışık gerekliliğinin türe özgü olduğu kadar çimlenme aşamasına da özgü olduğu gösterilmiştir (Chen vd.2015).

Olgun orkide tohumlarının in vitro asimbiyotik çimlenmesi tohum dormansisinin devam ettiğinde mekanik veya fizyolojik mekanizmalar nedeniyle başarısız olabilir. Tohum dormansisi belirli sıcaklık rejimleri, uzun süreli emilim, testanın Ca (OCI)₂ veya NaOCl ile kimyasal olarak veya mekanik hasarla yumuşatılmasıyla kırılabilir (Zeng vd., 2013). Orkide tohumu çimlenmesi üzerine

yapılan araştırmalar, olgunlaşmamış tohumların olgun tohumlardan daha iyi imlendiğini göstermiştir, çünkü olgun kabuk giderek daha fazla suyu geçirmez hale gelmektedir (Ramsay ve Stewart, 1998; Kauth vd., 2008). Ancak bu, spesifik olabilir, *PapHiopedilum* ile aynı subfamilyadan olan *Cypripedium debile*' da, testayı daha az hidrofobik yapan testa hücrelerinin seyrek kütiküler birikimi nedeniyle, olgun tohumlar, olgunlaşmamış tohumlara kıyasla daha iyi imlenmektedir (Hsu ve Lee, 2012).

Paul vd. (2011) *Dendrobium hookerianum*'un asimbiyotik çimlenmesi için yaptıkları çalışmada Murasing Skoog (MS), Mitra, KnudsonC (KC) ve B5 besi ortamlarında maksimum çimlenme yüzdesi ve protokorm gelişimi gözlediler. MS ortamındaki yüksek çimlenme ve daha fazla gelişme, MS ortamının hem makro hem de mikro besinler açısından özellikle zengin olmasına bağlanabilir. Azot kaynağının daha önce çeşitli orkide türlerinin çimlenmesini etkilediği gösterilmiştir (Van Waes ve Debergh 1986a; Stewart ve Kane 2006). KC ve B5 besi ortamı zayıf tohum çimlenmesine rağmen, *Dendrobium chrysanthum* için uygundur (Hajong vd., 2010). KC ortamının birçok orkide türünün tohum çimlenmesi üzerindeki hem teşvik edici hem de inhibe edici etkileri rapor edilmiştir (Sharma ve Tandon 1987; Nongrum vd., 2007). Yam vd., (1989) göre, imlenen orkide tohumlarının beslenme gereksinimleri fizyolojik durumlarına göre değişmekte ve bu türe özgü olabilmektedir. Acemi ve zen (2019) yaptıkları çalışmada *S. vomeraceae* için KC besi ortamının optimum seçim olduğunu ortaya koymuşlardır.

Besi ortamındaki bitki büyüme düzenleyicileri, enerji kaynağı sağlayan karbonhidratlar, büyümeyi teşvik eden organik bileşikler ve vitaminler, orkide fidelerinin oluşumu ve heterotrofik büyümesi sırasında avantaj sağladığı düşünülmektedir (Arditti, 1967; Kauth vd., 2008).

Pek çok araştırma in vitro koşullarda optimal çimlenme ve fide gelişimi için beslenme ve kültürel gereksinimlerin belirlenmesi üzerine odaklanmıştır. Knudson (1924), Pfeffer çözeltisine dayalı bir besin çözeltisi kullanarak, bir mikorizal fungusun yokluğunda birkaç epifitik orkide cinsinin tohumlarını başarıyla imlendirdi. Bu ilk deneylerden sonra Knudson, zelti B'yi geliştirdi ve orkide tohumunun simbiyotik bir fungusun yokluğunda in vitroda imlenebileceğini kanıtladı (Kauth, 2005). Knudson (1946), daha zor imlenen cins ve türlerin tohumlarını imlendirmek için zelti B'yi modifiye etti. Knudson yeni çözeltiye manganez ekledi ve demir fosfatı demir sülfatla

değiştirdi. Knudson C olarak adlandırılan ortam, hem bitki doku kültürü hem de in vitro tohum çimlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Kauth, 2005).

Asimbiyotik tohum çimlenmesinin ortaya çıkmasıyla birlikte, doğal karasal orkidelerin çimlenmesine ilgi artmıştır. Doğada birçok orkide nadir bulunduğu için, tehdit veya tehlike altındadır, bu nedenle türlerin korunması için tohum çimlenmesi uygulamaları önem kazanmıştır (Stenberg ve Kane, 1998).

Karasal orkidelerin in vitro tohum kültürüyle ilgili zorluklar nedeniyle, birçok araştırmacı özellikle karasal orkideler için besiyeri formüle etmiştir. Bunlardan bazıları Fast (1976) tarafından *Cypripedium* için geliştirilen Fast besi ortamı, Batı Avrupa orkideleri için geliştirilen WVD (Van Waes Debergh, 1986b) ve Curtis ortamı (Curtis, 1936) olarak bilinmektedir (Kauth, 2005). Ayrıca bu amaçla Lindemann orkide ortamı, Gamborg's ortamı ve Mitra orkide ortamı, Hyponex besi ortamı gibi, kültür ortamları da halen kullanılmaktadır (Arditti 1967a; Arditti vd. 1981; Devi vd. 2015; An vd., 2021).

Orkidelerin asimbiyotik tohum çimlenmesi, tohum yaşı, besin ortamı bileşimi ve bitki büyüme düzenleyicilerinin eklenmesi gibi faktörlerden büyük ölçüde etkilenir (Sungkumlong, 2008). Karasal orkideler çimlenmeye karşı dirençlidir ve onları tohumdan yetiştirilmesi en zor bitki gruplarından biri yapan karmaşık bir dormansiye sahip olmalarıdır (Karaman ve Collum, 2020; Parlak S. 2022; Miura vd.2024).

Orkide tohumlarının çimlenmesi için özel olarak geliştirilmeyen kültür ortamları da bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Murashige ve Skoog (MS) ortamı (1962) tütün kallusunun çoğalması için geliştirilmiş, ancak orkide tohum çimlenmesi için de kullanılmaktadır. MS ortamı göreceli olarak yüksek makro ve mikro besin içeriğine sahip olduğundan, genellikle yarım veya çeyrek kuvvette kullanılmaktadır (Kauth, 2005).

Sathiyadash vd. (2013) BAP katılmış MS ortamının *Acampae praemorsa* tohum Sathiyadash vd. (2013) çimlenmesi ve protokorm oluşumunu teşvik ettiğini gözlemiştir. Aynı çalışmada MS ortamına katılan 2,4-D tohum çimlenmesini uyarmada ve protokorm oluşturmada etkin olmamıştır. Ancak NAA fide gelişimini teşvik etmiştir. MS ortamı tohum çimlenmesini uyardığını bilinen hem amonyum hem de nitrat formunda azot içermektedir (Popova vd, 2003).

Kitsaki vd. (2004) bazıları Yunanistan için endemik olan 13 farklı OpHrys türünün (*O. apifera*, *O. attica*, *O. cornuta*, *O. delfinensis*, *O. ferrum-equinum*, *O. lutea*, *O. mammosa*, *O. speculum*, *O. spruneri*, *O. umbilicata*, *O. argolica*, *O. irricolor* ve *O.*

tenthredinifera) in vitro tohum çimlenmesi ve gelişimini modifiye Malmgren kültür ortamında incemiştir Olgun tohumlar (toplandıktan 10 ay sonra) ve olgunlaşmamış tohumlar (çiçek açtıktan 2 ay sonra) hindistan cevizi sütü ve ananasla eklenmiş Malmgren besi yerinde kültüre alındı. En yüksek kallos oluşumu (%96) hindistan cevizi süt olan besi yerinde *O. delpHinensis*'in olgunlaşmamış tohumlarında gözlemlenirken, en yüksek protokorm oluşumu (%52) yine hindistan cevizi süt olan besi yerinde *O. spurneri*'nin olgun tohumlarında gözlemlendi. Protokorm oluşumu her iki kültür ortamında da olgunlaşmamış tohumlarda olgun tohumlara göre önemli ölçüde daha düşük olarak kaydedilmiştir.

Bektaş vd. (2013) *Orchis coriophora* tohum çimlenme ve gelişimi için Orchimax, KC, Lindeman (LM) ve PHytamax kültür ortamlarında yaptıkları çalışmada Orchimax kültür ortamının çimlenmede en etkili ortam olduğunu ortaya koydular. Ayrıca *Orcis sancta* in vitro tohum çimlenmesinde zeatin destekli Orkimax ortamının en iyi çimlenme oranını verdiği bulunmuştur (Bektaş ve Sökmen, 2022). *Orchis coriophora* ile yapılan daha önceki çalışmalar da en iyi çimlenmeyi domates özütü ve aktif kömürle desteklenen WVD kültür ortamından elde edilmiştir (Çağlayan vd. 1998).

Arcidiacono vd, (2021) nesli tükenme tehdidi altındaki iki Sicilya karasal orkidesi *Anacamptis longicornu* ve *OpHrys panormitana*' ile yaptıkları vitro asimbiyotik çimlenme çalışmasında, Orchimax ortamı (OM) ve Murashige ve Skoog (MS) kültür ortamlarında gelişimin belirli aşamaları için en iyi koşulları değerlendirmek üzere farklı fotoperiyotlar ve sıcaklıkları testler ettiler. *A. longicornu*'nun çimlenmesi OM'de çok yüksek (%95,5) ve MS ortamında daha düşük (%21,4) olurken, *O. panormitana* yalnızca OM ortamında, *A. longicornu* ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha düşük yüzdelerle (%12,0) çimlendiği gözlemlendi. Bu farkın, öncelikle azot kaynağı olmak üzere kullanılan besin maddelerinin kalitesi ve miktarındaki değişiklikten kaynaklanabileceğini ileri sürdüler. Çalışmanın sonuçları, sıcaklığın ve fotoperiyodun tohum çimlenmesini ve gelişimini büyük ölçüde etkilediğini göstermiştir.

Nabieva (2021) (%82,6), %5 hindistan cevizi suyu, %5 huş ağacı özü ve %0,1 AC ile zenginleştirilmiş modifiye Malmgren kültür ortamında *O. militaris* tohumlarının en yüksek oranda çimlendiğini ortaya koymuştur. Elde edilen fidelerin %9'u, bu ortamda 12 aylık bakımın ardından ileri fide aşamasına ulaştırabilmiştir.

Ostojic vd. (2022) karasal orkide türü olan *Gymnadenia conopsea* ve *Anacamptis pyramidalis* asimbiyotik tohum çimlenmesi için Hindistan cevizi suyu, kazein hidrolizati ve glutamin katılmış KC ve Malmgren besi ortamlarının kullanmıştır. *A. pyramidalis* ve *G. conopsea* tohumları inorganik azot içeren KC ortamında çimlenmezken, Malmgren ortamında yüksek oranda tohum çimlenmesi kaydedilmiştir Malmgren besin ortamına hindistan cevizi suyu, ananas suyu ve L-glutamin formunda takviyeler eklendiğinde ise, her iki türde de önemli ölçüde daha yüksek derecede çimlenme elde edilmiştir.

Orkide tohumu çimlenmesini teşvik etmek için OrMF kullanma kavramı, 1900'lerin başında Bernard tarafından önerilmiş (Selosse vd., 2017) ve daha sonra 1970 ve 1980'lerde Warcup ve Clements'in de aralarında bulunduğu bir grup araştırmacı tarafından detaylandırılmıştır (Clements vd., 1986). Rasmussen (1995) ve Zettler (1997), yaklaşık 20 yıl sonra orkidelerin yeniden yetiştirilmesinde OrMF'nin tohum çimlenmesinde kullanılmasını önerdiler. *Spiranthe smagnicamporum* (Anderson, 1991), *Spiranthes brevilabris* (Stewart vd., 2003), *Dactylorhiza hatagirea* (Aggarwal ve Zettler, 2010), *Dactylorhiza praetermissa* (Mckendrick, 1995) ve *Dactylorhiza urvilleana* (Özdener 1994) dahil olmak üzere bazı yeşil karasal orkideler ve iki epifitik orkide *Epidendrum nocturnum* (Zettler vd., 2007) ve *Vanda coerulea* (Aggarwal vd., 2012) için OrMF üretim raporu bulunmaktadır.

1940'lı yıllardan beri birçok orkide türünün kökünden funguslar izole edilip çimlendirme testleri yapılmıştır (Arditti, 1967; Van Waes-Deberg, 1986a; Clements vd., 1986; Özkoç ve Dalcı 1992; Özdener, 1994; Sazak ve Özdener 2006; Calevo ve Duffy, 2023; Kendon vd. 2020). Bu çalışmalardan bazıları in vitro şartlarda simbiyotik çimlenmenin beklenilenden daha başarısız olduğunu göstermiştir (Stewart ve Kane 2006). Bu başarısızlığın orkide-fungus spesifiklik derecesinin düşük olmasından kaynaklandığı ifade edilmektedir (Stewart and Kane 2007). In vitro şartlarda bir fungusun tohum çimlenmesini teşvik etmesi yönündeki başarı oranı spesifikliğin derecesini ifade edebilir (Stewart and Kane 2007). Ancak bu alanda çalışan araştırmacıların çoğunluğu laboratuvar çalışmalarının doğal ortamlarındaki (özellikle tohum-fungus arasındaki) ilişkiyi tam olarak yansıtmadığını, orkide tohumu-fungus arasındaki ilişkiyi ve spesifikliği gerçek anlamda ortaya koymak için doğal şartlarda ya da doğal şartlara uygun bir iklimlendirme ortamında simbiyotik çimlendirme testlerinin yapılmasının gerekli olduğunu ifade etmektedir (Masuhara ve Katsuya 1994; Taylor vd. 2003). Fotosentetik orkidelerde fungus özgüllüğü şüpheli olmasına

rağmen, tamamen mikoheterotrofik orkideler yüksek fungus özgülüğüne sahiptir (Girlanda vd., 2006).

Tarla koşullarında, OrMF genellikle in situ simbiyotik tohum çimlenmesini teşvik ederek bitkinin gelişmesine yardım eder (Smith ve Read, 2008 ; Sathiyadash vd., 2020), böylece doğadaki orkide popülasyonlarının yeniden oluşturulmasına katkıda bulunur. Ekolojik özgülüğe sahip çimlenmeyi teşvik eden OrMF ile orkide tohumlarının birlikte ekilmesi sonucu, elde edilen bitkiler sadece yeni birey olarak değil, aynı zamanda sürekli orkide çimlenmesi için çimlenmeyi destekleyen bir mikobiyont olarak hedef orkidenin çevresinde aşılama işlevi görebilir (Batty vd., 2006 ; Reiter vd., 2016). Böylece, kritik derecede nesli tükenmekte olan orkideler için, özellikle ex situ koruma için doğal habitatında kendi kendini sürdürebilen popülasyonların yeniden oluşturulması teşvik edilmiş olur (Zhao vd. 2021).

Protokorm ve fideler, doğal habitatında aynı anda birden fazla OrMF ile temas edebilir (Shao vd., 2019 , 2020). Bununla birlikte, iki veya üç OrMF içeren ortak kültürler, protokorm ve fide oluşumu yüzdesini artırmayabilir, *D. nobile* için monokültürlere kıyasla karışık kültürler daha düşük çimlenme yüzdeleri ile sonuçlanmıştır (Shao vd., 2020). Orkide tohumlarının yeniden ekilmesi için doğal ortamlarına doğrudan ekilmesi kolay gibi görünse de, bu uygulama çevrede hedef OrMF ile karşılaşma olasılığının düşük olması nedeniyle oldukça zordur (Jacquemyn vd., 2007; Jersakova ve Malinova, 2007; Zi vd., 2014; Yang vd., 2017).

Shao (2018) epifitik orkide olan *Dendrobium devonianum* 'un restorasyonunda köklerden izole edilen OrMF ile aşılamanın tohum paketlerinde tohum çimlenmesini başardılar. Protokormlardan izole edilen simbiyotik fungus *Tulasnella* sp. ile karıştırılmış paketlenmiş tohumlar kullanılarak, nesli tükenmekte olan bu orkidenin doğal bir popülasyonunun oluşturulmasıyla sonuçlanan etkili bir yeniden yerleştirme gerçekleştirilmiştir (Shao vd., 2018). Geliştirilen yöntemlerle, tehdit altındaki diğer iki orkide türü *Dendrobium apHyllum* ve *D. nobile* de başarılı bir şekilde doğaya yeniden kazandırıldı ve ayrıca *D. devonianum*'un da tarla popülasyonunun restorasyonu da sağlandı (Shao vd, 2018).

Spesifik OMF'nin tanımlanması, orkidelerin korunması için avantaj sağlayabilir (Izuddin vd.2019). Orkideler mikorhizal funguslarla güçlü bir bağımlılık gösterse de, OMF varlığı ve dağılımı orkide dağılımından bağımsızdır (McCormick bvd,2007). Izuddin vd.(2019) epifitik orkide orkidelerin doğal habitatı olan alanlardaki ağaçlarda yaptıkları çalışmada OrMF 'nın varlığının ve zenginliğinin yağış seviyesi ve humus

varlığına göre değiştiğini öne sürmektedir. Bu faktörlerin orkide gelişimi ve tohum çimlenmesini etkilediği bilinmektedir (Rasmussen, 1995; Markus vd.2012). Bu da OMF ve orkide türlerinin niş gereksinimleri arasında olası çakışma olduğunu düşündürmektedir (Izuddin vd.,2019).

Nanekar vd. (2014) nesli tükenme tehdidi altında olan *Eulophia nuda* ile yaptıkları çalışmada araziden toplayarak elle tozlaştırdıkları bitkilerin kapsüllerini 5-7 ay aralığında toplayarak tohum çimlenmesi deneyleri yapmışlardır. Çalışmada tozlaşmadan 6 ay sonra toplanan tohumların çimlenme oranlarının en yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca tozlaşmadan 5 ay sonra toplanan kapsüllerdeki tohumların en düşük çimlenme oranı vermiş, bunun ortamdan besinleri absorbe edemeyen az gelişmiş embriyoya bağlanabileceği öne sürülmüştür (Long vd., 2010). Benzer şekilde, tohum kabuğu oluşumu ve zayıflatıcı besin alımı, tozlaşmadan 7 ay sonra toplanan olgun kapsüllerde de çimlenmeyi düşürmüştür. Tozlaşmadan 6 ay sonraki tohumların yüksek çimlenme oranı, orkidelerin *in vitro* tohum çimlenmesi ve fide gelişimi için gerekli olan kolay besin alımı için ince kütikül tabakası oluşumu ile uygun embriyo aşamasının önemini göstermektedir (Lee vd., 2006). Çeşitli olgunluk aşamalarında, örneğin tozlaşmadan 7 ay sonra toplanan *PapHiopedilum villosum* (Van Waes-Deberg, 1986a) ve 5 ay sonra toplanan *P. delenatii* (Lee vd., 2006) tohumlar gibi, maksimum çimlenmenin elde edildiği araştırma sonuçları mevcuttur. Bu sonuçlar, *in vitro* orkide tohumu çimlenmesinin türe bağlı spesifik olgunluk aşamasından önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir. Ayrıca, türe özgü besin rejimi nedeniyle orkide kültürleri için evrensel olarak tek bir ortam geçerli değildir (Mahendran vd.,2013; Zeng vd., 2012; Nanekar vd.,2014; Chen vd., 2015). *In vitro* tohum çimlenmesinde besi ortamlarına eklenen bitki büyüme düzenleyicilerinin tohum çimlenmesi ve protokorm oluşumunu bazı orkide türlerinde teşvik ettiği bildirilmiştir (Kumar vd., 2002; Nanekar vd., 2014; Sathiyadash vd. 2013).

Pant ve Thapa (2012) tüm MS besi ortamlarında (tam, yarım ve çeyrek kuvvette) ve çeşitli konsantrasyonlarda MS ortamı ve BAP ve NAA kombinasyonu ile desteklenen MS ortamında test edilen protokorm benzeri cisim oluşumu gözlemlendi. Ancak sürgün sayısı ve uzunlukları açısından ortamlar arasında ve içeriğinde oldukça farklılıklar görüldü. En yüksek köksüz sürgün sayısı (eksplant başına ortalama 4.5 sürgün değeri), en uzun sürgünlerin de gözlemlendiği 1.5 mg/l-1 BAP katkılı MS ortamında elde edildi.

Diengdoh vd. (2017), tohum olgunluğu ve kültür ortamının *PapHiopedilum insigne*, türünün çimlenmesine belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Laboratuar şartlarında yapılan simbiyotik çimlendirme çalışmalarında dünya genelinde büyük ölçüde başarı elde edilmiştir. Ancak doğal şartlarda tohum ve fungus arasında simbiyotik ilişkinin ne zaman kurulduğu, hangi fungusun çimlenmeyi ne ölçüde teşvik ettiği, *Rhizoctonia* mı yoksa diğer fungusların mı etkili olduğu gibi konularda belirsizlik son yıllara kadar devam etmekteydi. Bu belirsizlikleri çözmek ve orkide yetiştiriciliği için alternatif üretim yolları bulmak üzere son yıllarda orkide tohumlarını toprağa gömerek çimlenmeyi takip çalışmaları başlatılmıştır (Rasmussen ve Wheigham 1993; Kömpe vd. 2019).

Toprağın kimyasal ve fiziksel özellikleri karasal bitkiler de olduğu gibi orta kuşak orkidelerinde de dağılım, çeşitlilik ve bolluğu belirleyen önemli faktörlerden biridir. Toprak nemi, toprak pH'sı, topraktaki organik maddeler, azot, potasyum, fosfor ile kalsiyum ve magnezyum gibi inorganik maddelerin topraktaki miktarları bulunma formları orkidelerin gelişimi için önemlidir. Ayrıca, toprağın nemi ve sıcaklığı orkidelerin büyümesi, çimlenmesi, fide oluşumu ve mikorizal fungus çeşitliliğini etkiler (Djordjevi and Tsiftsis 2020).

Karasal orkideler, genellikle yoğun organik madde ve humus barındıran topraklarda yetişmektedir. Karasal orkidelerin kök yapısı epifit orkidelere benzemekle beraber bazı türleri salep yapımında kullanılan ve vejetatif büyümeyi sağlayan yumrulara sahiptirler. Karasal orkideler mevcut iklim değişikliğine bağlı olarak nesli tükenme tehlikesi altında olan bir sınıfı temsil etmektedir (Swartz ve Dixon, 2009).

Wisconsinan buzul sınırının kuzeyindeki ayırlları, sazlık ayırlları ve bataklıkları işgal eden *Platanthera leucopHaea*'nın yetiştiği alanlar, nispeten düşük besin miktarına sahip asidik kumlu topraklardır ve bu nedenle çok çeşitli toprak koşullarına toleranslı olduğu öne sürülmüştür. *P. leucopHaea* gibi orkideler besince fakir, orta derecede asidik turbalık ve bataklık arazilerde ortaya çıkar (Bowles vd. 2005). Bu habitatların turba toprakları aşırı yüksek baz konsantrasyonlarına sahip olmasına rağmen, çoğu besin turba topraklarında orkide mikorizasına bağlıdır ve özellikle asidik koşullar altında bitkinin besin alması için uygun değildir (Vitt ve Chee, 1990). Bazı faktörler bu koşulları hafifletebilir. Örneğin, mikorizal funguslar, turba topraklarında mineral alımının etkinliğini artırabilir ve bu habitatlardaki orkideler için uygun bir çimlenme alanının yanı sıra rekabet avantajı sağlayabilir (Rasmussen, 1995).

Filimonova vd. (2019;2020) *Epipactis atrorubens* ile yaptıkları çalışmalarda bu türün yetiştiği toprak çeşitlerini incelemiştir. Türün yetiştiği serpantinli ve granitli toprakların fiziksel ve kimyasal özellikleri ilk kez incelenerek ortaya konulmuştur. Serpantin topraklar, zayıf fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı genellikle bitki büyümesi için elverişsizdir (Kristy vd., 2005; Kumar vd., 2017). Düşük azot, fosfor, potasyum ve kalsiyum içerikleri, yüksek magnezyum ve demir seviyeleri, nispeten yüksek konsantrasyonlarda nikel, krom, kobalt ve nötrden alkaliye kadar pH'a sahiptirler ve bunların tümü bitkiler üzerinde zararlı ve toksik etkilere sahiptir (Brady vd., 2005; Van der Ent vd., 2015; Kumar vd., 2017). Serpantinli topraklarda daha yüksek metal konsantrasyonlarına ve daha düşük azot ve fosfor seviyelerine rağmen, *E. atrorubens*, granit üzerinde büyüyenlere kıyasla daha büyük bir popülasyona ve daha fazla canlılığa sahiptir. Serpantin yüzeylerindeki bitkiler, granitler üzerindeki bitkilere kıyasla daha fazla sayıda meyve oluşumu, daha büyük kök uzunlukları ve daha kalın yaprak gövdesi ile karakterize edildi. İyi gelişmiş orkide mikorizaları, bu türün olumsuz serpantin koşulları altında hayatta kalmasına katkıda bulunmuştur (Filimonova vd., 2020).

