

3996

ORKİDELERDE MİKORİZAL FUNGUSLARIN ORKİDE
TOHUMLARININ ÇİMLENMESİ VE BÜYÜMELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Fatma VAKKASOĞLU

Ç.Ü.
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADANA
ŞUBAT, 1995

Bu tez Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KÜTÜPHANE

Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma jürimiz tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan: Prof.Dr. Mehmet Biçici



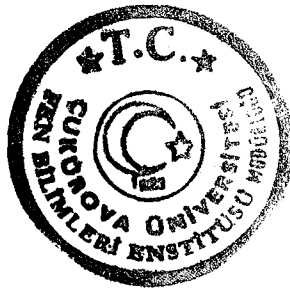
Üye: Prof.Dr. M.Asil Yılmaz

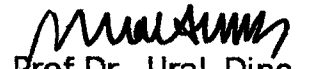


Üye: Y.Doç. Ali Erkiliç

Kod No: 917

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu
onaylarım.




Prof.Dr. Ural Dinç
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÇİZELGE LİSTESİ.....	I
ŞEKİL LİSTESİ.....	II
RESİM LİSTESİ.....	III
ÖZ	IV
ABSTRACT.....	V
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3. 1. Orkide Türlerinin Belirlenmesi.....	16
3. 2. Orkide Tohumlarının Elde Edilmesi.....	16
3. 3. Fungusların İzolasyonu.....	17
3. 3. 1. Bitki Materyalinden Fungus İzolasyonu.....	17
3. 3. 2. Toprakta Fungus İzolasyonu.....	17
3. 4. <i>Rhizoctonia</i> spp.'nin Tür Teşhislerinin Belirlenmesi.....	19
3. 5. <i>Rhizoctonia</i> spp.'nin Orkide tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	20
3. 5. 1. Laboratuvar Çalışmaları.....	20
3. 5. 2. Saksı Çalışmaları.....	22
3. 5. 3. Petrilerde Çimlenen Tohumlardan Gelişen Fidelerin Saksılara Taşınması.....	23
3. 6. Tohumların Çimlendirilmesinde Kullanılan Çözeltiler	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	25
4. 1. Doğu Akdeniz Bölgesindeki Orkide Türlerinin Belirlenmesi....	25
4. 2. Tohum Elde Edilen Orkide Türleri.....	27
4. 3. Fungus İzolasyonları.....	28
4. 3. 1. Bitki Materyalinden İzolasyonlar.....	28
4. 3. 2. Şekerpancarı Tohumu Tuzaklama Yöntemi İle Toprakta Fungus İzolasyonu.....	28

4. 3. 3. Toprak Kalıntı Yöntemi İle Orkide Rizosfer Toprağından Fungus İzolasyonu.....	29
4. 4. <i>Rhizoctonia</i> spp.'nin Tür Tanımları.....	30
4. 5. Orkide Tohumları Çimlendirme Denemeleri.....	30
4. 5. 1. Laboratuvar Çalışmaları.....	30
4. 5. 2. Saksı Denemeleri.....	36
4. 6. Petrilerde Çimlenen Tohumlardan Gelişen Fidelerin Saksılara Taşınması	37
5. TARTIŞMA.....	38
ÖZET.....	42
SUMMARY.....	44
KAYNAKLAR.....	45
TEŞEKKÜR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	50



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No

Sayfa No

1. Tesbit Edilen Orkide Türleri ve Toplandığı Bölgeler.....25
2. Orkide Türleri ve Rizosferlerinde İzole Edilen Fungus Grupları.....29
3. Fungal İzolatlarla İnokule Edilen Orkide Türleri.....34
4. *Orchis coriophora*'nın Farklı İnokulum Miktarlarına Göre Hazırlanmış Saksılardaki Tohum Ölçümler (mikron).....36



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No

Sayfa No

1. Orkide Türlerine Ait Çimlenme Süreleri.....34
2. Orkide Türlerine Ait Çimlenme Yüzdeleri.....35



RESİM LİSTESİ

Resim No	Sayfa No
1. Rhizoctonia spp. 'nin tür teşhisinde kullanılan toprak ekstrakt(a), PYDA(b) ve fungusitli agar(c) yöntemleri.....	21
2. Çiçek döneminde <i>Ophrys transchyrana</i> fidesi.....	26
3. Yapraklı dönemde <i>Ophrys vernixia</i> fidesi.....	26
4. <i>Orchis coriophora</i> tohumlarından fide oluşumu.....	32
5. <i>Ophrys vernixia</i> tohumlarından fide oluşumu.....	33



ÖZ

Bu araştırma Doğu Akdeniz bölgesindeki salep orkidelerinde mikorizal fungusların izolasyonu ve bu fungusların salep tohumlarının çimlenmesi ve büyümesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bölgede *Anacamptis*, *Epipactis*, *Himantoglossum*, *Ophrys*, *Orchis* ve *Serapias* cinslerine ait 14 orkide türü tesbit edilmiştir. Ayrıca bu türlerin rizosfer topraklarından izole edilen fungus grupları belirlenmiştir. Salep rizosferinden izole edilen fungusların *Absidia* sp., *Fusarium* spp., *Macrophomina* spp., Pythiaceae funguslar, *Rhizoctonia solani* ve *Trichoderma* spp. oldukları tesbit edilmiştir. Saptanan orkide türleri içinde *Ophrys vernixia*, *Orchis coriophora* tohumları *Rhizoctonia solani* 'nin varlığında fide oluştururken *Orchis anatolica* 'da gelişme sadece protokorm oluşumu ile sınırlı kalmıştır.

ABSTRACT

The goal of this study was to isolate mycorrhizal fungi from the salep orchids grown in the Eastern Mediterranean region and to determine the effects of these fungi on the germination and development of seeds of salep orchids. *Absidia*, *Fusarium*, *Macrophomina*, Pythiaceae fungi, *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* were isolated from the rhizosphere of Orchids. Seeds of *Ophrys vernixia* and *Orchis coriophora* germinated and showed some seedling development in the presence of *Rhizoctonia solani*. However the presence of *Rhizoctonia solani* stimulated the germination of *Orchis anatolica* but no seedling development observed.



1. GİRİŞ

Salep orkideleri ülkemizin bir çok bölgesinde doğal olarak yetişmekte olup yumrularından gıda ve ilaç sanayinde hammadde olarak kullanılan "salep" elde edilmektedir. Bu bitkiler, en geniş bitki familyalarından biri olan ve yaklaşık 20.000 kadar orkide türünü kapsayan Orchidaceae içinde yer almaktadır. Salep orkidelerinin ülkemizde en yaygın olarak bulunduğu bölgeler, Kuzey Anadolu (Kastamonu), Güney Anadolu (Kahramanmaraş, Adıyaman, Malatya) ve Doğu Anadolu (Van, Muş, Bitlis)' dir (BAYTOP ve SEZİK, 1968).

Türkiye, Avrupa ve kendi konumundaki bölgelerin en zengin orta kuşak orkidelerine sahip olup, bundan daha 9-10 yıl öncesine kadar yılda 15 tona kadar salep ihraç ettiği bildirilmektedir. Yine geriye bakıldığında 1700 yıllarında Muğla, Milas, Kastamonu yörelerinde yetişen "Levant Salebi" nin İzmir'den ihraç edildiği kayıtlarda yer almaktadır (SEZİK, 1984).

Salep yukarıda adı geçen bölgelerde yaygınlık gösteren orkidelerden , yumrulu olanlarından elde edilmesine karşın tüm yumrulu cinsler salep elde edilmesi için uygun değildir. Salep daha çok *Anacamptis*, *Barlia* , *Himantoglossum*, *Ophrys*, *Orchis*, *Serapias* gibi ovoit yumrulu olanlarla *Dactylorhiza* gibi parçalı yumruya sahip orkidelerin değişik türlerinden elde edilmektedir. Türkiye'de Orchidaceae familyasına bağlı 18 cins ve 91 orkide türünün bulunduğu (BAYTOP ve SEZİK, 1968), bunlardan ise sadece 6-7 cinse bağlı türlerin salep amacıyla kullanılabileceği belirtilmiştir (SEZİK, 1984).

Türkiye'nin bu şekilde iyi bir salep potansiyelini sürdürmesi ancak doğal orkide populasyonlarının devamı ve korunmaları ile

mümkündür. Çünkü bu bitkilerin tohumlarının çimlenme güçlükleri, çiçeklenmenin uzun yıllar alması ve tozlanmada böceklerle olan bağımlılık orkidelerin doğadaki yaşamlarını oldukça duyarlı bir konuma getirmiştir.