Serpantinli topraklar düşük Ca/Mg oranları, yüksek Fe, Ni, Cr ve Co konsantrasyonları, düşük besin seviyeleri ve zayıf nem tutma kapasitesi ile karakterize edilir (Djordjevic vd.,2016b; Brady vd.,2005). Ayrıca, pH değerleri nötrden alkaliye değişir ve bu da bitkiler üzerinde tamamen zararlı ve toksik etkilere katkıda bulunur (Kumar vd., 2017).

Avrupa'da karasal orkidelerin kireçli topraklarda yetiştiği, bu nedenle en fazla türün kireçtaşı, tebeşir, dolomit ve karbonat şistler, kum, kumtaşı, killer, çakıllar, çakıl kayaçlar ve kireçli topraklarda oluştuğu ileri sürülmüştür (Djordjević and Tsiftsis 2020).

Ors vd.(2010) yaptığı çalışmada orkidelerin geliştiği alanlardan aldıkları toprak örneklerinin PH değeri 5,71-7,81 arasında, organik madde miktarını ise %1,06-38,96 arasında değiştiğini açıklamışlardır. *Platanthera bifolia*, pH değeri 5,1 ile 8,9 arasında değişen topraklarda; taşkın ormanlarından kalsifil kayın ormanları ve kuru çam ormanlarına ve fakir meralardan zengin mezofil otlaklarına kadar, tam güneşte ve derin gölgede ve çok sayıda bitki topluluğunda büyüyebilir (Adamowski 2006).

Leff vd. (2015), yüksek N ve P girdisinin, mikorizal funguslar da dahil olmak üzere otlaklardaki mikrobiyal topluluklarda bir kaymaya yol açtığını kaydetmiştir. Diğer bitkilerin çoğundan farklı olarak, orkideler genellikle N'nin organik formlarını

inorganik formlara tercih eder (Rasmussen, 1995) ve inorganik N aslında büyümeyi engelleyebilir veya toksisiteye yol açabilir (Crawford 1995 ; Dechorgnat vd. 2011).

Figura vd. (2019), büyük ölçüde duyarsız olan ötrofik habitatlarda yaşayan orkidelere kıyasla, nitrat seviyelerine oldukça duyarlı olan oligotrofik habitatlarda yaşayan orkideleri belirlemiştir. Ayrıca nitratın tohum çimlenmesini engellemede doğrudan bir rolü dolduğu için nitrat seviyelerini orkide dağılımına bağladılar. Besin kaynaklarının (mineral veya organik) orkide mikorizal funguslar üzerindeki rolü hakkında daha az şey bilinmektedir ve bu tür bilgiler, *Ceratobasidium*'un *P. leucopHaea* köklerinde daha yaygın olup olmadığını çözmeye yardımcı olabilir, çünkü bu fungus toprakta daha boldur (Thixton, 2020). Hadley ve Ong (1978), *Ceratobasidium cornigerum* izolatlarının nitrat ve diğer azot kaynakları üzerinde iyi geliştiğini ve azot 'ekonomilerinde' *Tulasnella calospora*' dan daha verimli olduklarını bildirmiştir (Thixton, 2020). Nurfadilah vd. (2013), potansiyel karbon (C), azot (N) ve fosfor (P) kaynaklarının *Ceratobasidium*, *Sebacina* ve *Tulasnella*'nın fotosentetik orkidelerdeki üç ana mikorizal fungus türü- büyümesi üzerindeki etkisini araştırdı ve in vitro olarak, her üç fungus türünün de C, N ve P kaynaklarının "geniş ve değişken bir menüden" yararlandığını gösterdi. Ayrıca bu fungusların inorganik N kaynağı olarak amonyum kullandığını da belirlediler (Thixton, 2020).

Dünyada son yıllardaki, insan faaliyetleri nedeniyle atmosferde artan sera gazı küresel ısınmaya neden olmuş ve küresel yüzey sıcaklığı 2011-2020 döneminde 1850-1900 döneminin 1,1°C üzerine çıkmıştır. İnsan kaynaklı iklim değişikliği günümüzde dünyanın her bölgesinde hava ve iklim koşullarındaki aşırılığın temel sebebi sayılabilir. Bu durum, doğa ve insanlar üzerinde yaygın olumsuz etkilere ve buna bağlı kayıp ve zararlara yol açmaktadır. Yeryüzünün daha fazla ısınmayla birlikte, her bölgede iklimsel etki faktörlerinde eş zamanlı ve çoklu değişikliklerinin giderek daha fazla yaşanacağı öngörülmektedir (IPCC, 2023).

Küresel iklim değişikliğinin beklenen etkileri arasında; deniz seviyesi değişiklikleri, enerji sorunu, insan sağlığının bozulması ve biyoçeşitlilik yıkımı ile temiz su kaynakları ve ormanların azalması, tarımın zarar görmesi yer almaktadır.

Küresel iklim değişikliği ve etkileri risk grubunda kabul edilen Ülkemizde özellikle İç Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinin olası etkilerden daha çok etkileneceği tahmin edilmektedir. Öncelikle Ülkemizin güney yarısında olmak üzere yağışların azalacağı, sıcakların tüm Ülkede artacağı olası küresel iklim değişikliği senaryosu değerlendirilmelerindendir (Turan, 2018). Son yıllarda oluşan sel, ısı dalgaları,

orman yangınları ve kuraklıklarda bir artış gerçekleşmiş ve karasal ekosistemler çevre olaylarına karşı daha savunmasız hale gelmiştir. Ülkeler arası İklim Değişikliği Paneli (IPCC) gelecekte kuraklıkların, özellikle Akdeniz havzası gibi iklim değişikliğine duyarlı bölgelerde yoğunlaşabileceği konusunda uyarılarda bulunmuştur (Oğuz vd., 2021).

Bu tezin araştırma materyali olan *Dactylorhiza nieschalkiorum* türünün dahil olduğu *Dactylorhiza* cinsi ülkemizde 9 türe ait 15 takson (melezler dışında) ile temsil edilmektedir. *Dactylorhiza* cinsine ait bireyleri yumrulu çok yıllık bitkilerdir. Yumruları 2 bazen 3, turp şeklinde veya yassı elsi, uçta parçalı nadiren bütündür. Gövdenin içi dolu veya boş, yumruya bağlandığı yerde stolunlu veya stolunsuzdur. Yapraklar en az 3 adet, genellikle gövde üzerinde, tabanda kümeli, benekli-boyalı veya beneksiz-boyasız, üsttekiler brakteye benzerdir. Çiçek durumu başak, spata gibi büyük brakte tarafından sarılmaz. Brakteler otsu alttakiler yumurtalıktan uzundur. Çiçekler pembe, kırmızımsı, mor, morumsu-menekşe, sarı ve nadiren beyazdır. Yan çanak yapraklar dik, yayılmış veya geriye kıvrıktır; sırt çanak yapraklar $\pm$ dik, miğferli, taç yapraklardan uzundur. Dudak tam veya $\pm$ loblu, mahmuzlu, nadiren üstte sivilceli, nokta veya çizgi şeklinde koyu desenli, bazen desenler ile noktalar belirsizdir. Mahmuz en az 1 mm kalınlığında silindirik, koni veya kase biçiminde, yumurtalıktan kısa, eşit veya bazen uzun, nektarsızdır. İç halkadaki stamenler tamamen indirgenmiş olup dış halkadaki orta stamen normal, diğer ikisi sitaminot şeklindedir. Kolon dik kısa dik; gagacığın orta lobnu paralel, anter lokuslarının arasına yerleşmiştir; polinyum tepeye doğru şişkinleşmiş çomaksı, kavdikulalı, her biri viskidiyuma bağlanmış, ikisi birlikler tek bursiluka ile sarılıdır. Yumurlalık sapsız ve tüysüzdür. Resimli türkiye florası atıf yap.

Dactylorhiza nieschalkiorum yumrulu, stolonsuz, 30-60 cm boyunda bitkilerdir. Yumru 2-5x1-1,5 cm, 2-3 parçalı, parmak şeklindedir. Gövde kalın içi boş, tabanda 2-3 zarsı yapraklıdır. Yapraklar beneksiz nadiren koyu olmayan benekli, 4-9 adet olup 10-20x2-5 cm'dir. Alttaki yapraklar mızraksı, dik, bazen hafifçe yaysı, ortada en geniş; en üstteki yapraklar brakte benzeri, genellikle çiçek durumuna ulaşmaz, bazan ulaşır. Başak 8-20x3,5-6 cm, yumurtamsı ile silindirik, sık, 20-80 adet büyük çiçekli; çiçekler açık kırmızı ile açık memekşemsi kırmızıdır. Brakteler 20-26x4-5 mm, yeşil veya kırmızımsı, çiçekleri aşar, yumurtalıktan iki kat uzun, yukarı doğru küçülür. Yan çanak yapraklar ters yumurtamsı, 9-17x3-6 mm, az ya da çok yatay ile eğik yukarı doğru; orta çanak yaprak 8-12x3-5 mm, taç yapraklarla miğfer oluşturur. Taç yapraklar 7-

14x3-4,5 mm. Dudak (8)-10-15x15-20 mm, geniş eliptik, zayıf üç loblu; yan loblar baklavamsı, düz veya hafif geri bükülmüş, kenarları dişli; orta lob üç köşeli 1,5-4x3-4,5 mm, biraz önde, yan loblardan daha küçük, dudağın ortası genellikle beyazdır. Mahmuz silindirik, 10-14x3-5 mm, kalın, yatay veya hafif aşağı doğru yönelimli, yumurtalıktan daha uzundur. Yumurtalık 10-15x2-3 mm'dir.

Çiçeklenme zamanı Haziran –Temmuz(-Ağustos) aylarıdır. Dere ve kaynak kenarlarındaki ıslak ve bataklık yerler, göl kenarlarındaki bataklıklar, bataklık orman açıklıkları ve iğne yapraklı orman habitatında yaşarlar. Türkiye için endemik olan *Dactylorhiza nieschalkiorum* 1100-2000 m rakımda G. Marmara Bölümü; Karadeniz Bölgesinde; Bolu Abant gölü civarı, Bursa- Uludağ, Çankırı-İlgaz Dağı geçidi, Karabük-Keltepe, Kastamonu-Azdavay/Küre yolu, Ordu-Akkuş ve Trabzon-Köprübaşı'nda yayılış göstermektedir.

Bu bilgiler ışığında tez çalışmasının hipotezi şu sorulara verilecek cevaplar olacaktır:

1. *D. nieschalkiorum* türünün farklı habitatlardaki popülasyonlarında fungal çeşitlilik değişiyor mu?

Habitat farklılıklarına bağlı olarak orkidelerin köklerindeki fungal çeşitlilik değişebilir.

2. Fungal çeşitlilikteki değişiklik tohumların çimlenmesini ve dolayısıyla popülasyonlardaki birey sayılarını etkiliyor mu?

Mikorizal fungal çeşitlilikteki farklılıklar tohum çimlenmesini ve dolayısıyla popülasyondaki birey sayısını da etkileyebilir.

3. Bu türün tohumlarının çimlenmesi kültür ortamına ve fiziksel koşullara göre değişiyor mu?

Bu orkide türüne ait tohumlarda olası dormansinin kırılması için gerek kültür ortamı gerekse fiziksel koşullar tohum çimlenmesi üzerinde doğrudan etkili olabilir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Araştırma Alanı Ve Materyal

Araştırma alanı olarak Karadeniz Bölgesinin Doğu ve Batısından olmak üzere iki alan seçilmiştir. Bu alanlar Tablo 3.1 'da verilmektedir. Bu tezde incelenen *Dactylorhiza nieschalkiorum*, taban suyu yüksek, sulak, çayırılık, dere kenarları ve Rize Bölgesi çalışma alanında arazide seyrek bulunan *Alnus glutinosa* (kızılağaç) bireylerinin civarında yayılış gösteren endemik bir türdür. Çalışma alanlarımızın her ikisinde de taban suyu yıl boyunca yüksek seyretmektedir.

Türün taksonomik olarak adlandırılmasında Resimli Türkiye Florası (İşler., 2022) ve Flora of Turkey (Davis, 1984) kullanılmıştır.

Tablo 3.1 Çalışma alanları ve rakımları

İl	Çalışma Alanı	Rakım	Çalışma Alanı	Rakım	Çalışma Alanı	Rakım
Rize	Cimil Yaylası	1696	Garzavan Yaylası	1906	Ovit Yaylası	2661
Bolu	Abant Gölü	1350				



Şekil:3.1 Bolu- Abant Gölü Haritası (<http://www.arasikackm.com/m/bolu-abant>)



Şekil 3.2 İkizdere Yaylaları Haritası (<http://www.sanlier-zando.com>)

Bu tezin araştırma materyali olan *Dactylorhiza nieschalkiorum* türünün dahil olduğu *Dactylorhiza* cinsi ülkemizde 9 türe ait 15 takson (melezler dışında) ile temsil edilmektedir. *Dactylorhiza* cinsine ait bireyleri yumrulu çok yıllık bitkilerdir. Yumruları 2 bazen 3, turp şeklinde veya yassı elsi, uçta parçalı nadiren bütündür. Gövdenin içi dolu veya boş, yumruya bağlandığı yerde stolunlu veya stolunsuzdur. Yapraklar en az 3 adet, genellikle gövde üzerinde, tabanda kümeli, benekli-boyalı veya beneksiz-boyasız, üsttekiler brakteye benzerdir. Çiçek durumu başak, spata gibi büyük brakte tarafından sarılmaz. Brakteler otsu alttakiler yumurtalıktan uzundur. Çiçekler pembe, kırmızımsı, mor, morumsu-menekşe, sarı ve nadiren beyazdır. Yan çanak yapraklar dik, yayılmış veya geriye kıvrıktır; sırt çanak yapraklar $\pm$ dik, miğferli, taç yapraklardan uzundur. Dudak tam veya $\pm$ loblu, mahmuzlu, nadiren üstte sivilceli, nokta veya çizgi şeklinde koyu desenli, bazen desenler ile noktalar belirsizdir. Mahmuz en az 1 mm kalınlığında silindirik, koni veya kase biçiminde, yumurtalıktan

kısa, eşit veya bazen uzun, nektarsızdır. İç halkadaki stamenler tamamen indirgenmiş olup dış halkadaki orta stamen normal, diğer ikisi sitaminot şeklindedir. Kolon dik kısa dik; gagacığın orta lobnu paralel, anter lokuslarının arasına yerleşmiştir; polinyum tepeye doğru şişkinleşmiş çomaksı, kavdikulalı, her biri viskidyuma bağlanmış, ikisi birlikler tek bursiluka ile sarılıdır. Yumurlalık sapsız ve tüysüzdür (İşler ,2022).

Dactylorhiza nieschalkiorum yumrulu, stolonsuz, 30-60 cm boyunda bitkilerdir. Yumru 2-5x1-1,5 cm, 2-3 parçalı, parmak şeklindedir. Gövde kalın içi boş, tabanda 2-3 zarsı yapraklıdır. Yapraklar beneksiz nadiren koyu olmayan benekli, 4-9 adet olup 10-20x2-5 cm'dir. Alttaki yapraklar mızraksı, dik, bazen hafifçe yaysı, ortada en geniş; en üstteki yapraklar brakte benzeri, genellikle çiçek durumuna ulaşmaz, bazan ulaşır. Başak 8-20x3,5-6 cm, yumurtamsı ila silindirik, sık, 20-80 adet büyük çiçekli; çiçekler açık kırmızı ile açık memekşemsi kırmızıdır. Brakteler 20-26x4-5 mm, yeşil veya kırmızımsı, çiçekleri aşar, yumurtalıktan iki kat uzun, yukarı doğru küçülür. Yan çanak yapraklar ters yumurtamsı, 9-17x3-6 mm, az ya da çok yatay ila eğik yukarı doğru; orta çanak yaprak 8-12x3-5 mm, taç yapraklarla miğfer oluşturur. Taç yapraklar 7-14x3-4,5 mm. Dudak (8)-10-15x15-20 mm, geniş eliptik, zayıf üç loblu; yan loblar baklavamsı, düz veya hafif geri bükülmüş, kenarları dişli; orta lob üç köşeli 1,5-4x3-4,5 mm, biraz önde, yan loblardan daha küçük, dudağın ortası genellikle beyazdır. Mahmuz silindirik, 10-14x3-5 mm, kalın, yatay veya hafif aşağı doğru yönelimli, yumurtalıktan daha uzundur. Yumurtalık 10-15x2-3 mm'dir(İşler ,2022)..

Çiçeklenme zamanı Haziran –Temmuz(-Ağustos) aylarıdır. Dere ve kaynak kenarlarındaki ıslak ve bataklık yerler, göl kenarlarındaki bataklıklar, bataklık orman açıklıkları ve iğne yapraklı orman habitatında yaşarlar. Türkiye için endemik olan *Dactylorhiza nieschalkiorum* 1100-2000 m rakımda G. Marmara Bölümü; Karadeniz Bölgesinde; Bolu Abant gölü civarı, Bursa- Uludağ, Çankırı-Ilgaz Dağı geçidi, Karabük-Keltepe, Kastamonu-Azdavay/Küre yolu, Ordu-Akkuş ve Trabzon-Köprübaşı'nda yayılım göstermektedir.

Çalışmamızda araziden rastgele seçilen en az üç bireyden kök örnekleri toprağıyla beraber alınıp laboratuvara getirildi ve fungus izolasyonları yapıldı. Örneklemeler bitkinin vejetatif organları toprak üzerine çıkmaya başladığı Mayıs ayından itibaren köklerin kuruduğu Eylül ayına kadar aylık peryotta yapıldı(İşler ,2022)..



Şekil 3.3 *Dactylorhiza nieschalkiorum*

3.2. Tohumların Toplanması

D. nieschalkiorum tohumları Temmuz ayında Bolu-Abant Gölü'nden ve Rize-Garzavan ve Cimil yaylalarından toplandı. Tohumlar kapsüllerden çıkarılıp bir süre oda sıcaklığında kurutulduktan sonra kahverengi şişelerde konup buzdolabında saklandı.



Şekil 3. 4 *Dactylorhiza nieschalkiorum* tohumları

3.3. Tohum Paketlerinin Hazırlanması

Arazidan toplanıp buzdolabında saklanan tohumlar, 4x8cm ebadındaki, suya dirençli kumaş parçaları arasına konarak slayt çerçevesi arasında sabitlenerek paketler hazırlandı.

3.4. TTC (2,3,5-Trifenil Tetrazolium Kloride) İle Tohum Canlılık Testleri

Steril 1 litre saf suya 10 g TTC çözündürülerek ve 2 M NaOH ile pH 7'ye ayarlandı ve çözelti $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta muhafaza edildi (Van Waes ve Deberg, 1986a).

Hazırlanan tohum paketleri, deneye uygun hazırlanmış olan saksılardaki topraklara gömülmüş ve haftada bir alınarak TTC bulunan ependorflara konduktan sonra 25°C 'de 12 saat karanlıkta inkube edildi. Ependorf içindeki tohumlar boya uzaklaştırıldıktan sonra saf su ile yıkandı ve mikroskop altında toplam tohum sayısı, pembe renge boyanan tohumlar, sayılarak not edildi.

3.5. Fungus İzolasyonu

Bitki kök örneklerinden fungus izolasyonu için Clements vd. (1986) fungus izolasyon ortamı kullanıldı. Tablo 3.2 'de verilen kimyasallar tartılıp 1 L saf suda çözündürülerek pH 5.8' e (WTW PH 315i, Eksper) ayarlandıktan sonra 121°C 'de 15 dk otoklavda (NUVE L60) steril edildi. Laminar flow kabini (NUVE LN 90) içinde otoklavdan çıkarılan besi yeri petri kaplarına (Fıratmed 90/17 mm) dökülüp katılaştırıldı.

Tablo 3.2. Fungus izolasyon ortamı ve modifiye yulaf besi ortamının içeriği (Clements vd. 1986).

Element	Besi Yerleri	
	Fungus İzolasyon Ortamı (G/Lt)	Modifiye Yulaf Ortamı (G/Lt)
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,5	0,2
KH ₂ PO ₄	0,2	0,2
KCl	0,1	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1	0,1
Yeast Ekstrakt	0,1	0,1
Sukroz	5	2
Agar	10	10
Öğütülmüş Yulaf		3,5

Bitkinin vejetatif organları toprak yüzeyine çıkmaya başladığı andan kökler tamamen kuruyuncaya kadar aylık olarak izolasyon yapıldı. Laboratuvara getirilen araziden rastgele seçilen 3 bitkiden alınan kök örnekleri musluk suyunda yıkandıktan sonra, % 1.5'lik NaOCl çözeltisinde 7 dakika yüzey sterilasyonu yapıldı ve üç kez steril saf ile yıkandı. Steril kök örnekleri, kabin içinde steril koşullarla parçalara ayrıldı ve içinde fungus izolasyon besin ortamı (Clements vd. 1986) bulunan petri kaplarına steril ekipmanlarla konuldu. Herbir kök bir petri kabına alındı. Petri kapları karanlıkta 25⁰C'de inkübasyona bırakıldı. Kök parçalarından besiyerine doğru gelişen fungus hifleri alınıp taze besiyerine aktararak saflaştırıldı. Saflaştırılan fungal izolatlar içinde, fungus izolasyon ortamı bulunan 1x10 cm stok tüplerine aşıl原因arak geliştirildi ve bozdolabında daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

3.6. İzole Edilen Fungal İzolatların Morfolojik Ve Moleküler Yöntemlerle Teşhisi

3.6.1. İzole Edilen Fungal İzolatların Morfolojik Yöntemlerle Teşhisi

Bitki köklerinden izole edilen fungusların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için PDA (Patates Dekroz Agar) (HIMEDIA M403-500G) besiyeri litreye 36 g tartılıp çözündürülmüş otoklavda 121⁰C'de 15 dakika steril edilerek, steril kabin içinde petri kaplarına döküldü. Bu petri kaplarına fungus izolasyon ortamında aktiveleştirilen izolatlardan alınan misel diskleri (0,5x0,5 cm çapında) kabin içinde steril ekipmanlarla ekildi. 24 saatlik periyotta petri kaplarındaki gelişimleri ölçüldü ve fungus hifleri petri kaplarını tamamen kaplayıncaya kadar ölçümlere devam edildi.

PDA besi ortamında geliştirilen fungal izolatların koloni rengi ve skleroit rengi, Londra Royal Horticultural Society renk kataloğuna göre tespit edildi (Olaya vd., 1994). Petri kabında gelişen fungusların hif görünümleri, koloni durumları ve havai hif oluşturup oluşturmadığı tespit edilerek kaydedildi.

Laktofenol koton blue boyama

Petri kaplarında fungus izolasyon ortamında aktiveleştirilen izolatlardan alınan misel diskleri (0,5x0,5 cm çapında) lam üzerine alınarak bir damla laktofenol koton blue damlatıldı ve 5 dk. hiflerin boyanması beklendi ve 3 kez saf su ile yıkama yapılarak boya fazlası uzaklaştırıldı.

Fungal izolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesi için laktofenol cotton blue ile boyanan fungal hifler, mikroskopta (Zeiss Axiolab A1 mikroskop ve Zeiss Axiolab

105 görüntüleme sistemi) incelendi ve her bir izolat için 20 hücrenin hif çapları ölçülerek, fotoğraflandı.

3.6.2. Fungal İzolatların Moleküler Yöntemlerle Teşhisi

Bu amaçla CTAB (cetil trimetil amonyum bromür) yöntemi kullanıldı.

DNA'sı izole edilecek izolatların hif gelişimi için hazır PDB (Merck) besi ortamı litreye 24 g tartılıp, eritilerek 150 ml'lik erlene 50 mL kondu. Pamuk ve alüminyum folyo ile ağızları kapatılarak 15 dk 121⁰ C' de otoklavda steril edildi. Hazırlanan besin ortanlarına steril kabin içinde fungus izolasyon ortamında gelişen izolatlar steril koşullarda aktarıldı. Çalkalayıcıya (WiseShake) alınan erlenlerde 15-20 gün hifler geliştirildi. İzolatlar steril kabinde içinde steril kurutma kağıdı bulunan petri kabında iyice kurutularak ependorflara alındı ve -20 ⁰ C' de saklandı. Analiz yapılacak izolatlar liyofilizatörde kurutularak daha sonra sıvı azot kullanak ezildi ve analize hazır hale getirildi.

İzolatların cins düzeyinde kimliğini belirlemek için elde edilen ITS dizisi, sekanslama işlemleri için Macrogen Corporation (Macrogene INC., Seul, Kore Cumhuriyeti) gönderilmiştir. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'ndeki (NCBI) Temel Yerel Hizalama Arama Aracını (BLAST) kullanarak GenBank veritabanındaki dizilerle karşılaştırıldı (<https://blast.ncbi.nlm.nih>).

DNA izolasyonu için gerekli çözeltilerin hazırlanması

0.5 M Tris-HCl tamponu (pH 8)

121,1 g Trizma baz (Tris hydroxymethyl aminomethane) (Merck) son hacim 100ml olacak şekilde hazırlanıp, hazırlanıp % 37 'lik HCl çözeltisi ile pH 8'e ayarlanır ve 20 dk 121 ⁰ C' de otoklavda steril edilerek oda sıcaklığında saklandı (Sambrook ve Russell, 2001).