Orkideler, çok yıllık otsu bitkiler olup toprak altında kışı geçirmesini sağlayan birincil bir yumru, ek köklerden birinin kalınlaşmasıyla oluşan ikincil bir yumru oluştururlar. Bu ikincil yumrulara rizom da denir. Salep maddesi bu ikinci yumrulardan elde edilmektedir. Salep orkidelerinin başında gelen *Dactylorrhiza Ophrys* ve *Orchis* cinsine ait yumruların gelişme süresi ortalama 2-4 yıl olmakla beraber bu süre *Neottia* cinsine ait bazı türlerde 9 yıla kadar çıkabilmektedir (SEZİK, 1984).

Bir orkide kapsülünde ortalama 0.01 mg'dan daha hafif ağırlıkta olan milyonlarca tohum bulunmaktadır. Tohumlarda embriyo gevşek yapılı, kalın duvarlı ağ benzeri bir testa içerisinde bulunmakta olup, endosperme sahip değildir (INGOLD and HUDSON, 1993). Çoğalma kapasiteleri son derece sınırlı olan ve endosperm taşımayan salep orkide tohumlarının çimlenebilmesi için uygun sıcaklık, ışık, nem ve oksijenin yanı sıra, ortamda uygun bir mikorizal fungus ile mikorizal bir ilişki oluşturabilme gereği vardır (SEZİK, 1984). Çünkü orkide tohumlarının besin rezervleri içermemelerinden dolayı, glikoz gibi dışarıdan bir karbonhidrat kaynağı sağlanmadıkça başarılı bir çimlenme gerçekleşmez (INGOLD and HUDSON, 1993). Mikoriza terimi "simbiyotik" bir ilişkiyi ifade etmekte olup, bu ilişki de fungus topraktaki karbon kaynaklarını kullanarak orkide tarafından kullanılabilir hale gelmesini sağlar. Bitki ise fungusun canlılığını devam ettirebilmesi için ona su ve mineral maddeleri sağlar. Bu açıdan doğada orkideler gelişmelerinin bazı aşamalarında mikorizal funguslara bağımlıdır.

Yeşil yapraklı orkidelerde bu bağımlılık fide dönemi ve çimlenmeyle sınırlandırılabilirken, klorofile ihtiyaç duyan orkidelerde (*Corallorhiza*, *Galeola* ve *Neottia*) bu bağımlılık orkidenin tüm yaşamı boyunca devam eder. Bu ortaklıktaki ilgili fungus, genellikle Steril mycelia 'nın bir cinsi olan *Rhizoctonia*' dır. *Rhizoctonia* cinsine dahil türlerin çoğu toprakta serbest yaşayan, rekabetçi saprofitler olarak bilinir. Ayrıca bu türlerin bir çoğunun diğer konukçularda saldırgan nekrotrofik parazitler olduğu gösterilmiştir (INGOLD and HUDSON, 1993).

Rutubetli topraklarda orkide tohumları suyu emerek yavaşça şişer. Daha sonra tohum kabuğu çatlayarak birkaç epidermal tüy çıkartır. Bu aşamada uygun bir mikorizal fungus tarafından infeksiyon gerçekleşmediği takdirde tohum daha fazla bir gelişme göstermez. İnfeksiyonu takiben fide büyümesi teşvik edilir. Fungus, vaskular iletim demetlerini çevreleyen dış parankima hücrelerine sınırlanır. Yeni oluşan kökler gelişmelerine paralel olarak topraktaki fungusla sırayla infekte edilirler. Fungus sadece kökün parankimatik kortikal hücrelerinden bitkiye girer. Bunun sonucu kortikal hücreler yoğun bir intersellüler hif kitlesi ile dolar. Konukçu hücrelerin membranları penetre edilmez. Fakat hifsel yapılar devamlı olarak konukçu hücrelere nüfuz ederek yoğun biçimde hücre membranlarını sararlar. Böylece geniş bir konukçu-fungus ara yüzeyi oluşturulur. Zamanla bu hifler şişerek içeriklerini kaybederler ve açıkca konukçu tarafından şekilsiz, karmaşık bir yapı haline yıkılırlar. Bu durum, dengesiz bir parazitizm sonuçlar. Bu gibi fungus infeksiyonunun gerçekleşmediği durumlarda birçok orkide fidesinin öldüğüne dair kanıtlar vardır. Diğer yandan fungus nekrotrofik bir parazit olarak orkide bitkisini öldürerek fide içerisinde büyür. İyi bir şekilde gelişen fidelerde ise

orkide fidesi ve fungus arasında dengeli bir ilişki kurulur. Bu ilişkide fungus topraktaki kompleks karbon kaynaklarını kullanarak genç orkide bitkiciğı tarafından elde edilebilir hidrolitik ürünler sağlar. Burada topraktan konukçuya geçen hif muhtemelen fungal şeker trehalose formundaki organik karbonun direkt olarak konukçuya transferini sağlar. Trehalose birçok orkide fidesinin asimbiyotik gelişimi için uygun bir karbon kaynağına dönüşür. Buna ek olarak orkide, hifsel yapıların periodik yıkımlarıyla bazı organik besinler elde edebilir. Bununla birlikte orkide bitkisinin fungusu lise etmesinin tam bir parazitik istilaya karşı aktif genel bir savunma mekanizması olduğu muhtemeldir. Fungusdan konukçuya olan organik karbonun hareket oranı ve düzeyi açısından translokasyonun transfer için esas bir yol olduğu ortaya konulmuştur (INGOLD and HUDSON, 1993).

Herhangi bir orkide bitkisi fotosentetik olana kadar fungusun sağladığı organik besinlere muhtaçdır. 2-10 yıl veya daha uzun sürede fotosentetik yapraklar üretilinceye kadar uzun bir fide dönemi geçebilir. Bu uzun fide döneminde orkideler yeşil renk oluşturuncaya kadar heterotrofik yaşarlar, yeraltında bulunurlar ve mikorizal ilişkide bulunmaları zorunludur (INGOLD and HUDSON, 1993).

Dengeli bir ortaklıkta bu dönem esnasında fungusdan orkideye doğru mineral besin ve organik karbonun akımı söz konusudur. Fungus bundan yarar sağlamaz. Bu dönemde bu beraberlik orkidenin fungusu parazitlediği parazitik bir simbiyosis olarak görülmelidir. Yetişkin yeşil orkide ve onun mikorizal fungusu arasındaki ilişkinin yapısı pek açık değildir. Konukçudan fungusa fotosentez sonucu elde edilen maddelerin herhangi bir hareketi henüz gösterilmemiş olsa da birçok orkide bitkisinde diğer

mikorizal sistemlerde olduğu gibi orkideler her yıl geliştikçe onların kök korteksleri enfektelenir. Yetişkin yeşil orkidelerin fungusdan mineral besin aldığının herhangi bir kanıtı yoktur. Belki de kök infeksiyonu kaçınılmazdır. Çünkü mikorizal fungus kök paraziti olarak agresifdir. Ancak orkideden fungusa karbonun karşılıklı bir değişiminin olma ihtimali gözardı edilemez (INGOLD and HUDSON, 1993).

Bütün bu bilgilere rağmen dünyada ve Türkiye'de salep orkideleri ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Ülkemizde bu konu ile ilgili çalışmalar, salep orkidesi yetişen bölgelerdeki türlerin saptanmasıyla sınırlı kalmıştır.

Bunun yanında ülkemizde salep üretimi için doğal orkide vejetasyonları aşırı toplanarak devamlı bir şekilde baskıya yöneliktir. Bu nedenle özellikle salep orkide türlerinin ülkemiz ekolojisinden bir zaman sonra yok olmaları bir olasılıktan ziyade kesindir. Çünkü doğal olarak büyüyüp gelişen bu türlerin koruma altına alınmaları veya kültüre alınabilme olanaklarının araştırılması bir yana, halihazırdaki dondurma ve salep yapımı için iç pazarın, ve ihracat amacıyla dış pazarın ihtiyaçları nedeniyle aşırı toplanmalarının önlenmesi bile düşünülmemektedir.

Bu çalışmada ülkemiz ekonomisi ve ekolojisi açısından önemli bir konuma sahip olan salep orkideleri ile mikorizal ilişki oluşturan fungusların belirlenmesi ve bu fungusların orkide tohumlarının çimlenmesi ve büyümesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Orkide bitkileri her kapsülde muazzam miktarda küçük milyonlarca tohum üretirler. Her bir tohum 0.01mg'dan daha hafiftir. Embriyo 10-100 hücreden ibaret olup endosperm içermezler. Endosperme sahip olmayan orkide tohumları dışarıdan bir karbonhidrat kaynağı olmadan çimlenme kapasitesinde değildirler. Bu nedenle salep orkidelerinin çimlenebilmesi için uygun çevre şartları yanında ortamda uygun bir fungus tarafından tohumun infekte edilmesi gereklidir. (HUDSON, 1986; GARRETT, 1981; INGOLD and HUDSON, 1993).