Na- EDTA tamponu

Bir miktar distile su içinde çözündürüldükten sonra son hacmi 100 mL'ye tamanlanan EDTA çözeltisi 2M NaOH ile pH 8' e ayarlanarak otoklavda steril edilerek oda sıcaklığında saklandı (Sambrook ve Russell, 2001).

1.4 M NaCl stok hazırlığı

5.6 g NaCl bir miktar distile suda çözündürülerek 100 ml'lik çözeltisi hazırlandı.

Tablo 3.3 CTAB (Hekzadesil trimetil amonyum bromür) buffer hazırlama (100 mL)

CTAB	%2 lik	2gr
NaCl	1,4 M	8.19 mL
EDTA	20 m M	4 mL

TRIS-HCl	100 m M	20 mL
2-mercaptoethanol	%2 lik	2 mL

Hazırlanan çözeltiler ve %2 'lik 2-mercaptoethanol Tablo 3.3' deki oranlara göre 150 mL'lik kehribar şişeye konarak, son hacim 100 mL ye tamamlandı.

Proteinaz K hazırlığı

20 mg/mL proteinaz hazırlanarak, vortekslenmiş ve 1mL'lik ependorflara 60 µl konularak - 20 °C 'de saklandı.

TBE stok hazırlığı (x10)

43.2 g Tris, 22 gr Borik Asit ve 16 mL EDTA tamponu son hacim 400 ml olacak şekilde dd H₂O ile hazırlandı.

CİA(kloroform izomil alkol) hazırlama

24:1 kloroform: izopropil alkol olarak 25 ml hazırlandı.

Genomik DNA izolasyonu için SaghaiMaroof vd.(1984) yönteminden modifiye edilen (Aboul-Maaty and Oraby, 2018) CTAB yöntemi kullanılmıştır. Fungal hif örneği 0,05 gr. tartılarak ve 1.5 lik ependorfa konarak üzerine 450 µl sıcak CTAB eklenir ve 10 sn kadar vortekslenerek, su banyosunda 1 saat bekletildi. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra 15 µl proteinaz K eklendi ve 37 °C de 30 dk bekletildi. Etüvden çıkarılan her bir ependorfa 465 µL CİA eklenerek, 12000 Rpm 5 dk santrifüj edilerek üst kısmı 1.5 luk ependorfa alındı. Üst fazın miktarında izopropil alkol eklendi. Hafifce sallanıp 30 dk +4 buzdolabında bekletildi ve 12000 Rpm de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak pelet (yani yoğun DNA) yalnız bırakıldı. Herbir ependorfa 300-400 µL soğuk (-20) %70 lik absüle etanol eklendi ve 12000 Rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak pelet bırakıldı. Ependorflar desikatörde alkol iyice ucana kadar kurutuldu. Desikatörden alınan kurumuş DNA örnekleri üzerine 20-25 µL TE eklendi ve – 20°C de saklandı (Pascual vd., 2000).

Agaroz jel Elektroforez

İzole edilen DNA varlığının belirlenmesi amacıyla agaroz jel elektroforezi (Thermo Scientific EC 300 XL) yapıldı.

1xTBE Hazırlama

Stok 10xTBE:dd saf su 1:9 oranında yaklaşık 1 lt hazırlanır. Yürütme tankını doldurmak ve agaroz hazırlamak için kullanılır.

TE hazırlama

Daha öce hazırlanan 0.5 M tris-HCl tamponundan 0,1 mL ve 0.5 M EDTA tamponundan 1 mL alınarak son hacim 50 mL'ye dd saf su ile tamamlandı.

Son hacim 50 mL ye dd saf su ile tamamlanır.

Agaroz hazırlama

1:100 oranında agaroz:1xTBE hazırlanıp ısıtılarak çözüldü. Oda sıcaklığına geldikten sonra kenarları yapışkanlı kağıt bantla kapatılmış ve kuyucuk oluşturacak taraklar yerleştirilmiş jel kabına döküldü ve katılaşana kadar soğutuldu. Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkartılarak 1xTBE içeren elektroforez tankına aktarıldı. Daha sonra her bir örnek için ayrı ayrı olacak şekilde 1,7 µL dd H₂O, 1 µL 6xDNA loding, 0.3 µL Jel red ve 3 µL DNA karıştırılarak mikro pipetle her bir örnek agaroz jeldeki her bir kuyucuğa konuldu. Son kuyucuğa ise 1 µL 1 Kb DNA ladder ve 0,3µL Jel Red karışımı olan marker son yuvaya konularak yükleme yapıldı. DNA elektroforezi 80 mA'da yaklaşık 30 dk. süreyle gerçekleştirildi. Syngene Gene Genius Bio imaging System görüntüleme sisteminde DNA bantları görüntülendi.

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu)

DNA'sı elde edilen izolatların ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesini kodlayan rDNA bölgesinin çoğaltılması için ITS 1 ve ITS4 primerleri kullanıldı. (White vd., 1990). PCR, Thermal Cycler (Primus 25) ve 0.2 mL'lik PCR tüpleri kullanıldı.

Her aşaması buz içinde gerçekleştirilen PCR uygulamalarında ilk olarak PrimerITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)(Qiagen), PrimerITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC)(Qiagen) (White vd., 1990), dNTP karışımı (25 mM olacak şekilde her birinden dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) (Promega), 10X Taq tampon (MgCl₂ içinde) (Sigma) kuru buz için konarak ependorfa kondu ve vortekslendi. *Taq* DNA polimeraz enzimi -20 °C'den çıkarılarak eklendi (Salazar vd., 1999).

Tablo 3.4 PCR için karışım

dd H ₂ O	32,75 µL
5xPCR tamponu	10 µL
dNTP mix (2.5 mM)	1 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL
Primer 1 (ITS1) (50pmol)	1 µL
Primer 2 (ITS4) (50pmol)	1 µL
GoTag (5U)	0.25 µL
0.25 µL	1 µL

Herbir örnek için Tablo 3.4’de belirtildiği gibi hazırlanan karışım PCR tüplerine kondu ve vortekslendi. Ayrıca birde negatif kontrol hazırlanıp PCR tüpüne kondu ve tüpler Thermal Cycler’a yerleştirilerek aşağıdaki verilen program gerçekleştirildi.

Tablo 3.5 PCR reaksiyon şartları

Süreç	Sıcaklık	Süre
Başlangıç denatürasyonu	94° C	3 dk
Denatürasyon	94° C	1 dk
Yapışma	49° C	2 dk
Uzama	72° C	3 dk
Son Uzama	72° C	7 dk

Reaksiyon 30 döngü olarak gerçekleştirildi.

3.7. Tohum Çimlenme Testleri

3.7.1. In vitro Simbiyotik Tohum Çimlenme Testleri

Bolu (Abant) ve Rize (Cimil ve Garzavan Yaylaları) örneklerinden elde edilen *Rhizoctonia* benzeri ve fungal izolatlar simbiyotik tohum çimlenmesi testlerinde kullanıldı.

Bu amaçla Clements vd. (1986) modifiye yulaf ortamı için Tablo 3.2’deki formül kullanılarak hazırlandı. Simbiyotik kültür tüplerine (3x18cm) dökülerek otoklavda 121⁰C’de 20 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkarılan tüplerdeki besi yeri 45⁰ açı ile katılaştırıldı.

Tohumlar küçük kareler halinde kesilmiş kurutma kâğıtları arasına bir miktar konup paketlenildi. Hazırlanan bu paketler % 1.5’luk sodyum hipokloritte 15 dk steril edildikten sonra steril saf su ile üç kez yıkandı. Steril kabinde içinde steril ekipmanlarla modifiye yulaf ortamı bulunan tüplere tohumlar ekildi. Daha sonra steril şartlarda her bir tüpe farklı bir fungal izolat aşılandı. Bu tüpler 27°C’de, 16:8 saat fotoperiyota ayarlı iklim odasına konularak çimlenme durumları takip edildi. Her bir fungal izolatın tohum çimlenmesi üzerine etkisi 6 kez tekrarlandı.

3.7.2. Asimbiyotik Tohum Çimlenme Testleri

Tohumların çimlenmesine farklı besi ortamlarının etkisinin gözlenebilmesi amacıyla çeşitli asimbiyotik kültür ortamları kullanıldı. Bu kültür ortamları ve içerikleri Tablo 3.3’de verilmiştir. Çalışma 3 ay sürdü ve çimlenen tohumlar sayıldı.

Topraklı su agarı (TSA) besin ortamı için çalışma alanından alınarak laboratuvara getirilen toprak örnekleri kurutulup elenerek hazırlandı. 1 lt ‘ye 20 gr agar

özündürölerek hazırlandıktan sonra, içinde 3 gr toprak bulunan tüplere ilave edilmiş ve alüminyum folyo ile kapatılarak 15 dk 121 °C’de otoklavda steril edildi. Steril edilen tüpler 45° yatık olarak katılaştırıldı.



Tablo 3.6 Asimbiyotik tohum çimlenmesinde kullanılan temel besin ortamları WVD (Wan Ves Deberg), KC (Knutson C), MS(Murasing Skoog) ve WVD ortamındaki bazı düzenlemeler (-aa (amino asit eksik),-ia (inorganik asit eksik), -iaaa (ingorganik asit eksik), su agarı (SA), TSA (Topraklı su agarı).

3.7.3. In situ Simbiyotik Çimlenme Testi

2015 yılında *D. nieschalkiorum* tohumlarının doğal ortamındaki akıbetini olası

Kimyasal içerik		Besin Ortamları							
		WVD (L.mg ⁻¹)					TSA (L.mg ⁻¹)	KC (L.mg ⁻¹)	MS (L.mg ⁻¹)
		WVD Temel Ortam	-aa	-ia	-iaaa	Su agarı			
Makro elementler	NH ₄ NO ₃	370	370	-	-	-	-	-	1650
	KNO ₃	400	400	-	-	-	-	-	1900
	(NH ₄) ₂ SO ₄	60	60	-	-	-	-	500	-
	MgSO ₄ .7H ₂ O	100	100	100	100	-	-	250	370
	KH ₂ PO ₄	300	300	300	300	-	-	250	170
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	-	-	-	-	1000	-
	CaCl ₂ .2H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	440
Mikro elementler	MnSO ₄ .4H ₂ O	25	25	25	25	-	-	7,5	22,3
	H ₃ BO ₃	10	10	10	10	-	-	-	6,2
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	10	10	10	10	-	-	-	8,6
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	-	-	-	0,025
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	-	-	-	0,25
	FeSO ₄ .7H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3	-	-	2,5	27,8
	Na ₂ EDTA	27,8	27,8	27,8	27,8	-	-	-	37,3
	KI	-	-	-	-	-	-	-	0,83
	CoCl ₂ .6H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	0,025
Amino asitler	L-Gutamin	100	-	100	-	-	-	-	-
	Glisin	-	-	-	-	-	-	-	2
Vitaminler	Nikotinik asit	2	2	2	2	-	-	-	0,5
	Pridoksin-HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	-	0,5
	Tiamin-HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	-	0,1
	Meso-inositol	1000	1000	1000	1000	-	-	-	100
	Biotin	0,05	0,05	0,05	0,05	-	-	-	-
	Agar	6000	6000	6000	6000	6000	6000	7000	6000
	Sukroz	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000	20000
	Toprak	-	-	-	-	-	3000	-	-
	PH	5,8	5,8	5,8	5,8	-	-	5,8	5,8

çimlenme sürecini takip etmek üzere doğal ortamındaki ana bitkilerin etrafına, her birinde 4-5 tohum paketi bulunan plastik kaplarda yaklaşık 2-3 cm derinlikte toprağa gömüldü. Doğal ortamlarına ekim yapılırken tohum paketlerinin araştırma alanındaki

ana bitkilere (yaklaşık 1-2 m) yakın olarak gömülmesine özen gösterildi. Bu işlem 2015 yılı Eylül ayında gerçekleştirilmiş ve 2016 yılı Nisan ayından itibaren 3-4 ayda bir 1 tohum paketi toprağı ile beraber alınıp laboratuvara getirilerek incelendi.



Şekil 3.5. Çalışma alanındaki bitki kökleri arasına gömülen tohum paketleri.

3.7.4 Ex situ tohum çimlenme testleri

2019 yılında *D. nieschalkiorum* habitatından farklı başka bir doğal alanda 3-4 cm derine gömülen ve aynı alanda bitki döküntüleri arasına tohum paketleri kondu. Altı ayda bir alınan tohum paketleri laboratuvara getirilerek mikroskop incelendi, tohum canlılık testleri yapıldı ve fotoğraflandı.

3.7.5. Ex vitro simbiyotik tohum çimlenmesi

Her iki çalışma bölgesinde bitkilerin yetiştiği alanlardan alınan toprak örnekleri, laboratuvara getirildi. Toprak testleri için toprak karışımı hazırlandı. Toprak örnekleri 3:2 oranında toprak: perlit olarak hazırlanıp buzdolabı poşetlerine konuldu ve 24 saat arayla iki kez, 1 saat 121 °C’ de otoklavda steril edildi. Hazırlanan toprak karışımı saksılara alınarak tohum paketleri yerleştirildi ve her bir saksıya bir fungal izolat aşılandı. Daha sonra bu toprak kültürlerinin yarısı doğal ortama özdeş sera koşullarına yarısıda iklim odasına kondu. İklim odasındaki saksılar 25 °C ve 16:8 saat (aydınlık: karanlık) fotoperiyoda ayarlandı. Tohum çimlenmesinden fide oluşumuna kadar gerçekleşen gelişme safhaları (Stewart ve Zettler, 2002) tarafından belirtilen gelişme

indeksi hafif değiştirilerek gruplandırıp S1-S4 aşamaları çimlenme ve gelişme olarak değerlendirildi.

Tablo 3.7 Gelişim aşamaları

S0	Çimlenme yok,
S1	Protokorm
S2	Yaprak primordiumu
S3	İlk fotosentetik yaprak
S4	Gelişmiş yapraklı (ve/veya köklü) fide

Tohum ekimi yapıldıktan 6 ay sonra gelişim aşamalarına göre tohum sayımları yapıldı.

3.8.Toprak Analizleri

Çalışma materyali olan *D. nieschalkiorum* bireylerinin yetiştiği çalışma alanları olan Rize- Garzavan Yaylası, Bolu- Abant Gölü çevresinden toprak örnekleri alındı ve pH, azot (Nelson, D.W. and Sommers, L.E., 1973), potasyum (Jackson, M.L., 1967), organik madde (Smith, H.W. and Weldon, M.D., 1941) ve toprak tekstürü analizleri (Bouyoucos, G.J., 1951) yapıldı. Bunun için araziden alınan toprak örnekleri laboratuvara getirilerek bitki artıklarından temizlendikten sonra toprak kurutma odasında ön kurutma yapılarak ve toprak kurutma dolabında 105 °C’ da kurutuldu. Kuruyan topraklar merdane yardımıyla ezilip, elenerek ve analize hazırlandı. Her analiz üç tekrarlı olarak yapıldı. Analizler Atatürk Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü/Rize, toprak laboratuvarına yaptırıldı. Elde edilen veriler, Tablo 3.8’ deki standart ölçüler ile karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı.

Tablo 3.8 pH, Azot), Potasyum Organik Madde analizlerinin değerlendirilmesi

Analiz	Değeri	Derecesi	Literatür
pH	<4		TS 8332
	4.00- 4.50	Aşırı Kuvvetli Asit	
	4.50-5.00	Çok Kuvvetli Asit	

	5.00- 5.50	Kuvvetli Asit	
	5.50-6.00	Orta Derecede Kuvvetli Asit	
	6.00-6.50	Hafif Asit	
	> 6.50	Nötr	
Azot (%)	< 0.05	Çok Az	(Nelson, D.W. ve Sommers, L.E., 197
	0.05-0.07	Az	
	0.07-0.15	Orta	
	0,15-0,25	Fazla	
	> 2,50	Çok Fazla	
K (ppm)	0-100	Az	Jackson, M.L., 1967
	100-300	Orta	
	300-400	Fazla	
	> 400	Çok Fazla	
Organik Madde	0-1	Çok Az	Smith, H.W. ve Weldon, M.D., 1941
	1.Şub	Az	
	2.Mar	Orta	
	3.Haz	Fazla	
	> 6	Çok Fazla	

3.9. İstatistiksel yöntem

Her deneydeki üç tekrardan elde edilen veriler, varyans analizine (ANOVA) tabi tutuldu ve SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi yapıldı.

4. BULGULAR

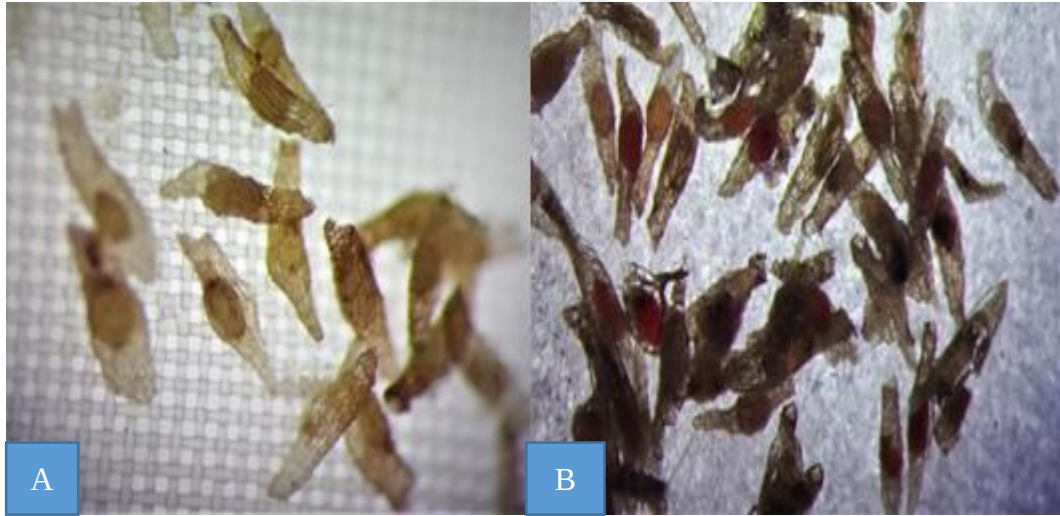
Dactylorhiza nieschalkiorum Türkiye için endemik olup Doğu, Batı Karadeniz ve Marmara bölgelerinde yayılış göstermektedir. *D. nieschalkiorum* Karadeniz Bölgesinde, taban suyu yüksek, sulak, çayırılık alanlarda yayılış gösteren endemik bir

türdür. Yaklaşık 700-2500 m rakımlar da oldukça seyrek bir yayılışa sahiptir. Arazideki bireyler oldukça dağınık bir yayılışa sahip olup tek tek bulunmakta olup, bazen iki birey arasında metrelerce uzaklık bulunmaktadır. Türün 20-80 cm arasında değişen boyu rakım yükseldikçe azalmaktadır (2500 rakımda yaklaşık 20 cm). Ayrıca pembe olan çiçek rengi de rakım yükseldikçe koyulaşmaktadır. Başaktaki çiçek oluşumu verimli olmasına karşılık tohum bulunduran kapsül sayısı (çoğunlukla 2-nadiren 10) oldukça düşüktür.

4.1. TTC (2,3,5-Trifenil Tetrazolium Kloride) İle Tohum Canlılık Testleri

Tohum çimlendirme testlerinden önce *D. nielschalkiorum*'un tohum canlılık oranı TTC ile tespit edilmiştir.

Tohum canlılık testleri için saksılara gömülen tohum paketleri 21 gün boyunca inkübe edildi ve her hafta bir tohum paketi alınarak tohum canlılık test yapılarak toplam tohum sayısı ve boyanan tohumlar sayılmıştır. Üçüncü hafta yapılan gözlemlerde tohum kabuğu 21.gün çatladı.



Şekil 4.1 A) TTC ile boyamadan önce ve B) Boyamadan sonra *D. nielschalkiorum* tohumlarının mikroskop görüntüsü.

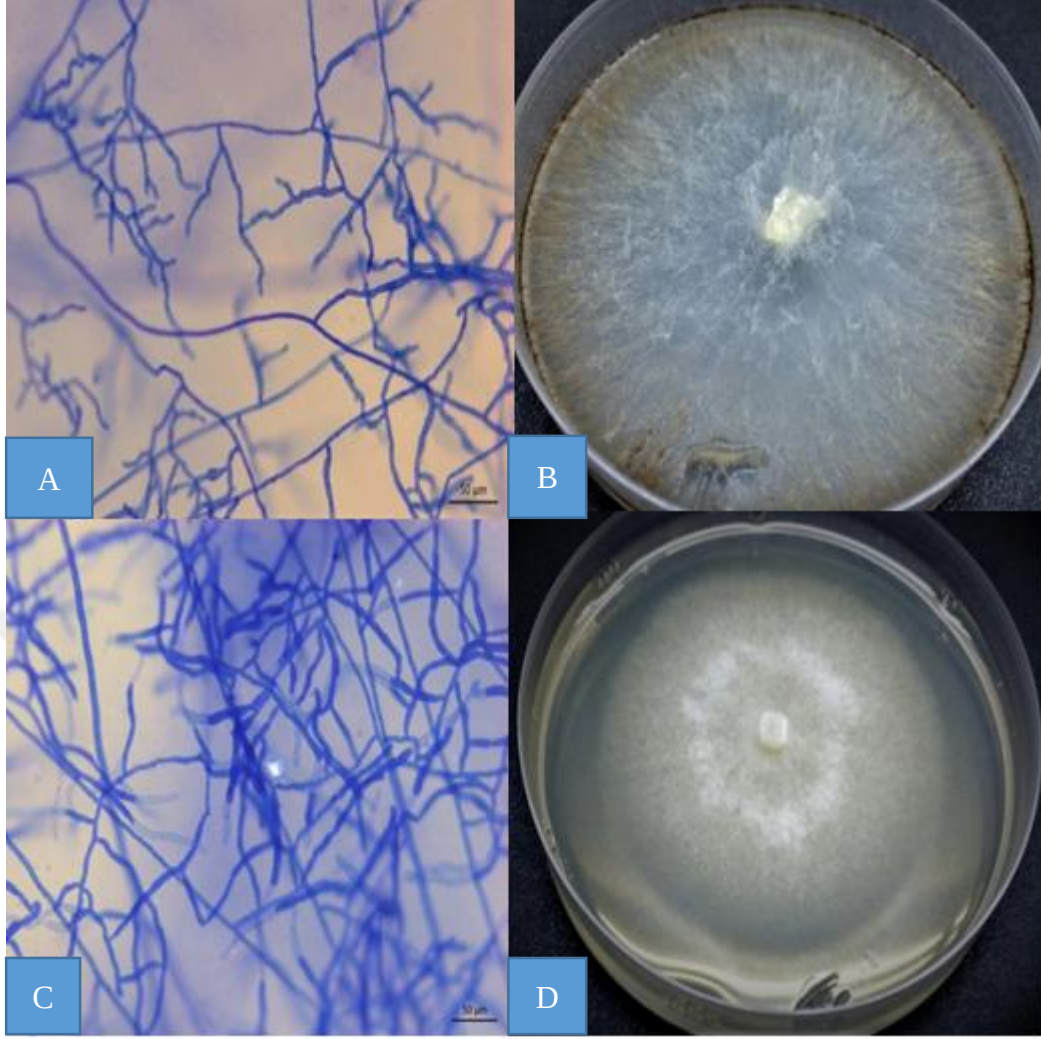
4.2. Fungus izolasyonu

2015-2019 yılları arasında Rize’de Garzavan ve Cimil Yaylarından ve Bolu-Abant Gölü çevresinden, *Dactylorhiza nielschalkiorum* köklerinden aylık peryotlarda alınan kök örneklerinden toplam 21 fungal izolat elde edilmiştir (Tablo 4.1, 4.2). Kök ve

yumru ucundan alınan kesitlerde, kök korteks hücrelerinde aktif ve bazan sindirilmiş halde fungal hiflere rastlanmıştır ve kesitlerde bu hiflerin hücreden hücreye geçişleri de gözlenmiştir (Şekil 4.2, A-B). Yapılan mikroskopik incelemeler esnasında fungus hiflerinin kök hücrelerine girişi ve hücreden hücreye geçişi gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır.



Şekil 4.2 A ve B) fungus hiflerinin hücreye girişi C) fungus hiflerinin hücreden hücreye geçişi.



Şekil 4.3 Laktofenol Coton blue ile boyanmış izole edilen fungusların mikroskop görüntüsü A) Rize 4(*Tulasnella* sp.) C) Rize 4(*Tulasnella* sp.) ve B) Rize 4(*Tulasnella* sp.) D) Rize 4(*Tulasnella* sp.) fungal izolatlarının PDA besiortamındaki görüntüsü.

4.2.1. Fungal İzolatların Morfolojik Yöntemlerle Teşhisi

İzolatların geleneksel metotlarla karakterizasyonu için gelişim hızı, hif çapları, morfolojik ve kültürel özellikleri tespit edilmiş ve Tablo 4.1- 4.2’de verilmiştir.