Kayıtlarda bir çok orkide türüne ait tohumların çimlendiği bildirilmiştir. Bu da orkidelerin çimlenme kapasitesinde canlı tohumlar ürettikleri gerçeğini göstermektedir. Ancak 1824'ler de her zaman tohum çimlenmesine refakat eden bir fungus varlığı Link adlı araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. 1840'da Link, *Goodyera repens*' in kök hücrelerinde bir fungusun varlığını saptamıştır. *Monotropa hypopitys*' in köklerinde fungus varlığı 1842'de, *Neottia nudus-avis*, *Gymnodenia viridis*, *Orchis morio* köklerinde ise 1846'da fungus varlığı ortaya konulmuştur. Bu çalışmaların sonrasında 500 orkide türünün köklerinin incelenmesiyle mikoriza kesinlik kazanmıştır (ARDITTI, 1967).

Noel Bernard adlı araştırmacı 1899'da tüm orkide fidelerinin bir fungus tarafından infekte edildiğini ve fungal infeksiyonun çimlenme için gerekli olduğunu düşünmüş, daha sonra da bu fungusu izole ederek bu görüşünü ispat etmeyi başarmıştır. Sonraki gözlemler tropikal epifitik orkidelerin çimlenebilmeleri için bir fungus infeksiyonuna gereksinim duyduklarını göstermiştir. Orkidelerin mikorizal ortakları üzerinde yapılan bu gözlemleri

fungus araştırmaları takip etmiştir. Fungusların orkide tohumları, orkide fideleri ve olgun bitkiler üzerine etkileri konusunda çalışmalar yapılmıştır. Orkidelerle mikorizal ilişki içinde olan bu funguslar ayrı bir grup olarak kabul edilmiş ve bu gruba "Orchenomyces" ismi verilmiştir. Ancak daha sonraki çalışmalar, orkidelerle mikorizal ilişki kuran bu fungusların diğerk bitkilerde nektrotrofik parazit olarak yaşadıklarını göstermiştir. Orkide köklerinden izole edilen funguslar *Rhizoctonia*, *Corticium*, *Armillaria*, *Fomes*, *Hymenochaeta* olarak tesbit edilirken *Phytophthora*, *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Trichoderma* cinslerinin çimlenmeyi başlatıcı ve teşvik edici oldukları bildirilmiştir (ARDITTI, 1967).

Tohum imlenmesi için geliştirilen bir yöntemde, kültür tüplerine konulan tohumlar fungusla inokule edilmiştir. Ancak inokulasyonun yapıldığı tüplerde çimlenmenin çok iyi olmasına rağmen yapılan 15 bin denemenin sadece birkaç yüzünde başarılı çimlenmenin gerçekleşmesi bu yöntemin uzun zaman benimsenmemesine neden olmuştur (ARDITT, 1967).

Yapılan çalışmalarda orkide tohumlarının çimlenmesine refakat eden en genel fungusun perfect dönemi Basidiomycetes sınıfına dahil *Rhizoctonia* yeleri olduğu saptanmıştır. Ayrıca *Corticium*, *Ceratobasidium* ve *Tulasnella* orkide tohumlarına refakat eden cinsler olup toprakta hızlı bir şekilde gelişerek diğerk toprak saprofitleri ile başarılı bir şekilde rekabet edebilirler. Ağaçların kök paraziti olarak bilinen *Armillaria mellea*'nın achlorophyllous orkideler ile mikorizal birlik oluşturduğu ve aynı fungusun achlorophyllous orkide olan *Gastrodia elata* ve *Galeola septentrionalis* ile mikorizal birlikler oluşturduğu saptanmıştır (HUDSON, 1986).

KNUDSON (1929), orkide tohumlarının çimlenebilmesinde fungusların fonksiyonunu açıklayarak fungusların nişasta, peritosan ve azot maddelerini parçalamak ve büyümeyi teşvik eden bileşikleri üretmek suretiyle tohum çimlenmesini teşvik ettiğini açıklamıştır. Bu nedenle orkide tohumlarının çimlenebilmesi için kesin olarak fungus varlığına ihtiyaç duymadıkları kanısına varılmıştır. Bu çalışmada özel biçimde hazırlanan çeşitli mineral maddeler ve şeker içeren besin ortamı orkide tohumlarının çimlenmesini sağlamıştır.