Fungal İzolatların Gelişim Hızı Testi

İzolatların gelişim hızı testi için PDA besi ortamına ekim yapıldıktan sonra 24 saatlik peryotta petri kaplarındaki gelişim uzunluğu (mm) ölçülüp toplanmış ve petri kabını kapladığı gün sayısına bölünerek izolatların gelişim hızları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1 - 4.2’de verilmiştir. Buna göre en hızlı gelişim Cimil Yaylasındaki bireylerin yumru ucundan elde edilen funguslarda gözlenmiştir. Ortalama 10 mm/gün olarak tespit edilmiştir.

Fungal İzolatların Morfolojik Özelliklerinin Tespit Edilmesi

Gelişim testi için izlenen petri kaplarındaki fungal izolatlar kullanılmıştır. Petri kaplarındaki izolatların koloni rengi renk kataloğundan tespit edilmiştir. Petri kabında gelişen izolatların hif görünümleri, koloni durumları ve kolonin havai hif oluşturup oluşturmadığı tespit edilerek kaydedilmiştir. PDA ortamında $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de geliştirilen izolatlarda koloni rengi grimsi-sarı ve grimsi-yeşil iki renk ve skleroit rengi grimsi-sarı olarak ayırt edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1-4.2 'de verilmiştir. Daha sonra petri kaplarının fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.3).

Fungal İzolatların hif yapılarının Tespit Edilmesi

İzolatlar hif çaplarının ölçülmesi için fungus izolasyon ortamında aktiveleştirilmiş izolatlar lactofenol koton blue ile boyandıktan sonra Zeiss Axiolab görüntüleme sisteminde her izolat için 20 hücrenin hif çapı ölçülerek kaydedilmiş, Hif çapı ortalamaları $2,59-7,43\ \mu\text{m}$ arasında olduğu kaydedilmiştir. Koloni durumları radyal ve halkasal olarak, hif durumları kadifemsi-batık ve pamuksu-batık olarak gözlenmiştir. Havai hif varlığının olup olmadığı kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1-4.2 'de verilmiştir.

4.2.2. Fungal İzolatların Moleküler Yöntemlerle Teşhisi

Çalışma alanlarından elde edilen fungal izolatlar, nükleer ribozomal DNA (rDNA) internal transkripsiyonlu spacer (ITS) bölgesine göre tanımlanmıştır (Tablo 4.3). Mikorizal birliğe katılan *Rhizoctonia* benzeri izolatlar *Tulasnella* sp. ve *Ceratobasidium* ile yakından ilişkilidir. *Rhizoctonia* dışı izolatlar ise *Tricoderma* ve *Pezizaceae* ile yakından ilişkili olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.1 Rize’ den izole edilen fungal izolatlar ait morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi.

Konukçu	Yayılış Alan	İzolasyon Yılı	Fungal İzolat	Hif Çapı (µm)	Gelişim Hızı (Mm/Gün)	Morfolojik Özellikler				
						Koloni Görünümü			Koloni Rengi	Havai Hif
						Hif Durumu	Koloni Durumu	Skleroit Rengi		
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	Rize	2015	Rize3.1(2)	3,91	1	Kadifemsi Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-sarı (161-D)	Yok
			Rize3	4,16	1	Kadifemsi Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-sarı (161-D)	Yok
			Rize4	4,63	2	Kadifemsi Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-sarı (161-D)	Yok
		2016	Cimil	3,64	3	Kadifemsi Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-sarı (161-D)	Yok
		2017	Garzavan Tem1-2	3,15	3	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-sarı (161)	Yok
			Garzavan Tem2-2	3,06	3	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-sarı (161)	Yok
			Garzavan3(Tem)	2,84	1	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-sarı (161-A)	Yok
			Garzavan4(Tem)	2,66	3	Kadifemsi Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-sarı (161)	Yok
			Garzavan1-1(Ağus)	2,69	5	Kadifemsi Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-sarı (161)	Yok
			Garzavan 1-3(Ağus)	2,59	5	Kadifemsi Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-sarı (161)	Yok
		2019	Garzavan Tem 19 (Yumru Ucu)		6	Kadifemsi Ve Batık Görünümlü	Radyal	Yok		Yok
			Cimil Tem 19 (Yumru Ucu)		10	Kadifemsi Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Yok	Grimsi-yeşilimsi sarı	Yok

Tablo 4.2 Bolu’ dan izole edilen fungal izolatlar ait morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi.

Konukçu	Yayılış Alan	İzolasyon Yılı	Fungal İzolat	Hif çapı (μm)	Gelişim Hızı (Mm/Gün)	Morfolojik Özellikler				
						Koloni Görünümü			Koloni Rengi	Havai Hif
						Hif Durumu	Koloni Durumu	Skleroit Rengi		
<i>Dactylorhiza nieschalkiorum</i>	Bolu	2015	Bolu1 A	4,39	8,6	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Radyal	Grimsi-sarı (161-A)	Grimsi-sarı (161-B)	Var
			Bolu1 B	5,84	8	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Grimsi-sarı (161-A)	Grimsi-sarı (161-B)	Var
			Bolu2	5,49	8	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Grimsi-sarı (163-A)	Grimsi-sarı (161-C)	Var
			Bolu3	5,05	9	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Grimsi-sarı (161-C)	Grimsi-sarı (161-C)	Var
		2016	Bolu Tem1 (Genç Kök)	4,39	8	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Grimsi-sarı (163-A)	Grimsi-sarı (161-D)	Var
			BoluTem2 (Yumru Ucu)	7,43	8	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Grimsi-sarı (163-A)	Grimsi-sarı (163-A)	Var
			Bolu Tem3 (Kök)	6,19	8	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Radyal	Grimsi-sarı (163-A)	Grimsi-sarı (163-A)	Var
		2017	Bolu Tem2 Yıl	3,72	1	Kadifensi Ve Batık Görünümlü	Radyal	Grimsi-sarı (163-A)	Grimsi-sarı (163-A)	Yok
			BoluGençTem	3,27	1	Kadifensi Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Grimsi-sarı (163-A)	Grimsi-sarı (163-A)	Yok
			BoluD. Niels (2017)	3,05	2	Pamuksu Ve Batık Görünümlü	Halkasal	Grimsi-sarı (163-A)	Grimsi-sarı (163-A)	Yok

Tablo 4.3 Çalışma alanlarından izole edilen fungusların filogenetik ilişki GenBank ile en yakın eşleşmesi.

Konukçu	Yayılış Alan	İzolasyon Yılı	Fungal İzolat	Koloni Görümünün Görü Gruplar	KOD	Nükleotid uzunluğu(bp)	Filogenetik İlişki GenBank ile en yakın eşleşme	Sekans Benzerliği (%)	GENBANK Acession no
<i>Dactylorhiza nischalkiorum</i>	Rize	2015	Rize3.1(2)	1. grup	DN1	532	Tulasnella sp.	88	MG762598.1
			Rize3	2. grup	DN2	558	Uncultured Tulasnella	100	JX649082.1
			Rize4	2. grup					
		2016	Cimil	3. grup	DN3	430	Uncultured Tulasnella	87	EU909305.1
		2017	Garzavan Tem1-2	4. grup					
			Garzavan Tem2-2	4. grup					
			Garzavan3(Tem)	4. grup	DN4	571	Uncultured Tulasnella	100	JX649082.1
			Garzavan4(Tem)	4. grup					
			Garzavan1-1(Ağus)	4. grup					
		2019	Garzavan Tem 19 (yumru ucu)	5. grup	DN10	577	Uncultured Pezizaceae	97	FJ788768.1
			Cimil Tem 19 (yumru ucu)	5. grup	DN9	579	Trichoderma sp.	99	KM491888.1
	Bolu	2015	Bolu1 A	6. grup	DN5	587	Ceratobasidium sp.	98	DQ520098.1
			Bolu1 B	6. grup					
			Bolu2	6. grup					
			Bolu3	6. grup					
		2016	Bolu Tem1(Geç Kök)	7.grup	DN6	545	Ceratobasidium sp.	89	DQ520098.1
			Bolu Tem2(Yumru Ucu)	6. grup	DN7	513	Ceratobasidium sp.	83	HM061324.1
			Bolu Tem3(Kök)	6. grup					
		2017	Bolu Tem2 Yıl	8. grup					
			Bolu Genç Tem	8. grup	DN8	588	Uncultured Tulasnellaceae	99	JX649082.1
			Bolu D. niels(2017)	8. grup					

4.3. Tohum Çimlenme Testleri

4.3.1. Simbiyotik Tohum Çimlenme Testleri

Çalışma alanlarından toplanan tohumlar, Clements vd. (1986) modifiye yulaf besi ortamına aşıl原因an izolatlardaki çimlenme durumları Tablo 3.4'deki skalaya göre değerlendirilmiştir. Bolu1A, Bolu1B, Bolu Tem2 ve Bolu3 (*Ceratobasidium sp.*) ile aşıl原因an tüplerde çimlenme gözlenmiş, ancak Rize 4 (*Tulasnella sp.*) izolatının aşıl原因dığı tüplerde çimlenme gözlenmemiştir. Gelişim aşamalarına göre 2 ayda bir sayımlar yapılmış ve fotoğraflanmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.4 Bolu Tem2 (*Ceratobasidium sp.*) izolatının aşıl原因ıp çimlenmenin gözleendiğı modifiye yulaf besi ortamı

Bolu'daki çalışma alanından izole edilen BoluTem2 (*Ceratobasidium sp.*) simbiyotik in vitro koşullarda, S3 gelişim aşamasına kadar çimlenmeyi teşvik etmiştir. Ancak daha ileri gelişim aşamaları gözlenememiştir.

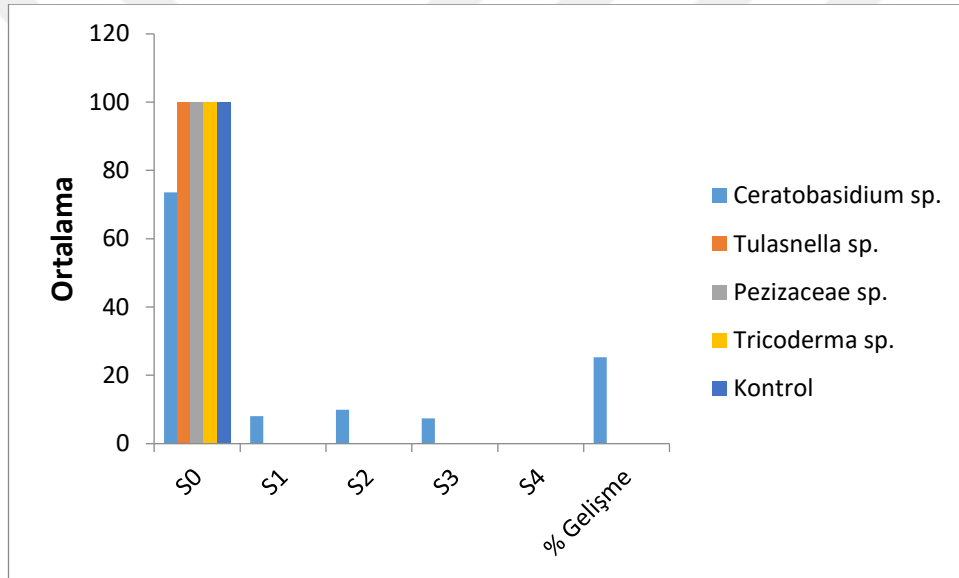
Rize ve Bolu'dan izole edilen Rize 4 (*Tulasnella sp.*), Cimil Tem 19 (*Tricoderma sp.*) ve Garzavan Tem 19 (*Pezizaceae sp.*) fungusları çimlenme üzerine etkili olmamıştır.

Kontrol grubunda çimlenme gözlenemiştir.

Tablo 4.4 Simbiyotik doku kültüründe BoluTem2 (*Ceratobasidium* sp.), Rize 4 (*Tulasnella* sp.), Cimil Tem 19 (*Tricoderma* sp.) ve Garzavan Tem 19 (*Pezizaceae* sp.) funguslarının ve Kontrol grubunun çimlenme ve yüzde değerleri.

Fungus	S0	S1	S2	S3	S4	% Gelişme
<i>Ceratobasidium</i> sp.	73,59±4,31	8,02±5,31	9,94±5,39	7,34±6,06	0,00±0,00	25,3±4,35
<i>Tulasnella</i> sp.	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<i>Pezizaceae</i> sp.	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<i>Tricoderma</i> sp.	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Kontrol	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

± : standart sapma, P<0, 05 ve n=6



Şekil 4.5 Simbiyotik doku kültüründe BoluTem2 (*Ceratobasidium* sp.), Rize 4 (*Tulasnella* sp.), Cimil Tem 19 (*Tricoderma* sp.) ve Garzavan Tem 19 (*Pezizaceae* sp.) funguslarının ve Kontrol grubunun gelişim aşamalarına göre çimlenmeye etkisi.

S0 aşaması çimlenmenin olmadığı aşama olup BoluTem2 (*Ceratobasidium* sp.), hariç diğer funguslar ve kontrol grubu benzer özellik göstermiş ve %100 oranında tohumlar çimlenmemiştir. BoluTem2 (*Ceratobasidium* sp.), fungusu ise %73, 58 oranında tohum çimlenmemiştir.

S1 aşamasında çimlenme üzerinde BoluTem2 (*Ceratobasidium* sp.) hariç diğer funguslar ve kontrol grubu ile benzer özellik göstermiş olup hiçbir tohumda çimlenme gözlenmemiştir. BoluTem2(*Ceratobasidium* sp.) ise % 8,01 oranında gelişme göstermiştir.

S2 aşamasında çimlenme üzerinde BoluTem2(*Ceratobasidium sp.*) hariç diğer funguslar ve kontrol grubu benzer özellik göstermiş olup hiçbir tohumda çimlenme gözlenmemiştir. BoluTem2(*Ceratobasidium sp.*) ise %9,94 oranında gelişme göstermiştir.

S3 aşamasında çimlenme üzerinde BoluTem2 (*Ceratobasidium sp.*) hariç diğer funguslar ve kontrol grubu benzer özellik göstermiş olup hiçbir tohumda çimlenme gözlenmemiştir. BoluTem2 (*Ceratobasidium sp.*) ise %7,33 oranında gelişme göstermiştir.

S4 aşamasında hiçbir fungus ve kontrol grubunda çimlenme görülmemiştir.

Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre .), Rize 4 (*Tulasnella sp.*), Cimil Tem 19 (*Tricoderma sp.*) ve Garzavan Tem 19 (*Pezizaceae sp.*) ve Kontrol çimlenmiş tohum üzerinde aynı etkiyi gösterirken, *Ceratobasidium sp.*'un çimlenme üzerine en iyi etkiyi göstermiştir.

4.3.2. Asimbiyotik Tohum Çimlenme Testleri

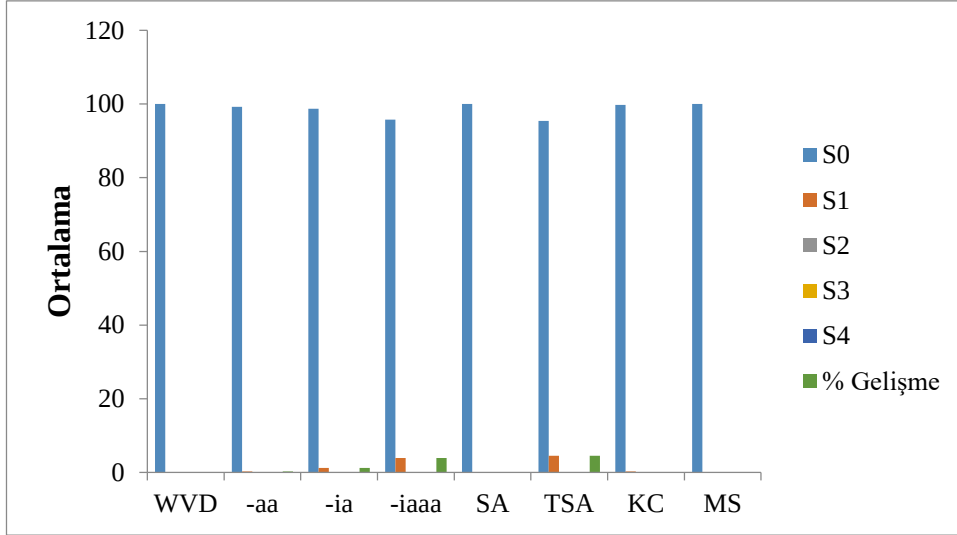
Tohumların çimlenmesine değişik besi ortamlarının etkisini gözlenebilmesi amacıyla Van Waes Deberg besi ortamı, bu ortamın formülünden inorganik azot (-ia), amino asit(-aa) ve inorganik azot ve amino asit (-iaaa) bileşikler katılmadan ve Van Weas Deberg besi ortamında kullanılan agar miktarıyla hazırlanan su agar ortamı (Wsa) kullanıldığı altı çeşit besi ortamı hazırlanmıştır. Ayrıca Knudson C (KC), Murashige-Skoog (MS) ve topraklı su agarı besi ortamlarına ekimler yapılmıştır. Çalışma 3 ay sürmüş ve sayım yapılmıştır.

Asimbiyotik koşullarda in vitroda tohum çimlenmesi testlerinde kullanılan besi ortamlarının hiç birinde çimlenme gözlenmemiştir.

Tablo 4.5 WVD temel ortam ve düzenlemeleri (-aa, -ia ve -iaa), SA, TSA, KC ve MS besi ortamlarında çimlenme ve gelişim oranları.

Besi ortamı	S0	S1	S2	S3	S4	% Çimlenme
WVD	100,00± 0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0.00
-aa	99,24 ± 0,96	0,26± 0,53	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,26± 0.14
-ia	98,73±1,72	1,27±0,72	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	1,27 ± 0,70
-iaaa	95,74±2,03	3,96±2,44	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	3,96 ± 2.17
SA	100,00± 0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0.00
TSA	95,45±0,92	4,56±0,92	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	4,56 ± 2,50
KC	99,74±0,53	0,26±0,21	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0.00
MS	100,00± 0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0.00

± : standart sapma, P<0, 05 ve n=3

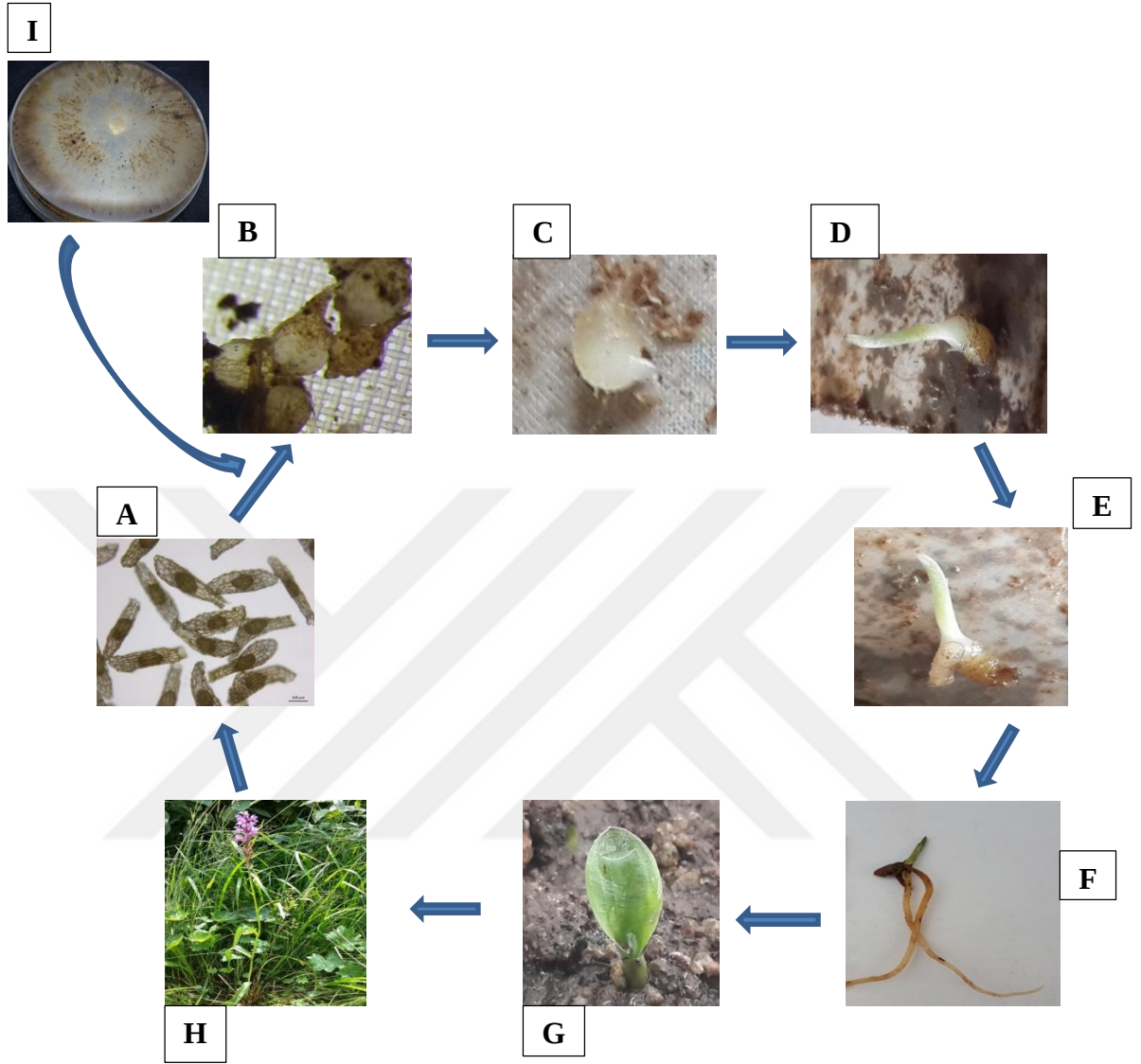


Şekil 4.6 WVD temel ortam ve düzenlemeleri (-aa, -ia ve -iaa), SA, TSA, KC ve MS besi ortamlarının gelişim aşamalarına göre çimlenmeye etkisi.

WVD temel besiyeri çimlenmeye etki etmemiştir. WVD’de düzenlenen -aa ve -ia besiyerinde S1 gelişim aşaması diğer aşamalardan farklılık gösterse de, bu farklılık istatistiki olarak önemli ($p>0.05$) bulunmamıştır. -İaaa besi ortamı TSA besi ortamı çimlenme üzerine benzer etki göstermiş ve S1 gelişim aşaması diğer aşamalardan önemli ($p<0.05$) farklılık göstermiş, ancak daha ileri gelişim aşamaları gözlenememiştir. SA besiyerinde çimlenme görülmemiştir. MS besiyerinde S1 aşaması farklılık gösterse de, bu farklılık istatistiki olarak önemli ($p>0.05$) bulunmamıştır. MS ve KC besiyerlerin de çimlenme gözlenememiştir.

4.3.3. In situ (yerinde-doğal habitatında) simbiyotik Çimlenme Testi

Doğal ortamına yerleştirmek üzere hazırlanan tohum paketleri her birinde 4-5 tohum paketi bulunan plastik kaplar içinde yaklaşık 2-3 cm derinlikte toprağa gömülmüştür. Doğal ortamlarına ekim yapılırken tohum paketlerinin araştırma alanındaki ana bitkilere (yaklaşık 1-2 m) yakın olarak yerleştirilmeye özen gösterilmiştir. 2015 yılı Eylül ayında gerçekleştirilen bu işlem sonucunda 2016 yılı Nisan ayından itibaren 3-4 ayda bir 1 tohum paketi toprağı ile beraber alınıp laboratuara getirilmiştir. Yapılan incelemelerde 2 yıl boyunca her hangi bir protokorm oluşumuna rastlanılmamıştır. Daha sonra her iki çalışma alanında vejetatif organları toprak üstüne çıkmaya başladığında tohum paketleri yumru ve kökler arasında bırakılmıştır. Bolu-Abant Gölü’nde Temmuz ayında ve Rize-Garzavan Yaylasında Haziran-Temmuz ve Ağustos aylarında yapılan gözlemlerde de herhangi bir protokorm oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4.7 *Dactylorhiza neschalkiorum* 'un yaşam döngüsü. A) Tohum, B) Mikorizal fungusla aşıllı çatlamış tohum, C) Protokorm, D) Yaprak primordiumu, E) Kök çıkışı, F) Sürgün ucu ve kök oluşumu, G) İlk fotosentetik yaprak, H) Ergin birey I) Mikorizal fungus.

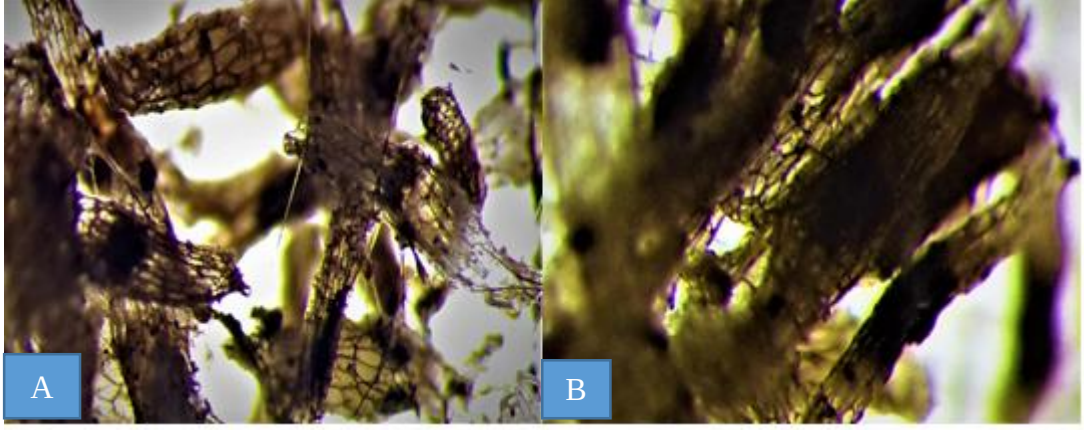
Ayrıca *D. neschalkiorum* bireylerine uzak mesafede (yaklaşık 200-250m) toprağın 3-4 cm derinine konan tohum paketleri Mayıs ayından itibaren 2 ayda bir paket alınarak laboratuvara getirilerek, mikroskop incelemeleri yapılmıştır, herhangi bir protokorm oluşumuna rastlanmamıştır. Bir yıl sonra doğadaki paketlerden alınıp tohum canlılık testi yapılmış ve tohumların canlı olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.8 ve 4.9).



Şekil 4.8 Doğal ortamında ana bitkiye yakın ekilen tohum paketi (çimlenme gözlenmemiş)



Şekil 4. 9 Doğal ortamında bitki kökleri arasına ekilen tohum paketi (çimlenme gözlenmemiş)



Şekil 4.10 A) Doğal ortamında bireylerin bulunmadığı habitata toprağın 3-4cm derinine gömülen tohumların mikroskop görüntüsü, B) Toprak yüzeyinde bitki döküntüleri arasına bırakılan tohumların mikroskop görüntüsü.

Doğal ortamında çimlenmenin incelenmesi amacıyla *D. nieschalkiorum* tohumlarının bulunduğu paketler bireylerin bulunmadığı alana (yaklaşık 200-250 m uzağa) gömülmüştür. Bu alanda hem toprağın 3-4 cm derinine hemde toprak yüzeyindeki bitki artıkları arasına gömülen tohum paketleri yaklaşık 10 ay sonra alınarak incelenmiştir. İncelemeler sonucunda tohum çimlenmesine rastlanmamıştır. Ayrıca yapılan TTC testlerinde canlı tohuma rastlanmamıştır(Şekil 4.10).

4.3.4 Ex vitro tohum çimlenme testleri

İklim Odası Koşullarında Tohum Çimlenme Testi

İklim odasında tohum çimlenme deneylerinde, içinde toprak karışımı bulunan saksılara 3'er tane tohum paketi gömüldü ve fungal izolatlar aşılandı. Tohumların gömülmesinden 6 ay sonra çimlenme ve gelişme durumları değerlendirildi. Bu amaçla hazırlanan Rize- Garzavan yaylasından alınan toprak karışımına, bu alandan izole edilen funguslar aşılandı. Bu saksılardaki tohum paketlerinde çimlenme gözlenmedi.

Bolu-Abant Gölü çalışma alanına ait topraklara, bu alandan izole edilen fungusların aşılandığı saksılarda ilk protokorm gelişimi yaklaşık 2 ay sonra gözlemlendi(Şekil 4.11, 4.12. ve 4.13).



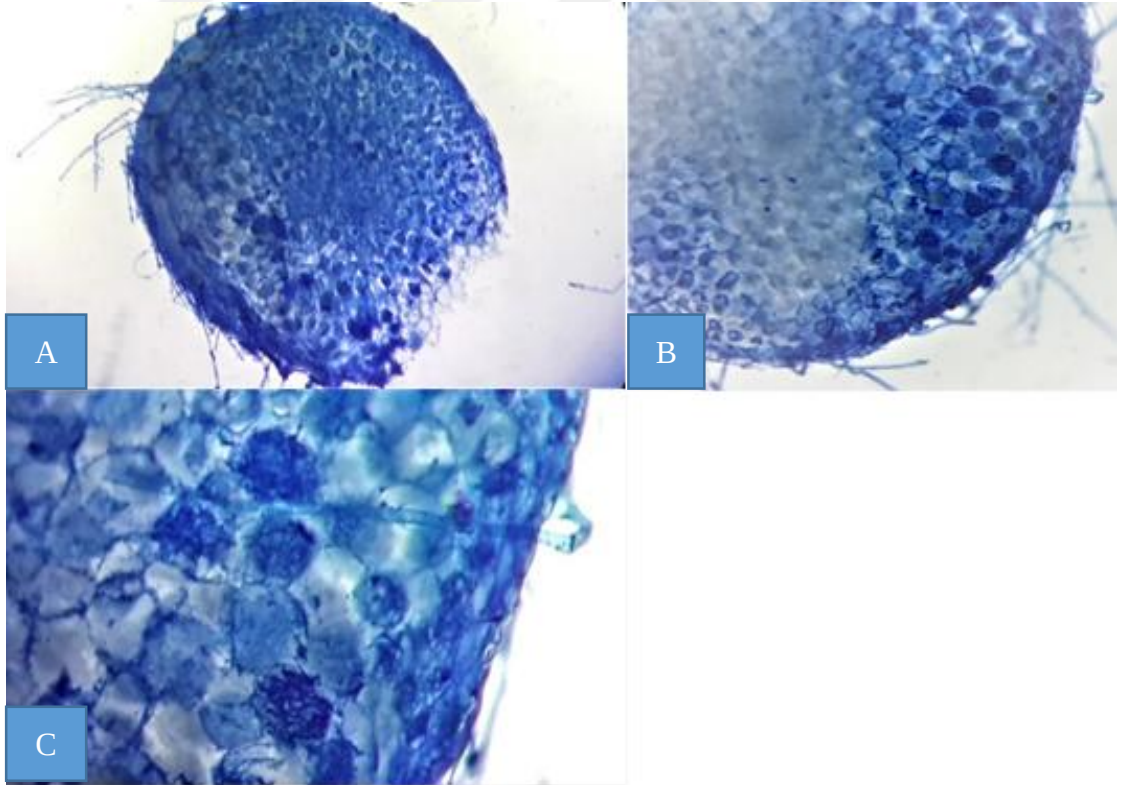
Şekil 4. 11 Rize Garzavan yaylası topraklarına ekilerek aynı alandan izole edilen Rize 4 (*Tulasnella* sp.) izolatının aşılacağı saksıdaki tohum paketi.



Şekil 4.12 Bolu-Abant Gölü topraklarına ekilerek aynı alandan izole edilen Bolu3 (*Ceartobasidium* sp.) izolatı ile aşılannmış saksıdaki tohum paketi.



Şekil 4.13 A) Bolu-Abant gölü topraklarına ekilen tohum paketlerine Bolu3, BoluTem2 ve BoluTem3 (*Ceratobasidium* sp.) izolatının aşılama ve çimlenmenin gözlemlendiği saksı ve B) Bu saksıda gelişen fide.

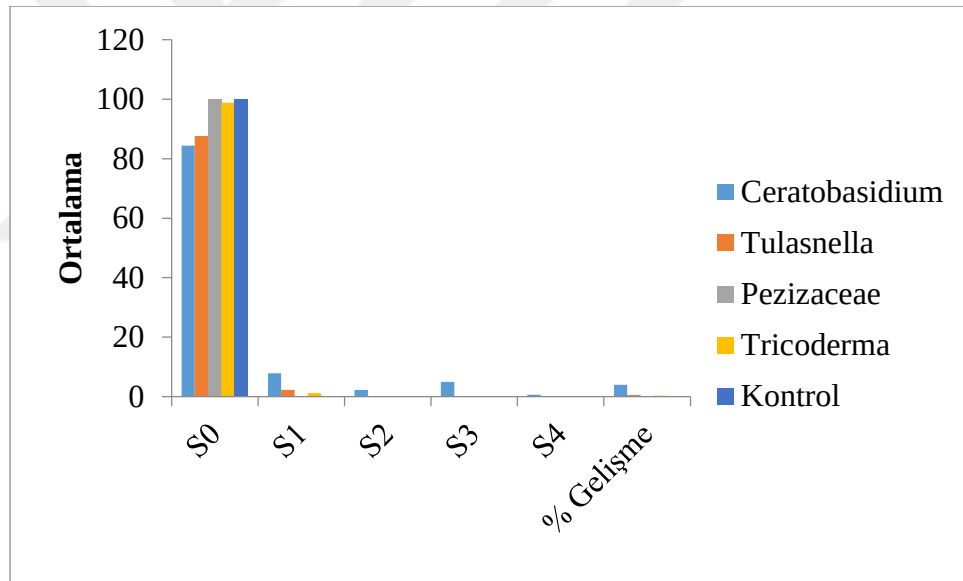


Şekil 4.14 A,B) İklim odasında Bolu3 (*Ceratobasidium* sp.) izolatının aşılama ve çimlenmenin gözlemlendiği saksıdaki protokormun enine kesiti (boyama; Koton blue) C) Fungus tarafından kolonize olmuş parankima hücreleri.

Tablo 4.6 *D. nieschalkiorum* tohumlarının ex vitro (iklim odası) şartlarda bulunduğu saksılara inkübe edilen BoluTem2(*Ceratobasidium* sp., .), Rize 4 (*Tulasnella* sp.), Cimil Tem 19 (*Tricoderma* sp.) ve Garzavan Tem 19 (*Pezizaceae* sp.) ve Kontrol grubunda altı ay sonra çimlenme ve gelişim oranları.

Fungus	S0	S1	S2	S3	S4	% Gelişme
BoluTem 2 (<i>Ceratobasidium</i> sp.)	84,34±6,26	7,85±6.34	2,24±2.02	2,66±2,50	0,64±0.64	13,39±2,70
Rize 4 (<i>Tulasnella</i> sp.)	87,57 ± 2,35	2,30±1.61	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	2,30±1.61
GarzavanTem 19 (<i>Pezizaceae</i> sp.)	100,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00
CimilTem 19 (<i>Tricoderma</i> sp.)	98,82±0,11	1,18±0,11	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	1,18±0,11
Kontrol	100,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00

± : standart sapma, P<0, 05 ve n=3



Şekil 4.15 Ex vitro (iklim) şartlarda *D. nieschalkiorum* tohumlarının bulunduğu saksılara inkübe BoluTem2(*Ceratobasidium* sp.), Rize 4 (*Tulasnella* sp.), Cimil Tem 19 (*Tricoderma* sp.) ve Garzavan Tem 19 (*Pezizaceae* sp.) funguslarının ve Kontrol grubunun gelişim aşamalarına göre çimlenmeye etkisi.

BoluTem2(*Ceratobasidium* sp.) gelişim aşamalarına bağlı olarak çimlenmiş tohum yüzdesi liner bir artış göstermiş, istatistiki olarak anlamlı ($p<0.05$) bir farklılık ortaya koymuş olup en yüksek S1 aşamasında % 7,84 iken en düşük ise S4 aşamasında

% 0,64 ile gerçekleşmiştir. Rize4(*Tulasnella sp.*)’de gelişme aşamalarına bağlı olarak tohum çimlenmesi istatistiki olarak anlamlı ($p>0.05$) bir farklılık göstermemiştir.

Garzavan Tem19 (*Pezizaceae sp.*)’de çimlenme gözlenmemiştir.

CimilTem19 (*Tricoderma sp.*) gelişme aşamalarına bağlı olarak çimlenmiş tohum yüzdesi üzerine istatistiki olarak anlamlı ($p<0.05$) bir farklılık ortaya koymuştur. S1 gelişim aşamasında %1,18 çimlenme oranı göstermiş olup daha ileri gelişim aşamaları gözlenmemiştir.

Kontrol grubunda gelişim aşamalarına bağlı olarak çimlenme görülmemiştir.

İklim odası koşulları altında BoluTem2(*Ceratobasidium sp.*) çimlenme üzerine tüm gelişim aşamalarında etkili olmuş, Rize4 (*Tulasnella sp.*)’nin ise sadece S1 gelişim aşamasında en düşük oranda gözlenmiştir. *Tricoderma*, *Pezizaceae* ve Kontrol grubunda gelişim aşamalarına bağlı olarak tohum çimlenmesi benzer sonuçlar ortaya koymuş olup, çimlenme gözlenmemiştir.

Sera Koşullarında Tohum Çimlenme Testi

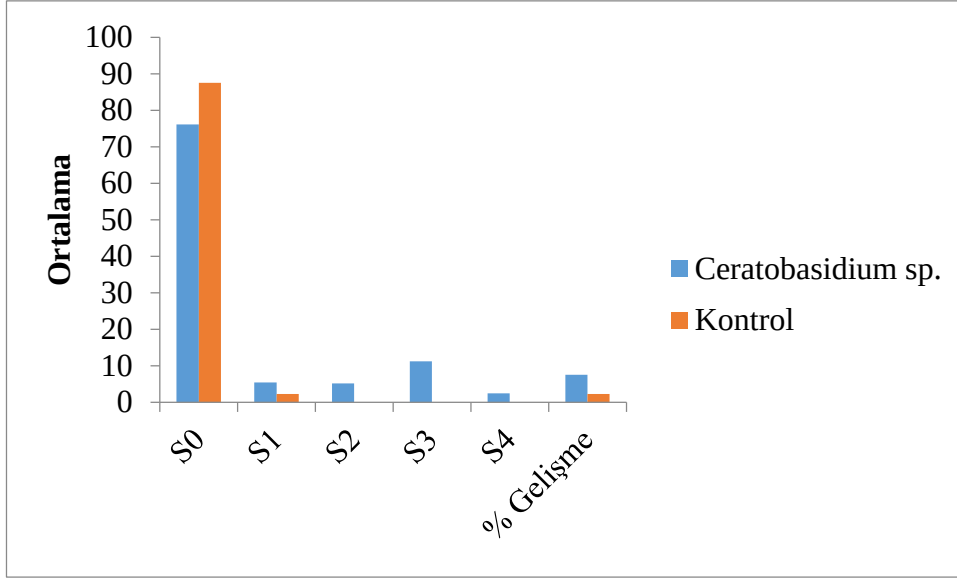
Sera koşullarında çimlenme deneylerinde içinde toprak karışımı bulunan saksılara 3’er tane tohum paketi gömüldü ve fungal izolatlar aşılandı. Tohumların gömülmesinden 6 ay sonra çimlenme ve gelişme durumları değerlendirildi. Hazırlanan Bolu-Abant Gölü çalışma alanına ait topraklara, bu alandan izole edilen fungusların aşılandığı saksılarda ilk protokorm gelişimi yaklaşık 2 ay sonra gözlemlendi.

Sera’da tohum çimlenmesine fungal izolatların etkisi deneyleri gelişim aşamaları göz önünde bulundurularak tohum sayımları yapıldı.

Tablo 4.7 Ex vitro (sera) şartlarda *D. nieschalkiorum* tohumlarının bulunduğu saksılara inkübe edilen BoluTem2 (*Ceratobasidium sp.*) ve Kontrol grubunda altı ay sonra çimlenme ve gelişim oranları.

Fungus	S0	S1	S2	S3	S4	% Gelişme
BoluTem2(<i>Ceratobasidium sp.</i>)	76,16±8,92	5,47± 2,16	5,20± 2,23	11,19± 4,61	2,43± 1,09	24,29±3,14
Kontrol	87,55±15.64	2,61±2.19	0,00±0.00	0,00±0.00	0,00±0.00	2,61±2.19

± : standart sapma, $P<0, 05$ ve $n=3$



Şekil 4.16 Ex vitro (sera) koşullarda *D. nieschalkiorum* tohumlarının bulunduğu saksılara inkübe edilen BoluTem2 (*Ceratobasidium* sp.) fungusunun ve Kontrol grubunun gelişim aşamalarına göre çimlenme etkisi.

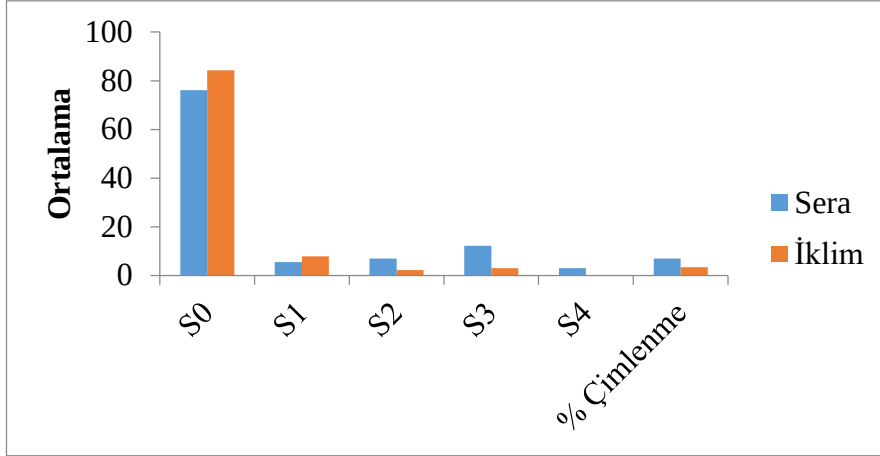
Serada BoluTem2 (*Ceratobasidium* sp.) gelişim aşamaları üzerine etkisi incelendiğinde S0 ve S1 aşamalarında fungus ile kontrol arasında bir fark yok iken S2, S3 ve S4 aşamalarındaki farklılık anlamlı olmuştur. Serada BoluTem2 (*Ceratobasidium* sp.) inkübe edilen saksılarda en yüksek gelişim S3 gelişim aşamasında görülürken S4 gelişim aşamasında en düşük çimlenme oranı elde edilmiştir.

Serada, kontrol grubunda S1 gelişim aşamasında farklılık varken S2, S3 ve S4 gelişim aşamalarında istatiki olarak önemli ($p < 0.05$) bir farklılık tespit edilememiştir. Kontrol grubunda çimlenme S1 aşamasında oldukça düşük (%2,31) görülmüş fakat ileri gelişme meydana gelmemiştir.

Tablo 4.8 Ex vitro (Sera ve iklim odası) koşullarında *D. nieschalkiorum* tohumlarının bulunduğu saksılara inkübe edilen BoluTem2(*Ceratobasidium* sp.) fungusun altı ay sonra çimlenme ve gelişim oranları karşılaştırması.

Çimlenme Koşulu	S0	S1	S2	S3	S4	% Gelişme
Sera	76,16±8,92	5,47± 2,16	5,20± 2,23	11,19± 4,61	2,43± 1,09	24,29±3,14
İklim	84,34±6,26	7,85±6.34	2,24±2.02	2,66±2,50	0,64±0.64	13,39±2,70

± : standart sapma, $P < 0, 05$ ve $n=3$



Şekil 4.17 Ex vitro, sera ve iklim odası koşullarında *D. nischalkiorum* tohumlarının bulunduğu saksılara inkübe edilen BoluTem2 (*Ceratobasidium* sp.) fugusunun gelişim aşamalarına göre çimlenmeye etkisi.

Tablo 4.9 Independent samples T test ile BoluTem2(*Ceratobasidium* sp.) ‘nin sera ve iklim koşullarında çimlenmeye etkisi.

		Levene'nin Varyans Eşitliği Testi		Ortalamaların Eşitliği için t-testi		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
S0	Eşit varyanslar varsayıldı	1,012	,338	-1,592	10	,142
	Eşit varyanslar varsayılmadı			-1,592	8,578	,148
S1	Eşit varyanslar varsayıldı	3,403	,095	-,789	10	,448
	Eşit varyanslar varsayılmadı			-,789	8,128	,452
S2	Eşit varyanslar varsayıldı	1,120	,315	2,954	10	,014
	Eşit varyanslar varsayılmadı			2,954	8,237	,018
S3	Eşit varyanslar varsayıldı	1,038	,332	2,149	10	,057
	Eşit varyanslar varsayılmadı			2,149	7,509	,066
S4	Eşit varyanslar varsayıldı	3,850	,078	3,828	10	,003
	Eşit varyanslar varsayılmadı			3,828	7,112	,006

Çimlenme yüzdesinin serada ve iklim şartları altında anlamlı ($p < 0.05$) bir farklılık ortaya koyduğu görülmüştür.

Independent samples T test ile BoluTem2 (*Ceratobasidium* sp.) fungusunun sera ve iklim koşullarında çimlenmeye etkisini inceledik. S0, S1 ve S3 aşamalarında sera ve iklim koşullarının çimlenmeye olan etkisinde anlamlı bir fark yokken, S2 ve S4 aşamalarında çimlenmeye etkisi anlamlı fark oluşturmuştur. S2 ve S4 aşamasında serada çimlenme daha fazla oluşmuştur. İklim koşullarında ortam sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutulmuştur, ancak sera koşullarına bırakılan saksılar mevsimsel sıcaklık değişimlerine maruz kalmıştır. Çalışma materyalimiz olan *D. nieschalkiorum* 700-2500 m rakımda yayılış göstermektedir. Sera koşullarının yetiştirme koşullarına benzer özellikte olduğu kabul edilirse, çimlenmenin kontrollü koşulların gerçekleştiği iklim odasından daha yüksek olması beklenen bir durumdur.

4.4. Toprak Analizleri

Toprak kültüründe çimlenme deneylerinde kullanılan toprak örneklerinin PH değeri Rize örneğinin PH değeri 5,65, Bolu'dan örneğinin 6,41 ve bireylerin bulunmadığı alandan alınan örneğin ise 5,22 olarak tespit edilen asitli topraklardır.

Azot (%) değeri Rize ve Bolu örneklerinde çok fazla olarak değerlendirilmişken bireylerin bulunmadığı alan örneğinde orta derecededir.

Potasyum (ppm) değeri Rize ve Bolu örneklerinde orta olarak değerlendirilmişken bireylerin bulunmadığı alan örneğinde az derecededir.

Organik madde değeri Rize ve Bolu örneklerinde az olarak değerlendirilmişken bireylerin bulunmadığı alan örneğinde çok az derecededir.

Toprak terktürü Rize örneğinde Kumlu olarak değerlendirilmişken bireylerin bulunmadığı alan ve Bolu örneklerinde Tınlı-Kumlu olarak btespit edilmiştir.

Tablo 4.10 Çalışma alanlarından ve bireylerin bulunmadığı habitattan alınan toprak örneklerinin kimyasal içeriği.

Analiz/ Örnek	PH		Azot (%)		Potasyum (Ppm)		Organik Madde		Tekstür
	Değeri	Derecesi	Değeri	Derecesi	Değeri	Derecesi	Değeri	Derecesi	Derecesi
Rize	5,65	Orta Derece Kuvvetli Asit	0,89	Çok Fazla	175	Orta	2	Az	Kumlu
Bireylerin olmadığı alan	5,22	Kuvvetli Asit	0,1	Orta	21	Az	0,2	Çok Az	Tınlı, Kumlu
Bolu	6,41	Hafifi Asit	0,75	Çok Fazla	178	Orta	1,5	Az	Tınlı, Kumlu

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Türkiye için endemik olan *Dactylorhiza nieschalkiorum*'un iki ayrı çalışma alanından (Doğu'da Rize- Garzavan ve Cimil yaylaları ve Batı'da Bolu- Abant gölü çevresinden) toplanan tohumlarının simbiyotik, asimbiyotik, doğal habitatında ve habitatı dışında çimlenmesi gözlenmiştir.

Çalışma alanlarımızdan Bolu- Abant Gölü civarında, türün bulunduğu alanlar turistik olmasının yanında (piknik yapılan alanlar), hayvanların otlak yeri olarak da kullanılmaktadır. Bu alan hem insan hem de hayvan kaynaklı tahribata maruz kalmaktadır. Rize' de ise son yıllarda gelişen yayla turizmi nedeniyle artan inşaat faaliyetleri sonucunda *D. nieschalkiorum*' un yetiştiği alanlar tahrip edildiğinden bu alanda türün varlığı yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır. Çalışmamız sürecinde yaptığımız gözlemlerde Rize-Ayder Yaylasında türün yayılış gösterdiği üç lokaliteden ikisi inşaat yapmak amacıyla tahrip edilmiş olup sadece mezarlık alanlarda orkideler yayılış gösterebilmektedir. Garzavan Yaylasında ise çayırılık alanda bulunan bireylerin çiçeklenme zamanında otlar biçildiği için tohum oluşmadan bitkinin vejetatif kısımları ortadan kaldırılmaktadır.

Çalışma alanlarından toplanan tohumların yapılan canlılık testlerinde tohum canlılığı % $6,72 \pm 3.81$ olarak oldukça düşük tespit edilmiştir.

Çimlenme testlerinde en iyi çimlenmenin gözlemlendiği BoluTem 2 (*Ceratobasidium* sp.). fungus ile serada yapılan çimlenme testinde çimlenme ve gelişim oranı % 23,84 olmuştur. Ayrıca doğal koşullara bırakılarak izlenen tohum paketlerinde canlı tohumla rastlanmaması doğal koşullarda (toprak tohum bankasında) tohum ömrünün çok kısa olabildiğini göstermektedir. Ancak; bazı çalışmalar tohum canlılık testinin orkide tohumları için güvenilir bir gösterge olmadığını öne sürmüştür (Kauth vd., 2008; Vujanovic vd., 2000; Kömpe vd.2022). Canlılık testi ile orkide tohumlarının çimlenmesi arasında uyum olmaması, buna bağlı olarak tüm tohum kabuğunun kırılması için inkübasyon süresi yeterli olamayabilir. Fakat orkide tohumları için canlılık testinin her zaman güvenilir bir çimlenme potansiyeli göstergesi olmasa da çimlenme potansiyeli bilinmeyen tohumlar için çimlenme öncesi bir canlılık testi deney tohumları için ön fikir vermesi açısından yararlı olarak değerlendirilebilir (Kauth vd.,2008; Kömpe vd.2022). Ekimden önce tohumların kimyasal maddelere maruz bırakılması, karasal türlerin çimlenmesini artırabilir çünkü bu maddeler karasal türlerde yaygın olan daha sert tohum kabuklarının kırılmasına yardımcı olur ve tohum dormansisini kırabileceği öne sürülmüştür (Kauth vd., 2008).

Doğal ortamına uygun koşulların sağlandığı seradaki saksılarda çimlenme gözlenmiştir. Bu da bize doğada çimlenmeyi teşvik eden funguslarla karşılaşıldığında çimlenmenin gerçekleşebildiği için türün varlığını düşük oranda bile olsa sürdürebilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir. Ayrıca türün yayılış alanındaki birey sayısının oldukça düşük olması ve yeni birey oluşumunun gözlenememesi de buna bağlanabilir. Çalışmamızda tohum çimlenmesinin gözlemlendiği hem simbiyotik kültürde hemde fungus aşılınmış toprakların bulunduğu saksılarda tohumlarda çimlenme 2- 6 ay arasında gözlenebilmiştir. İlk yaprak ve kök oluşumu sekiz ay kadar uzun bir sürede gerçekleşebilmiştir. Endemik *D. nieschalkiorum*'un hem çimlenme gücüğü hemde yayılış alanlarının tahribatı her geçen gün türü nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıya getirmektedir. Bu nedenle tohumdan çoğaltılarak koruma ve doğaya yeniden aktarım (reintroduction) tropik orkideler başta olmak üzere birçok orkide için gerçekleştirilmeye başlanmıştır (Shao vd., 2017; Shao vd., 2018; Zhao vdl., 2021). Ülkemizde ise *Anacamptis sancta* (Deniz vd., 2022), *Anacamptis coriophora* (Kömpe ve Mutlu 2021; Harzlı ve Kömpe, 2024), *Anacamptis laxiflora* (Aytar ve Kömpe 2024), türleri tohumdan üretilip doğaya aktarılmış ve çiçek aşamasına gelen bireyler elde edilerek, popülasyon oluşumu sağlanmıştır.

Orkide mikorizal fungusları genellikle Basidiomycetes'e dahil olup (Rasmussen 2002; Dearnaley 2007), çoğunluğu *Rhizoctonia* benzeri *Ceratobasidium*, *Sebacina* ve *Tulasnella* cinslerinin üyelerinin üyeleridir (Ma vd. 2003; Otero vd. 2005; Smith ve Read 2008). Çalışmamızda 5 yılda 21 fungus izole edilmiş olup yapılan nükleer ribozomal DNA (rDNA) dizilerinin internal transkripsiyonlu spacer (ITS) bölgesine göre tanımlanmıştır. İzolatların 12 tanesi *Rhizoctonia* benzeri izolatlar *Tulasnella* sp., 7 tanesi *Ceratobasidium* sp. ile yakından ilişkiliyken, *Rhizoctonia* dışı izolatlar 1 tane *Tricoderma* sp. ve 1 tane *Pezizaceae* sp. ile yakından ilişkili bulunmuştur. Sadece *Rhizoctonia* cinsi funguslar değil diğer cinslere ait funguslar da orkidelerle mikorizal ilişki kurmaktadır (Jacquemyn vd. 2012; Tesitelova vd. 2012; Waud vd. 2017; Mutlu ve Kömpe 2020).

Orkidelerin birçok türünün tohumları sadece uygun bir fungusla simbiyotik birlik kurduğunda çimlenebilmektedir (Harvais ve Hadley 1967a; Cameron vd. 2006; McCormick 2016; Ozkoç ve Dalcı, 1992; Özdenir , 1994; Kömpe vd. 2019; Yeh vd., 2019). Bir orkide, birden fazla fungus türü ile mikorizal ilişki oluşturabilir (Bonnardeaux vd., 2007; Otero vd., 2004). Ancak bunların hepsi çimlenmede etkili

almazken, bazıları topraktan elde ettiği minerallere karşılık fotosentez yoluyla elde edilen karbonu değiş tokuş eder (Smith ve Read, 2008). Çalışmamızda bitki köklerinden izole edilen funguslar tek tek çimlenme deneylerinde kullanılmış ve sadece *Ceratobasidium sp.* izolatlar çimlemede etkili olmuştur.

Tulasnella, Hadley (1970) tarafından çok çeşitli orkide türleri ile in vitro simbiyotik ilişkiler kurma yeteneğinden dolayı evrensel bir orkide simbiyontu olarak önerilmiştir (Pereira 2014). Beltran- Namro vd. (2014) *Bletia* 'nın bazı türlerinin *Tulasnella* cinsinin farklı türleriyle aynı anda, ilişkili olduğunu belirlemiştir. Bu durum *Dendrobium*, *Orchis* ve *Liparis* gibi diğer orkide cinsleri için de rapor edilmiştir. (Cruz vd., 2014; Suarez ve Kottke 2016). *Ceratobasidium* ile orkidelerin oluşturduğu birlik Antarktika hariç her kıtadan kaydedilmiş olup (Jacquemyn vd., 2017), karasal orkidelerle en sık ilişkilendirilen fungus cinslerinden biridir (PHillips vd., 2020).

Simbiyotik in vitro çimlenme deneyleri için her iki çalışma alanından izole edilen funguslar kullanılmıştır. Bolu- Abant gölü çalışma alanından izole edilen *Ceratobasidium sp.* (BoluTem2 ve BoluTem 3) simbiyotik in vitro koşullarda , S3 gelişim aşamasına kadar çimlenmeyi teşvik etmiştir. Ancak daha ileri gelişim aşamaları gözlenememiştir. Rize ve Bolu'dan izole edilen *Tulasnella sp.*, *Trichoderma sp.* ve *Pezizaceae sp.* ait fungusları çimlenme üzerine etkili olamadığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda da çimlenme gözlenmemiştir.

Pezizales üyesi fungusların mikorizal birliğe dahil oldukları belirtilmektedir (Stark vd., 2009). Pezizales üyelerinin *Dactylorhiza* (Kömpe ve Mutlu 2017), *Anacamptis* ve *Orchis* türlerinin (Mutlu ve Kömpe 2020) köklerinde mikorizal birlikteliğe katıldığı belirlenmiştir. Orkide köklerinde bulunan *Rhizoctonia* dışı fungusların mikorizal birlikteliğe katılmalarına rağmen tohumlarla simbiyotik ilişki kurmadıkları bildirilmiştir (Stark vd. 2009).

Birçok orkide türünün tohumları asimbiyotik yöntemlerle çimlenemez (Rasmussen 1995). Nesli tükenmekte olan ve tehdit altındaki birçok orkidenin asimbiyotik olarak üretiminde başarı elde edilmiş olmasına rağmen (Mohanty vd., 2012) , asimbiyotik in vitro çimlenme yöntemlerinin türlere göre geliştirilmesi gerekmektedir. Çünkü her aşamadaki doku kültürü koşulları büyük ölçüde türe özgüdür (Arditti, 1967 , Zeng vd., 2013).

Asimbiyotik tohum çimlenmesi, orkidelerin koruma amaçlı çoğaltılması için ideal bir yöntem olabilir ancak, mineral beslenme, yani azot, karbonhidratlar ve organik besinler, vitaminler ve ortam bileşimi gibi çeşitli faktörler, örneğin protokorm

gelişimini etkileyerek asimbiyotik tohum çimlenmesini etkiler (Dutra vd., 2008; Paul vd., 2012). Asimbiyotik tohum çimlenmesi, özellikle epifitik orkidelerin hızlı çoğaltılması için öne çıkan ve tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir (Kim vd. 2021).

Lewis Knudson ilk olarak 1922'de yapay ortamda asimbiyotik olarak orkide tohumlarını başarıyla çimlendirmiştir. O zamandan beri birçok orkide türü asimbiyotik olarak yetiştirilmiş olsa da, türlerin yapay ortama ve büyüme koşullarına nasıl tepki verdiği noktasındaki büyük farklılıklar geçtiğimiz yüzyılda belirgin hale gelmiştir (Jolman vd., 2022). Asimbiyotik çimlenme, orkideleri tohumdan yetiştirmek için daha verimli bir sürece izin verse de, bu tür teknikler tam anlamıyla kusursuz değildir. Orkidelerin gelişim gereksinimleri, özellikle tropikal ve ılıman bölgelerdeki türler arasında büyük ölçüde değişir ve bu da çeşitli metodolojilerin kullanılmasını gerektirir (Diantina vd., 2020). Türe özgü besin rejimi nedeniyle orkide kültürleri için evrensel olarak tek bir ortam geçerli değildir (Nanekar vd. 2014).

Çalışmamızda asimbiyotik çimlenme deneylerinde MS, KC, WVD ve bazı düzenlemeleri (-aa (amino asit eksik), -ia (inorganik asit eksik) , -iaaa (inorganik asit eksik), SA ve TSA besi ortamları kullanılmıştır. TSA ve -İaa besi ortamlarında S1 gelişim aşaması oldukça düşük bir oranda gözlenmiş, ancak kontrol olan SA ve diğer besi ortamlarının hiç birinde tohum çimlenmesi gözlenmemiştir. WVD temel ortam ve modifikasyonlarında tohumların çimlenmemesi azotun çimlenme üzerine olan etkisinden dolayı olabilir. Bazı çalışmalar, hem azot kaynağının hem de konsantrasyonunun *in vitro* asimbiyotik tohum çimlenmesini etkileyen temel faktörler olduğunu bildirmiştir (Van Waes ve Deberg, 1986; Özdener 1994; Stewart ve Kane, 2006; Dutra vd., 2008; Paul vd., 2012).

MS ortamındaki düşük çimlenme yüzdesi, makroelementlerin yüksek tuz konsantrasyonundan kaynaklanan bir engelleyici etkiye işaret eder (Zang vd. 2013). Karasal orkideler genellikle tohum çimlenmesi için daha düşük tuz konsantrasyonlarına sahip bir ortama ihtiyaç duyduğundan (Rasmussen, 1995), Orkimax ortamı daha uygundur, çünkü makroelementlerin toplam miktarı MS ortamında bulunan miktardan önemli ölçüde daha düşüktür (Arcidiacono vd., 2021).

Dactylorhiza nieschalkiorum'un doğal habitatında ana bitkilerin yakınına (yaklaşık 1-2 m) gömülen tohum paketlerinin 2 yıl boyunca izlenmesi sonucunda her iki çalışma sahasında tohum çimlenmesi gözlenememiştir. Aynı zamanda doğal habitatında ana bitkiden uzak mesafeye gömülen tohum paketlerinde de herhangi bir tohum çimlenmesi gözlenememiştir.

Dactylorhiza nieschalkiorum'un habitatı dışında tohum çimlenmesi gözlemleri iklim odası ve sera koşullarında gerçekleştirilmiştir. Rize bölgesi çalışma alanından izole edilen Rize 4 (*Tulasnella* sp.), Cimil Tem 19 (*Tricoderma* sp.) ve Garzavan Tem19 (*Pezizaceae* sp.)'ye ait izolatlar tohum çimlenmesinde etkili olmamıştır. Ancak Bolu bölgesi çalışma alanından izole edilen Bolu 3, Bolu Tem 2 (*Ceratobasidium* sp.)'ye ait izolatlar hem iklim hemde sera koşullarında etkili olmuştur.

Sera koşullarında ve iklim koşullarında tohum çimlenmesi göz önüne alındığında sera koşullarında tohum çimlenmesinin daha etkin olduğu gözlenmiştir.

Çalışma alanlarımız kumlu, kumlu-tınlı, asidik, (pH, 5,65-6,41), fazla azotlu (% 0,79-0,85), orta potasyum (175-178 ppm) ve az organik maddeli topraklardan oluşmaktadır.

Karasal orkidelerin genellikle yoğun organik madde ve humus barındıran topraklarda yetiştiği bilinmektedir (Swartz ve Dixon, 2009). Ors vd.(2010) orkidelerin geliştiği alanlardaki toprakların pH değerinin 5,71-7,81 arasında, organik madde miktarını ise %1,06-38,96 arasında değiştiğini açıklamışlardır. *Platanthera bifolia*, pH değeri 5,1 ile 8,9 arasında değişen topraklarda büyüyebilir (Adamowski 1996). *Platanthera leucophaea* nispeten düşük besin miktarına sahip asidik kumlu, turbalık ve bataklık arazilerde yetişir (Bowles vd. 2005). *Epipactis atrorubens* fiziksel ve kimyasal özellikleri zayıf olan genellikle bitki büyümesi için elverişsiz serpantinli ve granitli topraklarda yetişebilmektedir (Kristy vd. 2005; Rajakaruna ve Boyd 2014; Kumar vd. 2017). Düşük azot, fosfor, potasyum ve kalsiyum içerikleri, yüksek magnezyum ve demir seviyeleri, nispeten yüksek konsantrasyonlarda nikel, krom, kobalt ve nötrden alkaliye kadar pH'a sahiptirler (Brady vd., 2005; Van der Ent vd., 2015; Kumar vd., 2017). *E. atrorubens*, serpantinli toprakların daha yüksek metal konsantrasyonlarına ve daha düşük azot ve fosfor seviyelerine rağmen granitli topraklardan daha büyük popülasyona, daha fazla sayıda meyve oluşumu, daha büyük kök uzunlukları ve daha kalın yaprak gövdesi sahip olmaktadır. İyi gelişmiş orkide mikorizaları, bu türün olumsuz serpantin koşulları altında hayatta kalmasına katkıda bulunmuş olabilir (Filiminova vd., 2020).

Birbirinden çok uzakta olan mesafelerde yapılan çalışmamızda farklı funguslar izole edilmiş olup tohum çimlenmesine Bolu'dan izole edilen fungusun etkili olduğu gözlenmiştir. Çalışma alanları arasındaki birey sayıları karşılaştırıldığında Bolu popülasyonu birey sayısının Rize popülasyonundan daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu da bir popülasyondaki birey sayısı ile fungus varlığı arasında doğru orantılı

olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız süresince, arazide çalışma için seçilen bireylerin yakınında yeni oluşan bireylere Bolu-Abant Gölü çevresinde hiç rastlanılmamış, Rize-Garzavan Yaylası'nda ise sadece bir bireyin yakınında oluşan birkaç yeni bireye rastlanılmıştır. Bu da türün doğada ne kadar zor çoğaldığını ve nesli tükenme tehlikesi altında olduğu için en kısa sürede koruma altına alınmasını zorunlu kılmaktadır.



6. KAYNAKLAR

Aboul-Maaty N. Ab.-F. and. Oraby H. A.-S (2018). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. Bulletin of the National Research Centre (2019) 43:25.

Acemi, A., & Özen, F. (2019). Optimization of asymbiotic seed germination protocol for. The EuroBiotech Journal, 3(3), 143-151.

Adamowski W. (2006). Expansion of native orchids in anthropogenous habitats. Polish Botanical Studies 22: 35–44.

Aggarwal, S., & Zettler, L. W. (2010). Reintroduction of an endangered terrestrial orchid, *Dactylorhiza hatagirens* (D. Don) Soo, assisted by symbiotic seed germination: First report from the Indian subcontinent. Nature and Science, 8(10), 139-145.

Aggarwal, S., Nirmala, C., Beri, S., Rastogi, S., & Adholeya, A. (2012). In vitro symbiotic seed germination and molecular characterization of associated endophytic fungi in a commercially important and endangered Indian orchid *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl. European Journal of Environmental Sciences, 2(1).

Alexander C and Hadley G (1983) Variation in symbiotic activity of *Rhizoctonia* isolates from *Goodyera repens* mycorrhizas. Trans. Br. mycol. Soc. 80: 99–106

An, J.; Kim, P.B.; Park, H.B.; Kim, S.; Park, H.J.; Lee, C.W.; Lee, B.-D.; Kim, N.Y.; Hwang, J.E. Effects of Different Growth Media on In Vitro Seedling Development of an Endangered Orchid Species *Sedirea japonica*. Plants 2021, 10, 1193.

Anghelescu, N. E., Vafaee, Y., Ahmadzadeh, K., & Chen, J. T. (2023). Asymbiotic seed germination in terrestrial orchids: problems, progress, and prospects. Advances in Orchid Biology, Biotechnology and Omics, 221-260.

Arcidiacono, M., Catalano, C., Motisi, A., Sajeve, M., Carimi, F., & Carra, A. (2021). Influence of culture conditions on in vitro asymbiotic germination of *Anacamptis longicornu* and *OpHrys panormitana* (Orchidaceae). Plants, 10(11), 2543.

Arditti J (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot Rev 33:1–97
Arditti J. 1979. Aspects of the physiology of orchids. Advances in Botanical Research 7: 241±665.

Arditti J. 1984. An history of orchid hybridization, seed germination, and tissue culture. Botanical Journal of the Linnean Society of London 89: 359±381.

Arditti, 2009. History of orchid propagation: A mirror of the history of biotechnology. Plant Biotechnol Rep (2009) 3:1–56

Arditti, J. and Ernst, R. 1993. Micropropagation of orchids. John Wiley and Sons, 640, New York.

Arditti, J. and Ghani, A. K. A. 1999. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. New Phytologist, 145, 367–421.

Arditti, J. Micropropagation of Orchids; JohnWiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2009; ISBN 1-4443-0040-7.

Arditti, J.; Ernst, R. PHysiology of germinating orchid seeds. Orchid. Biol. Rev. Perspect. 1984, 3, 177–222.

Balilashaki, K., Vahedi, M., & Karimi, R. (2015). In vitro Direct regeneration from node and leaf explants of *PHalaenopsis* cv. Surabaya. Plant Tissue Culture and Biotechnology, 25(2), 193-205.

Barthlott, 1976 Barthlott, W. 1976. MorpHologie der Samen von Orchideen im Hinblick auf taxonomische und funktionelle Aspekte. Proceedings of the Eighth World Orchid Conference (WOC-8), 10-17 April, Book of Abstracts, 444-455, Frankfurt, Deutsche.

Batty AL, Dixon KW, Brundrett M, Sivasithamparam K (2001). Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed in a Mediterranean bushland. New PHytologist, 152, 511–520.

Batty vd. 2001 Batty, A. L., Dixon, K. W., Brundrett, M. and Sivasithamparam, K. 2001 . Constraints to symbiotic germination of terrestrial orchid seed In a Mediterranean Bushland. New PHytologist, 152: 3, 511-520.

Batty, A. L., Brundrett, M. C., Dixon, K. W., & Sivasithamparam, K. (2006). In situ symbiotic seed germination and propagation of terrestrial orchid seedlings for establishment at field sites. Australian Journal of Botany, 54(4), 375-381.

Bayman P, González EJ, Fumero JJ, Tremblay RL (2002). Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. J Ecol 90:1002–1008.

Bayman, P., González, E. J., Fumero, J. J., & Tremblay, R. L. (2002). Are fungi necessary? How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field. Journal of Ecology, 90(6), 1002-1008.

Bektaş, E., & Sökmen, A. (2022). In vitro asymbiotic germination, seedling formation and tuberization of *Orchis sancta*. Turkish Journal of Biodiversity, 5(2), 67-74.

Beltrán-Nambo, M. A., Martínez-Trujillo, M., Montero-Castro, J. C., Salgado-Garciglia, R., Otero-Ospina, J. T., & Carreón-Abud, Y. (2018). Fungal diversity in the roots of four epipHytic orchids endemic to Southwest Mexico is related to the breadth of plant distribution.

Bidartondo MI (2005) The evolution of myco-heterotrophY. New PHytol 167:335-352

Bidartondo MI, Bruns TD, Weiß M, Sérgio C, Read DJ.(2003). Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. Proceedings of the Royal Society of London 270: 835–842.

Bidartondo MI, Bruns TD. (2001). Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespread pHylogenetic and geograpHical structure. *Molecular Ecology* 10: 2285–2295 BiogeograpHy of mycorrhizal symbiosis, 159-177.

Boesewinkel F. D., Bouman F. (1984) The seed—structure. In: Johri B. M. (ed.) *Embryology of Angiosperms*. Springer, Berlin, pp. 567–610. *ot. Jahrb. Syst.* 96: 353–374.

Bonfante P. And Genre A. (2010). Mechanisms underlying benefi cial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Published 27 Jul 2010| DOI: 10.1038/ncomms1046.

Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, Dixon K, Koch J, Sivasithamparam K (2007) Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions. *Mycol Res* 111:51–61.

Bougoure, J., Ludwig, M., Brundrett, M., Cliff, J., Clode, P., Kilburn, M., & Grierson, P. (2014). High-resolution secondary ion mass spectrometry analysis of carbon dynamics in mycorrhizas formed by an obligately myco-heterotrophHic orchid. *Plant, Cell & Environment*, 37(5), 1223-1230.

Bouyoucos, G.J. 1951. A recalibration of the hydrometer method for making mechanical analyses of soil. *Agr. J.* 43: 434-438.

Bowles M. L., Zettler L. W., Bell T., and Kelsey P.(2005). Relationships between soil characteristics, distribution and restoration potential of the Federal threatened Eastern Prairie Fringed Orchid, *Platanthera leucopHaea* (Nutt.) Lindl. *Am. Midl. Nat* 154:273–285.

Brady KU, Kruckeberg AR, Bradshaw HD (2005) Evolutionary ecology of plant adaptation to soils. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:243–266.

Brundrett MC (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev* 79:473–495

Brundrett MC, Tedersoo L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New PHytol.* 2018 Dec;220(4):1108-1115. doi: 10.1111/npH.14976. Epub 2018 Jan 22.

Cameron DD, Preiss K, Gebauer G, Read DJ (2009) The chloropHyllcontaining orchid *Corallorhiza trifida* derives little carbon through pHotosynthesis. *New PHytol* 183:358–364. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02853.x>

Cameron, D.D., Leake, J.R., 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.

Cardon Z.G and J.L. Whitbeck., 2007. *The rhizospHere*. Elsevier Academic Press., 235 pp.

Clements MA, Muir H, Cribb PJ (1986) A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bull* 41:437–445

Chase, M.W.; Cameron, K.M.; Freudenstein, J.V.; Pridgeon, A.M.; Salazar, G.; van den Berg, C.; Schuiteman, A. An updated classification of Orchidaceae: Updated Classification of Orchidaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 2015, 177, 151–174.

Chen TY, Chen JT, Chang WC. (2004a). Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *PapHiopedilum* orchids. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 76, 11

Chen ZL, Ye XL, Liang CY, Duan J. (2004b). Seed germination in vitro of *PapHiopedilum armeniacum* and *P. micranthum*. *Acta Horti Sin*, 31, 540–2.

Chen, J., Liu, S. S., Kohler, A., Yan, B., Luo, H. M., Chen, X. M., & Guo, S. X. (2017). iTRAQ and RNA-Seq analyses provide new insights into regulation mechanism of symbiotic germination of *Dendrobium officinale* seeds (Orchidaceae). *Journal of proteome research*, 16(6), 2174-2187.

Chen, Y., Goodalea, U.M., Fan, X.L., and Gao J.Y. (2015). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *PapHiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecol. Conserv.* 3, 367–378.

Clements MA, Muir H, Cribb PJ (1986) A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial orchids. *Kew Bull* 41:437–445.

Crawford NM (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7:859–868.

Cribb PJ, Kell SP, Dixon KW, Barrett RL. 2003. Orchid conservation: a global perspective. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. *Orchid conservation*. Kota Kinabalu, Sabah, Natural History Publications, 1–24.

Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K. W., & Barrett, R. L. (2003). Orchid conservation: a global perspective. *Orchid conservation*, 124.

Cruz D., Suárez J.P. & Piepenbring M. 2014. *Cryptic* species revealed by molecular phylogenetic analysis of sequences obtained from basidiomata of *Tulasnella*. *Mycologia* 106 (4): 708–722. <https://doi.org/10.3852/12-386>

Çağlayan K., Özavcı A., Eskalen A., 1998. Doğu Akdeniz Bölgesinde Yaygın Olarak Yetişen Bazı Salep Orkidelerinin Embriyo Kültürü Kullanılarak In Vitro Koşullarda Çoğaltılmaları. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22: 187-191.

Davis, P. H. 1984. *Flora of Turkey and the East Aegean islands*. Edinburgh University Press, 2, 5-8.

De Stefano, D., Costa, B. N. S., Downing, J., Fallahi, E., & Khoddamzadeh, A. A. (2022). In-vitro micropropagation and acclimatization of an endangered native orchid using organic supplements. *American Journal of Plant Sciences*, 13(3), 380-393.

De, L.C.; Pathak, P.; Rao, A.N.; Rajeevan, P.K. *Medicinal and Aromatic Orchids: In Commercial Orchids*; De Gruyter Open: Warsaw,

Dearnaley, J. D. W. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17, 475–486. doi: 10.1007/s00572-007-0138-1

Dearnaley, J. D. W., Martos, F., and Selosse, M.-A. (2012). “Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects,” in *Fungal Associations*. 2nd Edn. ed. B. Hock (Berlin, Heidelberg: Springer), 207–230.

Dechorgnat J, Nguyen CT, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S, Daniel-Vedele F (2011). From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *J Exp Bot* 62:1349–1359

Devi N.P., Lisipriya B. and Bai N. (2015). Asymbiotic seed germination and mass multiplication of *Taprobanea spathulata* (L.) Christenson (Asparagales: Orchidaceae): a medicinally important epiphytic orchid. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 2015, v. 2, n. 4, p. 271-286.

Diantina, S., Kartikaningrum, S., McCormick, A. C., Millner, J., McGill, C., Pritchard, H. W., & Nadarajan, J. (2020). Comparative in vitro seed germination and seedling development in tropical and temperate epiphytic and temperate terrestrial orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143(3), 619-633.

Diengdoh, R.V.; Kumaria, S.; Tandon, P.; Das, M.C. Asymbiotic germination and seed storage of *Papilio pedilum insigne*, an endangered lady's slipper orchid. *S. Afr. J. Bot.* 2017, 112, 215–224.

Dixon KW, Hopper SD. 1996. Regional accounts – Australia. In: Hagsater E, Dumont V, eds. *Orchids – status, survey and conservation action plan*. Gland: IUCN/SSC Orchid Specialist Group, 109–115.

Djordjević V, Tsiftsis S, Lakušić D, Stevanović V (2016b) Niche analysis of orchids of serpentine and non-serpentine areas: implications for conservation. *Plant Biosyst* 150:710–719

Djordjević, V., Tsiftsis, S., (2020). *The Role of Ecological Factors in Distribution and Abundance of Terrestrial Orchids*. Springer Nature Switzerland AG 2020.

Djordjević V, Tsiftsis S, Lakušić D, Stevanović V (2016) Niche analysis of orchids of serpentine and non-serpentine areas: implications for conservation. *Plant Biosyst* 150(4):710–719. Dordrecht, pp 387–504

Dowling, N., & Jusaitis, M. (2012). Asymbiotic in vitro germination and seed quality assessment of Australian terrestrial orchids. *Australian Journal of Botany*, 60(7), 592-601.

Dressler RL (1981) 'The Orchids: Natural history and classification.' (Smithsonian Institute: USA)

Dutra, D., Johnson, T. R., Kauth, P. J., Stewart, S. L., Kane, M. E. and Richardson, L. 2008. Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 94: 1, 11-21 Dynamics. Bio Bulletin, 8(4): 07-08.

Eriksson O. and Kainulainen K. (2011). The evolutionary ecology of dust seeds. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 13 (2011) 73–87.

Fang SC, Chen JC, Wei MJ (2016) Protocorms and protocorm-like bodies are molecularly distinct from zygotic embryonic tissues in *Phalaenopsis aphrodite*. Plant Physiology 171: 2682–2700

Favre-Favre-Godal, Q., Gourguillon, L., Lordel-Madeleine, S., Gindro, K., & Choisy, P. (2020). Orchids and their mycorrhizal fungi: An insufficiently explored relationship. Mycorrhiza, 30(1), 5–22. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00934-2>

Figura T, Weiser M, Ponert J (2019). Orchid seed sensitivity to nitrate reflects habitat preferences and soil nitrate content. Plant Biol 22(1):21–29

Filimonova EI, Lukina NV, Glazyrina MA, Borisova GG, Maleva MG, Chukina NV (2019) Endangered orchid plant *Epipactis atrorubens* on serpentine and granite outcrops of Middle Urals, Russia: a comparative morphophysiological study. AIP Conf Proc 2063:040016. <https://doi.org/10.1063/1.5087348>

Filimonova EI, Lukina NV, Glazyrina MA, Borisova GG, Tripti, Kumar A., Maleva MG (2020). A comparative study of *Epipactis atrorubens* in two different forest communities of the Middle Urals, Russia. J. For. Res. (2020) 31(6):2111–2120. <https://doi.org/10.1007/s11676-019-01010-y>.

Finlay R.D. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. Journal of Experimental Botany, Vol. 59, No. 5, pp. 1115–1126, 2008 [doi:10.1093/jxb/ern059](https://doi.org/10.1093/jxb/ern059)

Fitter, A.H. (2005) Darkness visible: reflections on under-ground ecology. Journal of Ecology, 93, 231–243.

Gale S. W., Fischer G. A., Cribb P. J. And Fa M. F. (2018). Orchid Conservation: Bridging The Gap Between Science And Practice

Gebauer ve Meyer 2003 Gebauer, G. and Meyer, M. 2003. ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. New Phytologist, 160: 1, 209-223. Gebauer, G., Preiss, K. and Gebauer, A. C. 2016. Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. New Phytologist, 211: 1, 11-15.

Girlanda vd., 2011 Girlanda, M., Segreto, R., Cafasso, D., Liebel, H. T., Rodda, M., Ercole, E. and Perotto, S. 2011. PHotosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophY and specific mycorrhizal associations. *American Journal of Botany*, 98: 7, 1148-1163.

Girlanda, M., Selosse, M. A., Cafasso, D., Brilli, F., Delfine, S., Fabbian, R., ... & Perotto, S. (2006). Inefficient pHotosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology*, 15(2), 491-504.

Givnish TJ., Spalink D., Ames M., Lyon SP., Hunter SJ., Zuluaga A., Endara L. (2015). Orchid pHylogenomics and multiple drivers oftheir extraordinary diversification. *Proc R Soc B* 282:20151553.

Givnish, T. J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., et al. (2016). Orchid historical biogeograpHy, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. *J. Biogeogr.* 43, 1905–1916. doi: 10.1111/ jbi.

Godefroid, S., Rivière, S., Waldren, S., Boretos, N., Eastwood, R., & Vanderborght, T. (2011). To what extent are threatened European plant species conserved in seed banks?. *Biological Conservation*, 144(5), 1494-1498.

Gonneau C, Jersáková J, de Tredern E et al (2014) PHotosynthesis in perennial mixotrophHic *Epipactis* spp. (Orchidaceae) contributes more to shoot and fruit biomass than to hypogeous survival. *J Ecol* 102:1183–1194. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12274>

Govaerts R, Bernet P, Kratochvil K, Gerlach G, Carr G, Alrich P, Pridgeon AM, Pfahl J, Campacci MA, Baptista DH, Tigges H, Shaw J, Cribb P, George A, Kreuz K, Wood JJ. 2017. World checklist of Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens Kew, URL:<https://www.scienceopen.com/document?vid=2e89a8a9>

Govaerts, R., Nic Lughadha, E., Black, N., Turner, R., & Paton, A. (2021). The World Checklist of Vascular Plants, a continuously updated resource for exploring global plant diversity. *Scientific data*, 8(1), 215.

Gupta, A. (2016). Asymbiotic seed germination in orchids: role of organic additives. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*, 3(5), 143-147.

Hajong S, Kumaria S, Tandon P. (2010). In vitro propagation of the medicinal orchid *Dendrobium chrysanthum*. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 76: 1–6.

Harvais G. and Hadley G. the relation between host and endopHyte in orchid mycorrhiza, *NewPtytol.* 66:205-215 (1967a)

Harzlı (2024). Aynı habitatı paylaşan orkideler arasındaki Mikorizal ilişkiler ve simbiyotik tohum çimlenmesi. Doktora Tezi.

Hassler, M. 2022. World orchids. Synonymic checklist and distribution of the orchids of the world. Version 13.2. Website: <https://www.worldplants.de/orchids> [accessed 8 August 2022].

Heywood, V. H. (2015). In situ conservation of plant species—an unattainable goal? *Isr. J. Plant Sci.* 63, 211–231. doi: 10.1080/07929978.2015.1035605

Hinsley, A., De Boer, H. J., Fay, M. F., Gale, S. W., Gardiner, L. M., Gunasekara, R. S., ... & PHelps, J. (2018). A review of the trade in orchids and its implications for conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4), 435–455.

Hossain, M. M. (2008). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth.(Orchidaceae). *African Journal of Biotechnology*, 7(20).

Hossain, M.M.; Kant, R.; Van, P.T.; Winarto, B.; Zeng, S.; Teixeira da Silva, J.A. The Application of Biotechnology to Orchids. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2013, 32, 69–139.

Hsu R.C.C. and Lee Y.I (2012). Seed Development of *Cypripedium debile* Rchb. f. in Relation to Asymbiotic Germination. *Hortscience* 47(10):1495–1498.

Hu, H.X., Mo, Y.X., Shen, T., Wu, Y., Shi, X.M., Ai, Y.Y., Lu, H.Z., Zakari, S., Li, S., Song, L., 2022a. Simulated high-intensity pHropHyte removal mitigates the robustness of epipHyte community and destroys commensal network structure. *For. Ecol. Manag.* 526, 120586. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2022.120586>

Ingold, C. T., & Hudson, H. J. (1993). Fungi as mutualistic symbionts. *The Biology of Fungi*, 183–195.

IUCN, (2019). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2019-2. <http://www.iucnredlist.org>. Accessed 1 Mar 2019.

Izuddin, M., Srivathsan, A., Lee, A. L., Yam, T. W., and Webb, E. L. (2019). Availability of orchid mycorrhizal fungi on roadside trees in a tropical urban landscape. *Sci. Rep.* 9:19528. doi: 10.1038/s41598-019-56049-y

İşler S. (2022). ;Dactilorhiza In: Güner, A., Kandemir, A., Menemen, Y., Yıldırım, H., Aslan, S., Çimen, A.Ö., Güner, I., Ekşi, G. ve Şen, F. (edlr.). *Resimli Türkiye Florası (Illustrated Flora of Turkey)* 3a: 123–161. ANG Vakfı Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları. İstanbul.

Jackson, M.L., 1967. *Soil Chemical Analysis*. Prentice-Hall of India Pvt. Ltd., New Delhi, 498p.

Jacquemyn vd. 2007; Jacquemyn, H., Brys, R., Vandepitte, K., Honnay, O., Roldán-Ruiz, I and Wiegand, T. 2007. A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. *New Phytologist*, 176, 448–459.

Jacquemyn H, Brys R, Lievens B, Wiegand T. 2012a. Spatial variation in belowground seed germination and divergent mycorrhizal associations correlate with spatial segregation of three co-occurring orchid species. *Journal of Ecology* 100: 1328–1337.

Jacquemyn, H., & Merckx, V. S. (2019). Mycorrhizal symbioses and the evolution of trophic modes in plants. *Journal of Ecology*, 107(4), 1567-1581.

Jacquemyn, H., Brys, R., Waud, M., Busschaert, P., and Lievens, B. (2015). Mycorrhizal networks and coexistence in species-rich orchid communities. *New Phytol.* 206, 1127–1134. doi: 10.1111/npH.13281

Jacquemyn, H., Duffy K. J., Selosse, M.A., (2017). Biogeography of orchid mycorrhizas.

Jacquemyn, H., Merckx, V., Brys, R., Tyteca, D., Cammue, B. P. A., Honnay, O., et al. (2011). Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *Orchis* (Orchidaceae). *New Phytol.* 192, 518–528. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03796.x

Janssen T, Bremer K. (2004). The age of major monocot groups inferred from 800+ rbcL sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 146: 385–398.

Jersakova, J. and Malinova, T. (2007). Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytologist* (2007) 176: 2375–24317

Jolman D., Batalla M. I., Hungerford A. , Norwood P. , Tait N., Wallace L. E., 2022. The challenges of growing orchids from seeds for conservation: An assessment of asymbiotic techniques. *Appl. Plant Sci.* 2022;10:e11496. DOI: 10.1002/aps3.11496
Jones DL. (2006). A complete guide to native orchids of Australia including the island territories. Sydney: Reed New Holland.

Kakouridis, A., Hagen, J. A., Kan, M. P., Mambelli, S., Feldman, L. J., Herman, D. J., Weber, P. K., Pett-Ridge, J., & Firestone, M. K. (2022). Routes to roots: direct evidence of water transport by arbuscular mycorrhizal fungi to host plants. *New Phytologist* , 236(1) , 210–221. <https://doi.org/10.1111/npH.18281>

Karaman M. U., Cullum F.J. 2020. Asymbiotic Germination and Seedling Development of Terrestrial Orchid *Bletilla striata* Using in vitro and ex vitro Cultures. *Horticultur Studies*, 38(1):1-14 <http://doi.org/10.16882/HortiS.823961>

Kauth PJ, Dutra D, Johnson TR, et al. (2008). Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. In: Teixeira da Silva JA, ed. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues* (1st Edn, Vol V). Isleworth, UK: Global Science Books, 375–91

Kauth, P. (2005). In vitro seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacola lanceolata* var. *lanceolata*: two florida native terrestrial orchids. Master Thesis, University of Florida, Graduate School of Sciences, Florida.

Kauth, P. J., Dutra, D., Johnson, T. R., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Vendrame, W. (2008). Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*, 5, 375-391.

Khare E., Mishra J. and Arora N. K.(2018). Multifaceted Interactions Between EndopHytes and Plant: Developments and Prospects. *Frontiers Microbiology*, 15 November 2018 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732>

Kim, J. H., Son, S. W., Kim, S. Y., & Jeong, M. J. (2021). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Pelatantheria scolopendrifolia*, a rare epiphytic orchid native to Korea. *RhizospHere*, 19, 100371.

Kitsaki, C. K., Zygouraki, S., Ziobora, M., & Kintzios, S. (2004). In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *OpHrys species* (Orchidaceae). *Plant cell reports*, 23, 284-290.

Knudson L (1921) La germinacio'n no simbio'tica de las semillas deorquideas. *Bol Real Soc Espan'ola Hist Nat* 21:250–260

Knudson L (1922a) Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *BotGaz* 73:1–25

Knudson L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 73: 1±25.

Kottke, I., Setaro, S., Haug, I., Herrera, P., Cruz, D., Fries, A., Gawlik, J., Homeier, J., Werner, F.A., Gerique, A. & Suárez, J.P. (2013). Mycorrhiza networks promote biodiversity and stabilize the tropical mountain rain forest ecosystem: Perspectives for understanding complex communities. In: *Ecological Studies* (Vol. 221, pp. 187–203). Berlin, Heidelberg: Springer.

Köhler, J., Yang, N., Pena, R., Raghavan, V., Polle, A., and Meier, I. C. (2018). Ectomycorrhizal fungal diversity increases pHospHorus uptake efficiency of European beech. *New PHYtol*. 220, 1200–1210. doi: 10.1111/npH.15208.

Kömpe Y. Ö., Mutlu V. A., Özkoç İ., Demiray S., Bozkurt S. (2022). Fungal diversity and ex vitro symbiotic germination of *Serapias vomeracea* (Orchidaceae). *Acta Bot. Croat.* 81 (1), 108–116, 2022

Kömpe, Y. O., & Mutlu, V. A. (2021). Ex vitro symbiotic germination of the seeds of *Anacamptis coriophora* (L.) RM Bateman, Pritgeon & MW Chase and *Orchis anatolica* Boiss. *Biologia Futura*, 72(4), 509-516.

Kömpe, Y.O., Mutlu, V.A., 2017: Mycorrhizal diversity in some species of *Dactylorhiza* genus (Orchidaceae), *Biological Diversity and Conservation* 10, 55–64.

Kömpe, Y.O., Mutlu, V.A., Ozkoc, I., (2020). The viability of *Anacamptis laxiflora* (Orchidaceae) seeds and the symbiotic germination. *Plant Biosystems* 154, 800–805.

Kristy U, Kruckeberg A, Bradshaw H Jr (2005) Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:243–266.

Kuga, Y., Sakamoto, N., & Yurimoto, H. (2014). Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New PHYtologist*, 202(2), 594-605.

Kumar A, Maiti SK, Tripti Prasad MNV, Singh RS (2017) Grasses and legumes facilitate pHytoremediation of metalliferous soils in the vicinity of an abandoned chromite-asbestos mine. *J Soils Sed* 17(5):1358–1368.

Kumar A, Nandi SK, Bag N, Palni LMS (2002) Tissue culture studies in two important orchid taxa : *Rhynchostylis retusa* (L.) Bl. and *Cymbidium elegans* Lindl. In: Nandi SK, Palni LMS, Kumar A (eds) *Role of plant tissue culture in biodiversity conservation and economic development*. Gyanodaya Prakashan, Nainital, India, pp 113–124.

Lallemant F, Martin-Magniette M-L, Gilard F et al (2019) In situ transcriptomic and metabolomic study of the loss of pPhotosynthesis in the leaves of mixotrophic plants exploiting fungi. *Plant J* 98:826– 841. <https://doi.org/10.1111/tpj.14276>

Lauzer D, Renaut S, Arnaud MS, Barabe D (2007) In vitro asymbiotic germination, protocorm development and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex. Willd.) Torr. (Orchidaceae). *J Torrey Bot Soc* 134:344–348

Leake JR. 2005. Plants parasitic on fungi- unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the ‘saprophytic’ plant myth. *Mycologist* 19: 113– 122.

Leake, J. R. 2004. Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current opinion in plant biology*, 7: 4, 422-428.

Leake, J.R. (1994). The biology of myco-heterotrophic (‘saprophytic’) plants. *New Phytologist* 127: 171-216.

Lee vd, 2006 Lee, Y. I., Yeung, E. C., Lee, N. and Chung, M. C. 2006. Embryo development in the lady's slipper orchid, *Paphiopedilum delenatii*, with emphasis on the ultrastructure of the suspensor. *Annals of Botany*, 98: 6, 1311-1319.

Lee YI. (2007). The asymbiotic seed germination of six *Paphiopedilum species* in relation to the time of seed collection and seed pretreatment. *Acta Horti*, 755, 381–5.

Leff JW, Jones SE, Prober SM, Barberán A, Borer ET, Firn JL, Harpole SW, Hobbie SE, Hofmockel KS, Knops JMH, McCulley RL, La Pierre K, Risch AC, Seabloom EW, Schütz M, Steenbock C, Stevens CJ, Fierer N (2015) Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proc Nat Acad Sci USA* 112(35):10967–10972

Liebel HT, Bidartondo MI, Gebauer G (2015) Are carbon and nitrogen exchange between fungi and the orchid *Goodyera repens* affected by irradiance? *Ann Bot* 115:251–261. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu240>

Liu, H., Liu, Z. J., Jin, X. H., Gao, J. Y., Chen, Y., Liu, Q., et al. (2020). Assessing conservation efforts against threats to wild orchids in China. *Biol. Conserv.* 243:108484. doi: 10.1016/j.biocon.2020.108484

Liu, Q., Chen, J., Corlett, R. T., Fan, X. L., Yu, D. L., Yang, H. P., et al. (2015a). Orchid conservation in the biodiversity hotspot of southwestern China. *Conserv. Biol.* 29, 1563–1572. doi: 10.1111/cobi.12584

Lo, S.F.; Nalawade, S.M.; Kuo, C.L.; Chen, C.L.; Tsay, H.S. Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense makino*—A medicinally important orchid. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 2004, 40, 528–535.

Long B, Niemiera AX, Cheng Z, Long C (2010) In vitro propagation of four threatened *PapHiopedilum species* (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 101:151–16.

Ma M, Tan TK, Wong SM (2003) Identification and molecular phylogeny of *Epulorhizaisolates* from tropical orchids. *Mycol Res* 107:1041-1049

Ma, X.; Zhang, Q.; Zhu, Q.; Liu, W.; Chen, Y.; Qiu, R.; Wang, B.; Yang, Z.; Li, H.; Lin, Y.; et al., 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant* 2015, 8, 1274–1284.

Mahendran G, Muniappan V, Ashwini M, Muthukumar T, Narmatha Bai V (2013) Asymbiotic seed germination of *Cymbidium bicolor* Lindl. (Orchidaceae) and the influence of mycorrhizal fungus on seedling development. *Acta Physiol Plant* 35:829–840.

Manning, J. C. and Van Staden, J. 1987. The functional differentiation of the testa in seed of *Indigofera parviflora* (Leguminosae: Papilionoideae). *Botanical Gazette*, 148: 1, 23-34.

Masuhara, G., Katsuya, K., 1994. In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames, var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytol.* 127, 711–718.

McCormick, M.K., Taylor, D.L., Whigham, D.F., Burnett, R.K. (2016) Data from: Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. Dryad Digital Repository, <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.4n5h7>.

McCormick, M. K., Whigham, D. F., O'Neill, J. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163, 425–438.

McCormick, M. K., and Jacquemyn, H. (2014). What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytol.* 202, 392–400. doi: 10.1111/nph. 12639

McCormick, M. K., Whigham, D. F., and Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population. *New Phytol* 219:1207–1215

McCormick, M.K., Taylor, D.L., Juhaszova, K., Burnett, R.K., Whigham, D.F. & O'Neill, J.P. (2012) Limitations on orchid recruitment: not a simple picture. *Molecular Ecology*, 21, 1511–1523.

McCormick, M.K., Whigham, D.F., O'Neill, J.P., Becker, J.J., Werner, S., Bruns, T.D. & 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., Whigham, D.F., Sloan, D., O'Malley, K. & Hodkinson, B. (2006) Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology*, 87, 903–911.

McKendrick SL, Leake JR, Taylor DL, Read DJ. (2000). Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: Ontogeny of *Corallorhiza trifida* and characterization of its mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 145: 523–537.

McKendrick, S. L. (1995). The effects of herbivory and vegetation on laboratory-raised *Dactylorhiza praetermissa* (Orchidaceae) planted into grassland in southern England. *Biological Conservation*, 73(3), 215–220.

McKendrick, S.L., Leake, J.R., Taylor, D.L., Read, D.J., 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytol.* 154, 233–247.

Miura, C., Furui, Y., Yamamoto, T., Kanno, Y., Honjo, M., Yamaguchi, K., et al. (2024). Autoactivation of mycorrhizal symbiosis signaling through gibberellin deactivation in orchid seed germination. *Plant Physiology*. 194, 1–18. doi: 10.1093/plphys/kiad517

Mohammadi K., Khalesro S., Sohrabi Y., Heidari G. (2011). Beneficial Effects of the Mycorrhizal Fungi for Plant Growth. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 1(9)310-319.

Mohanty P, Das MC, Kumaria S, Tandon P (2012) High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 109:297–305.

Molvray ve Kores 1995; Molvray, M. and Kores, P. J. 1995. Character analysis of the seed coat in *Spiranthoideae* and *Orchidoideae*, with special reference to the *Diurideae* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 82: 11, 1443-1454.

Muir, 1989 Muir, H. J. 1989. *Modern Methods in Orchid Conservation: The Role of Physiology, Ecology and Management*. Cambridge University Press, 39-56, Cambridge, England.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*;15:473–497.

Mutlu, V. A., & Kömpe, Y. O. (2020). Mycorrhizal fungi of some *Orchis* species of Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 52(2), 687-695.

Nabieva, A. Y. (2021). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Orchis militaris*, an endangered orchid in Siberia. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 122.

Nanekar V., Shriram V., Kumar V. and Kavi Kishor P. B. (2014). Asymbiotic In vitro Seed Germination and Seedling Development of *Eulophia nuda* Lindl., An Endangered Medicinal Orchid. The National Academy of Sciences, India, Sect. B Biol. Sci. (July–Sept 2014) 84(3):837–846.

Nelson, D.W. and Sommers, L.E. (1973) Determination of Total Nitrogen in Plant Material. Agronomy Journal, 65, 109-112.

Nongrum I, Kumaria S, Tandon P. (2007). Influence of in vitro media on asymbiotic germination, plantlet development and ex vitro establishment of *Coelogyne ovalis* and *Coelogyne nitida*. Proceedings of the Indian National Science Academy 73: 205–207.

Oehl F., Laczko E. , Bogenrieder A., Karl Stahr , Bösch R., van der Heijden M., Sieverding E. (2010). Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. Soil Biology & Biochemistry 42 (2010) 724e738

Oğuz, K., Pekin, M.A., Çamalan, G., (2021). Muğla İlinde 1960-2018 Dönemi Kuraklık Analizi . Araştırma Makalesi / Research Article, Doğ Afet Çev Derg, 2021; 7(1): 89-100, DOI: 10.21324/dacd.774955

Oldfield, S. F. (2009). Botanic gardens and the conservation of tree species. Trends Plant Sci. 14, 581–583. doi: 10.1016/j.tplants.2009.08.013

Olaya, G., Abawi, G.S., 1994. Characteristics of Rhizoctonia and Binucleate Rhizoctonia species Causing Foliar Blight and Root Rot on Table Beet in New York State, Plant Dis. 78:800-804.

Ors S., Sahin U., Ercisli S. and Esitken A. (2011). Physical and chemical soil properties of orchid growing areas in eastern Turkey. The Journal of Animal & Plant Sciences, 21(1): 2011, Page: 60-65 ISSN: 1018-7081

Ostojić, J., Ljubojević, M., Narandžić, T., & Pušić, M. (2022). In vitro culture conditions for asymbiotic germination and seedling development of *Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich. and *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. South African Journal of Botany, 150, 829-839.

Otero JT, Bayman P, Ackerman JD (2005) Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. Evol Ecol 19:29-43

Otero, J. T., Ackerman, J. D. & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. American Journal of Botany, 89(11), 1852–1858. <http://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>

Otero, J. T., Flanagan, N. S., Herre, E. A., Ackerman, J. D. & Bayman, P. (2007). Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). American Journal of Botany, 94(12), 1944–1950. <http://doi.org/10.3732/ajb.94.12.1944>

Otero, J.T., Ackerman, J.D., Bayman, P., 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Mol. Ecol.* 13, 2393–2404.

Özdener, Y., (1994).” *Dactylorhiza urvilleana* (Steudel) Bauman ve *Künkele 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

Özkoç İ., Dalcı M., 1992. İki Farklı Kültür Ortamında *Serapias vomeraceae* (Orchidaceae) Tohumlarının Çimlenme ve Gelişme Üzerine Bazı Fungusların Etkisi. *Turkish Journal of Biology*, 16: 158-164.

Pant, B., & Thapa, D. (2012). In vitro mass propagation of an epiphytic orchid, *Dendrobium primulinum* Lindl. through shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology*, 11(42), 9970-974.

Parlak S., 2022. Effects of Temperature on Asymbiotic Seed Germination of *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P.Delforge. Kastamonu Univ., Journal of Forestry Faculty, 2022, 22(3): 227-235. Doi:10.17475/kastorman.1215295

Parlak, S., Tutar, M., (2011). Karaburun Yarımadası’nda Yayılış Gösteren Salep Orkideleri e Bazı Toprak Özellikleri. Ziraat Mühendisliği Temmuz-Aralık 2011 L Sayı: 357

Paul S, Kumaria S, Tandon P. (2012). An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale in vitro regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. *AoB PLANTS* 2012: plr032; doi:10.1093/aobpla/plr032

Pascual, C.B., Toda, T., Raymondo, A.D., 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.

Pereira M.C., Coelho I.S., Valadares R.B.S., Oliveira S.F., Bocayuva M., Pereira O.L., Araujo E.F. & Kasuya M.K.(2014). Morphological and molecular characterization of *Tulasnella spp.* fungi isolated from the roots of *Epidendrum secundum*, a widespread orchid. *Symbiosis* 62: 111–121. <https://doi.org/10.1007/s13199-014-0276-0>

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.

Phillips, R.D., Reiter, N., Peakall, R., 2020. Orchid conservation: from theory to practice. *Ann. Bot.* 126 (3), 345–362. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa093>

Pierik, R. L. M., Sprenkels, P. A., Van Der Harst, B., & Van Der Meys, Q. G. (1988). Seed germination and further development of plantlets of *Papilioedilum ciliolare* Pfitz. in vitro. *Scientia Horticulturae*, 34(1-2), 139-153. Poland, 2015.

Popova E. V., Nikishina T. V. , Kolomeitseva G. L. , and Popov A. S. (2003). The Effect of Seed Cryopreservation on the Development of Protocorms by the Hybrid Orchid *Bratonia*. Russian Journal of Plant Physiology, Vol. 50, No. 5, 2003, pp. 672–677.

Preiss K, Adam IKU, Gebauer G (2010) Irradiance governs exploitation of fungi: fine-tuning of carbon gain by two partially mycoheterotrophic orchids. Proc R Soc B Biol Sci 277:1333–1336. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.1966>

Pujasatria GC, Miura C, Yamaguchi K, Shigenobu S and Kaminaka H (2024). Colonization by orchid mycorrhizal fungi primes induced systemic resistance against necrotrophic pathogen. Front. Plant Sci. 15:1447050. doi: 10.3389/fpls.2024.1447050

Ramirez S.R., Gravendeel B., Singer R. B., Marshall C. R. & Pierce N. E.,(2007). Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator, Nature, 448, 1042–1045.

Ramsay, M. M., & Stewart, J. (1998). Re-establishment of the lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain. Botanical Journal of the Linnean Society, 126(1-2), 173-181.

Rasmussen HN, Rasmussen FN. (2007). Trophic relationships in orchid mycorrhiza—diversity and implications for conservation. Lankesteriana 7(1-2): 334-341.

Rasmussen HN, Whigham DF. (1993). Seed Ecology Of Dust Seeds In Situ:A New Study Technique And Its Application In Terrestrial Orchids. American Journal of Botany 80(12): 1374-1378. 1993.

Rasmussen HN, Whigham DF. (2002). Phenology of roots and mycorrhiza in five orchid species differing in phototrophic strategy. New Phytologist 154: 797–807.

Rasmussen HN. (1995). Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant. Cambridge, UK: Cambridge University Press

Rasmussen ve Rasmussen 2009 ; Rasmussen, H. N and Rasmussen, F. N. 2009. Orchid mycorrhiza: Implications of a mycohagous life style. Oikos, 118, 334-345.

Rasmussen, H. N. (1992). Seed dormancy patterns in *Epipactis palustris* (Orchidaceae): Requirements for germination and establishment of mycorrhiza. Physiologia Plantarum, 86: 1, 161-167.

Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. Plant and Soil, 244, 149-163.

Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersakova, J., & Tesitelova, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. Annals of Botany, 116, 391-402.

Rajakaruna, N., & Boyd, R. S. (2014). Serpentine soils. *Oxford bibliographies in ecology*.

Redecker D., Kodner R., Graham L. E. (2000). Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* Vol 289 15 September 2000.

Reiter N, Phillips RD, Swarts ND, et al. (2020). Specific mycorrhizal associations involving the same fungal taxa in common and threatened *Caladenia* (Orchidaceae): implications for conservation. *Annals of Botany*, in press.

Reiter, N., Whitfield, J., Pollard, G., Bedggood, W., Argall, M., Dixon, K., Davis, B., Swarts, N., (2016). Orchid re-introductions: an evaluation of success and ecological considerations using key comparative studies from Australia. *Plant Ecol* 217:81–85

Ren, H., Jian, S., Liu, H., Zhang, Q. M., and Lu, H. F. (2014). Advances in the reintroduction of rare and endangered wild plant species. *Sci. China Life Sci.* 57, 603–609. doi: 10.1007/s11427-014-4658-6 *Rhizosphere*, 7, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.07.001>.

Rich MK, Schorderet M, Reinhardt D (2014) The role of the cell wall compartment in mutualistic symbioses of plants. *Front Plant Sci* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00238>

Richardson KA, Currah RS, Hambleton S.(1993). Basidiomycetous endophytes from the roots of neotropical epiphytic Orchidaceae. *Lindleyana* 8: 127–137.

Roberts, D. L., and Dixon, K. W., (2008). Orchids. *Current Biology*, 18(8), R325–R329. doi:10.1016/j.cub.2008.02.026.

Roy M, Gonneau C, Rocheteau A et al (2013) Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals in situ. *Ecol Monogr* 83:95–117. <https://doi.org/10.1890/11-2120.1>

Roy, A. R., Patel, R. S., Patel, V. V., Sajeev, S., & Deka, B. C. (2011). Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): An in vitro protocol for an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*, 128(3), 325–331. Sathiyadash vd., 2020

Sathiyadash K., Muthukumar T., Bala Murugan S., Sathishkumar R., Uma E., Jaison S., Priyadharsini P. (2013) In vitro asymbiotic seed germination, mycorrhization and seedling development of *Acampae praemorsa* (Roxb.) Blatt. & McCann, a common South Indian orchid. *Asian Pac J Reprod* 2:114–118.

Salazar, O., Schneider, J.H.M., Julian, M.C., Keijer, J., Rubio, V., 1999. Phylogenetic subgrouping of *Rhizoctonia solani* AG2 isolates based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia*, 91 (3) 459–467. Sambrook, J., Russell, D., W., 2001.

Sambrook, J., Russell, D., W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schiff, J. L. (2018). Rare and exotic orchids: their nature and cultural significance (pp. vii+-115). Springer International Publishing.

Selosse M. A., Setaro S., Glatard F., Richard F., Urcelay C., Weiß M. (2007). Sebacinale are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* (2007) 174: 864–878

Selosse M-A and Martos F. (2014). Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon? *Trends in Plant Science* 19, 683–685.

Selosse vd., 2017 Selosse, M. A., Minasiewicz, J., and Boullard, B. (2017). An annotated translation of Noel Bernard's 1899 article 'On the germination of *Neottia nidus-avis*.'. *Mycorrhiza* 27, 611–618. doi: 10.1007/s00572-017-0774-z

Selosse vd.2004; Selosse, M. A., Faccio, A., Scappaticci, G. and Bonfante, P. 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis micropHYlla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbial Ecology*, 47: 4, 416-426.

Selosse, M. A., Petrolli, R., Mujica, M. I., Laurent, L., Perez-Lamarque, B., Figura, T., ... & Martos, F. (2022). The waiting room hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes?. *Annals of Botany*, 129(3), 259-270.

Sezik, E. (2002). Turkish orchids and salep. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44(3), 151-157.

Sezik, E., (2014). Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ve Kalite. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Eczacılık ve ormancılıktaki Önemi Çalıştayı.

Sezik, E., İşler, S., Güler, N., Orhan, Ç., Aybeke, M., Deniz, İ. G., (2007). Salep ve Orkidelerin Tahribi, TÜBİTAK Projesi, TBAG-Ç.SEK/23 (103T008), Ankara (2007).

Shao S. C., XI, H. P., & Mohandass, D. (2019). Symbiotic mycorrhizal fungi isolated via ex situ seed baiting induce seed germination of *Dendrobium catenatum* Lindl.(Orchidaceae). *Applied Ecology & Environmental Research*, 17(4).

Shao, S. C., Burgess, K. S., Cruse-Sanders, J. M., Liu, Q., Fan, X. L., Huang, H., & Gao, J. Y. (2017). Using in situ symbiotic seed germination to restore over-collected medicinal orchids in Southwest China. *Frontiers in Plant Science*, 8, 888.

Shao, S. C., Luo, Y., & Jacquemyn, H. (2020). Co-cultures of mycorrhizal fungi do not increase germination and seedling development in the epiphytic orchid *Dendrobium nobile*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 571426.

Sharma SK, Tandon P. (1987). Axenic germination of some epiphytic orchid of Meghalaya, India. *Journal of the Orchid Society of India* 1: 85–90.

Singh L. P., Gill S. S., and Tuteja N.(2011). Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 6:2, 175-191; February 2011; ©2011 Landes Bioscience.

Smith, H.W. and Weldon, M.D. 1941. A comparison of some methods for the determination of soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 5: 177-182.

Smith, S. E., and Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Cambridge, UK: Academic Press.

Stark, C., Babik, W., & Durka, W. (2009). Fungi from the roots of the common terrestrial orchid *Gymnadenia conopsea*. *Mycological research*, 113(9), 952-959.

Steinfert U, Verdugo G, Besoain X, Cisternas M (2010) Mycorrhizal association and symbiotic germination of the terrestrial orchid *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) Johnst (Orchidaceae). *Flora* 205:811–817

Stenberg, M. L., & Kane, M. E. (1998). In vitro seed germination and greenhouse cultivation of *Encyclia boothiana* var. *erythronioides*, an endangered Florida orchid.

Stewart SL, Kane ME. 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: 147–158.

Stewart, S. L. and Kane, M. E. 2007. Symbiotic seed germination and evidence for in vitro mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43:3, 178-186. doi: 10.1007/s11627-006-9023-4

Stewart, S. L., L. W. Zettler, J. Minso and P. M. Brown. (2003). Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. *Selbyana* 55(10),64-70.

Stimart DP, Ascher PD. (1981). In vitro germination of *PapHiopedilum seed* on a completely defined medium. *Sci Hortic*, 14, 165–70.

Stöckel M, Meyer C, Gebauer G (2011) The degree of mycoheterotrophic carbon gain in green, variegated and vegetative albino individuals of *CepHalanthra damasonium* is related to leaf chlorophyll concentrations. *New PHYtol* 189:790–796

Suarez J. P. and Kottke I. (2016). Main fungal partners and different levels of specificity of orchid mycorrhizae in the tropical mountain forests of Ecuador. *Lankesteriana* 16(2): 299–305. doi: <http://dx.doi.org/10.15517/lank.v16i2.26014>.

Sungkumlong Deb CR (2008) Effects of different factors on immature embryo culture, PLBs differentiation and rapid mass multiplication of *Coelogyne suaveolens* (Lindl.) Hook. *Indian J Exp Biol* 46:243–248.

Swarts, N.D., and Dixon,K.W., (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany* 104: 543–556.

Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read DJ. (2002). Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: Van der Heijden MGA, Sanders I.R., eds. The ecology of mycorrhizas. ecological studies, Vol. 157. Berlin, Germany: Springer Verlag, 375–414.

Taylor DL, Bruns TD, Szaro TM, Hodges SA (2003). Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. Am J Bot 90:1168–1179.

Taylor, A. F. S., & Alexander, I. (2005). The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. Mycologist, 19(3), 102–112. doi:10.1017/s0269-915x(05)00303-4

Tedersoo L. and Bahram M. (2019). Mycorrhizal types differ in ecophysiology and alter plant nutrition and soil processes. Biological Reviews (2019) 000–000.

Tesitel J, Tesitelova T, Minasiewicz J, Selosse M-A (2018) Mixotrophy in land plants: why to stay green? Trends Plant Sci 23:656–659. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.05.010>

Tesitelova, T., Tesitel, J., Jersakova, J., Rihova, G., Selosse, M.-A. (2012) Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. American Journal of Botany, 99, 1020–1032.

Thixton, H. L., Esselman, E. J., Corey, L. L., and Zettler, L. W. (2020). Further evidence of *Ceratobasidium* D.P. Rogers (Basidiomycota) serving as the ubiquitous fungal associate of *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae) in the north American tallgrass prairie. Bot. Stud. 61:12. doi: 10.1186/s40529-020-00289-z

Tiwari, P., Sharma, A., Bose, S. K., & Park, K. I. (2024). Advances in Orchid Biology: Biotechnological Achievements, Translational Success, and Commercial Outcomes. Horticulturae, 10(2), 152.

Turan, 2018 Turan, E.S., (2018). Türkiye'nin İklim Değişikliğine Bağlı Kuraklık Durumu. Derleme / Review, Doğ Afet Çev Derg, 2018; 4(1), 63-69, DOI: 10.213247/dacd.357384

Urcelay C, Pasquini R, Cánovas S, Liébana V (2005) Colonización micorrizica en tres especies de orquídeas nativas de las Sierras de Córdoba, Argentina. Kurtziana 31:51–57

Utami E.S.W. and Hariyanto S. (2019) In Vitro Seed Germination and Seedling Development of a Rare Indonesian Native Orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J.Sm. Hindawi Scientifica, 2019 (810513). pp. 1-6. ISSN 2090908X .

Van der Ent A, Rajakaruna R, Boyd RS, Echevarria G, Repin R, Williams D (2015) Global research on ultramafic (serpentine) ecosystems (8th international conference on serpentine ecology in Sabah, Malaysia): a summary and synthesis. Aust J Bot 63:1–16

Van Waes JM, Debergh PC (1986a) Adaptation of the tetrazolium method for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of some Western European orchids. *PHysiologia Plantarum* 66, 435-442

Van Waes JM, Debergh PC (1986b) In vitro germination of some Western European orchids. *PHysiologia Plantarum* 67, 253-261

Van Waes, J.M. and P.C. Debergh (1986). In vitro germination of some western European orchids. *PHysiol. Plant.* 67:253–261.

Vitt, D.H. and W.-L. Chee. 1990. The relationships of vegetation to surface water chemistry and peat chemistry in fens of Alberta, Canada. *Vegetatio* 89: 87-106.

Wallander H., Nilsson L. O., Hagerberg D. and Baath E. (2001). Blackwell Science Ltd Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New PHYtologist* (2001) 151: 753–760

Wang, D., (2023). Orchid mycorrhizal interactions: evolutionary trajectories and ecological variations. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3619579>

Wang, Q. X., Shao, S. C., Su, Y., Hu X, Shen, Y., and Zhao, D. K. (2019). A novel case of autogamy and cleistogamy in *Dendrobium wangliangii*: a rare orchid distributed in the dry-hot valley. *Ecol. Evol.* 9, 12906–12914. doi: 10.1002/ece3.5772

Waud M., Brys R., Landuyt W. V., Lievens B., Jacquemyn H. (2017). Mycorrhizal specificity does not limit the distribution of an endangered orchid species. *Molecular Ekoloji* Volume 26, Issue 6, March 2017, Pages 1687-1701.

Warcup JH, Talbot PHB, 1967. Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids I. *New PHYtologist* 66: 631–641.

White, T.J, Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. (Editors: D.H. Gelfand, J. Sninsky, T.J. White), Academic Press, 315–322, San Diego.

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. Wraith and Pickering, 2019,

Willis, K. *State of the World's Plants*, 2017; Royal Botanic Gardens Kew: Richmond, UK, 2017

Wraith, J., Pickering, C., 2019. A continental scale analysis of threats to orchids. *Biol. Conserv.* 234, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.03.015>

Yam TW, Nair H, Hew CS, Arditti J (2002) Orchid seeds and their germination: An historical account. In: Kull T, Arditti J (eds) *Orchid biology: reviews and perspectives*, vol VIII. Kluwer, Dordrecht, pp 387–504

Yam TW. 1989. Conservation, ecology and propagation of the wild orchids of Hong Kong. PH.D. Dissertation, Department of Botany, University of Hong Kong.

Yam, T.W. and Arditti, J. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports* 3: 1–56

Yang, F. S., Sun, A. H., Zhu, J., Downing, J., Song, X. Q., & Liu, H. (2017). Impacts of host trees and sowing conditions on germination success and a simple ex situ approach to generate symbiotic seedlings of a rare epiphytic orchid endemic to Hainan Island, China. *The Botanical Review*, 83, 74-86.

Yeh, C. M., Chung, K., Liang, C. K., and Tsai, W. C. (2019). New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi. *Appl Sci* 9:585. doi: 10.3390/app9030585

Yoder JA, Zettler LW, Stewart SL (2000) Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Science* 156, 145-150

Yuan, Y.; Jin, X.; Liu, J.; Zhao, X.; Zhou, J.; Wang, X.; Wang, D.; Lai, C.; Xu, W.; Huang, J.; et al., 2017. The *Gastrodia elata* genome provides insights into plant adaptation to heterotrophy. *Nat. Commun.* 2018, 9, 1615.

Zelmer CD, Currah RS. 1997. Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occurring endophyte. *Lindleyana* 12: 142–148.

Zeng SJ, Wang J, Wu KL, et al. (2013). In vitro propagation of *PapHiopedilum hangianum* Perner & Gruss. *Sci Hortic*, 151, 147–56

Zeng SJ, Wu KL, Teixeira da Silva JA, et al. (2012). Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *PapHiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Sci Hortic*, 138, 198–209.

Zettler (1997), Zettler, J. T. 1997. Characterization of epitaxial semiconductor growth by reflectance anisotropy spectroscopy and ellipsometry. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 35: 1, 27-98.

Zettler LW, Sharma J, Rasmussen F. (2004). Mycorrhizal diversity. In: Dixon, K, Cribb, P, Kell, S, Barrett, R, eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia: Natural History Publications, 185–203.

Zettler, L. Z., Poulter, S. B., McDonald, K. I. and Stewart, S. L. 2007. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *HortScience*, 42, 135-139.

Zhang, Y.; Lee, Y.I.; Deng, L.; Zhao, S. Asymbiotic germination of immature seeds and the seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw., an endangered lady's slipper orchid. *Sci. Hortic.* **2013**, 164, 130–136.

Zhang S. , Yang Y., Li J. , Qin J. , Zhang W. , Huang W., Hu H. , 2018. PHysiological diversity of orchids. Plant Diversity Volume 40, Issue 4, August 2018, Pages 196-208

Zhao Da-Ke, Selosse M., Wu L., L. Y., Shao S.-C. and Ruan Y.-L. (2021). Orchid Reintroduction Based on Seed Germination-Promoting Mycorrhizal Fungi Derived From Protocorms or Seedlings. Frontiers in Plant Science • June 2021

Zhao, D.K., Selosse, M.A., Wu, L., Luo, Y., Shao, S.C., and Ruan, Y.L., (2021). Orchid Reintroduction Based on Seed Germination-Promoting Mycorrhizal Fungi Derived From Protocorms or Seedlings. Front. Plant Sci. 12:701152. doi: 10.3389/fpls.2021.701152.

Zi, X. M., Sheng, C. L., Goodale, U. M., Shao, S. C. and Gao, J. Y. 2014. In situ seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium apHyllum* (Orchidaceae). Springer, 24: 7, 487–499. doi:10.1007/s00572-014-0565-8

Zimmer K, Meyer C, Gebauer G (2008) The ectomycorrhizal specialist orchid *Corallorhiza trifida* is a partial myco-heterotroph. New Phytol 178:395–400. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02362.x>

Zotz, G., 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes a critical update. Bot. J. Linn. Soc. 171 (3), 453–481. <https://doi.org/10.1111/boj.12010>.

ÖZ GEÇMİŞ

Hamdiye Şehirli Rize Lisesi'ni bitirdikten sonra 19 Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi'nden 1994 yılında mezun oldu. 1998 yılında OMÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans programını bitirdi. 1998 yılından beri Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğünde çalışmaktadır. Orta derecede İngilizce bilmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : [orcid.org/ 0000-0003-1053-0817](https://orcid.org/0000-0003-1053-0817)

Yayınlar:

1. Şehirli Hamdiye, 1998 Akgöl (Terme-Samsun) fitoplanktonunun kompozisyonu ve mevsimsel değişimi üzerine bir araştırma. Danışman Arif Gönülol. Yüksek lisans tezi.
2. Elif Ersanli, Arif Gönülol, Hamdiye Şehirli & Özgür Baytut (2006). The PHYtoplankton of Lake Akgöl, Turkey, 21:3, 523-525.
3. Vildan Akın Mutlu Hamdiye Şehirli Yasemin Özden Kömpe (2020). *Serapias Orientalis*'in Mikorizal Fungus Çeşitliliği. Artvin Çoruh Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi ISSN:2146-1880, e-ISSN: 2146-698X Yıl: 2020, Cilt: 21, Sayı:2, Sayfa: 301-309
4. Şehirli H. 2024. *Camellia sinensis* (L.) (KUENTZ.) Bitkisinin Budama Artığı Yaşlı Yaprakları ve Üretim Atığı Çöpten Kafein Elde Edilmesi. Konferans Ulusal Çay Konresi,2024.
5. Şehirli H., Kömpe Y.Ö. 2023. *Camellia sinensis* (L.) O.KUNTZE) Çiçeklerinden Elde Edilen Çayın Duyusal Karakterleri Üzerine Bir Çalışma. 6. International AgricultureEnvironment, Healt Kongress 2023
6. Şehirli H., KÖMPE Y. Ö. 2023. *Dactylorhiza nischalciorum* İn Vitro Tohum Çimlenmesi İçin Alternatif yollar. 6. International AgricultureEnvironment, Healt Kongress 2023.
7. Aytar E.C., Şehirli H., Harzlı I., Köme Y.Ö., 2022. Ex Vitro Symbiotic Germination of *Gymnadenia conopsea* Seeds. IConPB 2022 3. International Congress on Plant Biology DOI:10.13140/RG.2.2.25923.07206.

8. Şehirli H., Aytar E. C., Çökmez B., Mutlu V. A., Şentürk B., Kömpe Y. Ö.,2022. Ex Vitro Symbiotic Germination of Endemic *Dactylorhiza osmanica subsp. osmanica*. IConPB 2022 3. International Congress on Plant Biology.poster bildiri.
9. Şehirli H., Kömpe Y. Ö., Mutlu V. A. 2022. Effect of Drought on *Camellia sinensis* Shoot Growth IConPB 2022, 3. International Congress on Plant Biology. Poster bildiri
10. Şehirli H., Y. Ö. Kömpe 2024. *Camellia sinensis* var. *sinensis* (L.)(Kuentz.) Bitkisi Çiçeği Çayının Kimyasal Özellikleri, İnsan Sağlığına Faydaları Ve Preparasyonunun Hazırlanması Üzerine Bir Çalışma. Sözlü bildiri. 7. International AgricultureEnvironment, Health Kongress 2023
11. Yazıcı K., Polat A., Haznedar A., Ilgaz Ş., Akbulut M., Şavşatlı Y., Kalkışım Ö., Turan C., Dinçer D., Eminoğlu A., Beriş F.Ş , İzmirli Ş.G. , Kalcıoğlu Z., Sekpan R., İnce Ö.,Tanyel G., Şehirli H., Karaoğlu B.G., Bakoğlu N., Aydın M.Z., Akbulut S., Tekiner N., Müezzinoğlu N., Türüt R., Çelik H.B.2024. Türkiye Ulusal Çay Gen Havuzunun Kurulması. Ulusal Çay Kongresi –Rize, 2024.
12. Polat A., Haznedar A., Kalcıoğlu Z., Müezzinoğlu N., Tekiner N., Turan C., Çelik H.B. , Tanyel G., İnce Ö., Ilgaz Ş., Sekpan R., Şehirli H., Akbulut S., Türüt R., Yazıcı K., 2024. Türkiye’de Selekte Edilen Çeşit Adaylarının Siyah, Yeşil Ve Oolong Çaya Uygunluğunun Tartılı Derecelendirme Ve Biyokimyasal Parametrelere Göre Değerlendirilmesi. Türkiye Ulusal Çay Gen Havuzunun Kurulması. Ulusal Çay Kongresi –Rize, 2024.