Fungusların bitki ile temas kurduktan sonra topraktaki kompleks karbon kaynaklarını kullanarak genç orkideler için kullanılabilir hidrolisiz ürünleri oluşturduklarını gösteren güçlü kanıtlar bulunmuştur. Bu konuda tohumlar nemli filtre kağıdı üzerine yerleştirildiğinde çimlenme kaydedilmezken bu filtre kağıdı uygun bir *Rhizoctonia* ile inokule edildiğinde tohumlarda gelişme gözlenmiştir. Filtre kağıdı üzerinden fungus yapıları yıkandığında trehalose ve mannitol gibi fungal karbonhidratlar, glikoz ve selüloz gibi hidrolitik ürünleri içerdiği tesbit edilmiştir. Buradan bu fungusların hidrolisiz ile selüloz gibi polimerlerden arta kalan şekerleri yaydıkları, böylece bu şekerlerin orkide tarafından direkt absorpsiyon ile dış ortamdan alınabildiği sonucu çıkarılmıştır (HUDSON, 1986).

BUCZACHI (1989), çiçekli bitkiler arasında en küçük tohuma sahip olan orkidelerin hemen hemen hiç besin rezervine sahip olmadığını bildirmiştir. Ancak genç fidelerin köklerinin topraktaki fungal miselyum ile infekte edilerek bu miselin genç fideye besin sağladığı sonucuna varmıştır. Aynı araştırmacı yaprak ve diğer yeşil dokusu olmayan, bu nedenle fotosentez yapamayan orkidelerin fungal miselyum sayesinde saprofitik olarak yaşamlarını

sürdürdüğünü ileri sürmüştür. Bazı orkide türleri bu şekilde fungal ortaklarına besin yönünden devamlı olarak bağımlı yaşarken fotosentez yapan orkidelerde fungus rolünün bitki olgunlaştıkça azaldığı ortaya konulmuştur.

GARRETT (1981), orkide fidelerinin tamamen fotosentetik olana kadar fungal ortak üzerine olan bağımlılıklarını orkide tohumlarının çok küçük olmasından kaynaklandığına bağlamıştır.

Uygun bir habitatda çimlenen orkide tohumları arasında yalnızca bir kısmının uygun bir *Rhizoctonia* türü ile dengeli bir ilişki kuracağı belirtilmiştir. Bazı orkide-fungus mikorizal ilişkilerinde fungusun inokulum potansiyeli çok yüksek olacağından fide parazitlenerek ölecek, diğer bazı durumlarda ise fidenin savunma reaksiyonunun çok güçlü olmasından dolayı infeksiyon girişimi bitki tarafından geri çevrilecektir (GARRETT, 1981; HUDSON, 1986).

SEZİK (1984), fungusun önce orkide tohumuna parazit yaşamak üzere hücum ettiğini daha sonra tohum hücreleri tarafından bu hücumun durdurularak dengeli bir ilişkinin oluştuğunu belirtmiştir.

HACSKAYLO (1969); mikorizanın genelde ektomikoriza ve endomikoriza olmak üzere ikiye ayrıldığını, ektomikorizanın daha çok çalışılmış olmasına rağmen en yaygın tip olmadığını belirtmiştir. Pinaceae, Fagaceae ve Betulaceae üyelerinin hemen hemen hepsi ektomikorizal iken, Salicaceae, Juglandiaceae, Tiliaceae, Myretaceae ve Caesalpinaceae gibi birçok Angiosperm familyalarının ekto ve endomikorizal türlere sahip oldukları saptanmıştır. Bu ayrımda endomikoriza, bölmeli funguslar tarafından üretilenler ve bölmesiz funguslar tarafından üretilenler olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Bölmeli funguslar tarafından

üretilemler Orchidaceae, Gentianaceae ve Ericales üzerinde oluşurken, bölmesiz funguslar tarafından oluşturulan endomikoriza genelde phycomycetous veya vesikular-arbuskular mikoriza olarak ifade edilmiştir. Bunların birçok bitki üzerinde oluştuğu bildirilmiştir.

BEYRLE ve ark. (1985), çalışmalarında *Dactylorrhiza maculata* tohumlarının, orkide köklerinden izole ettikleri *Rhizoctonia stahlii*' nin varlığında çimlendiğini, protokorm oluşumunun 2 haftada gerçekleştiğini, daha hızlı bir gelişmenin 12 haftalık bir soğuk uygulamasıyla ortaya çıktığını tesbit etmişlerdir.

CURRAH (1986), *Calypso bulbosa*' yı doğadan toplayarak kök segmentlerini iç korteksten ayırmıştır. Suda yumuşattığı kök parçalarını modifiye edilen Melin-Norkan ortamı (MMN-Marx, 1969) içinde inkübe ettikten sonra patates dekstroza agara (PDA) transfer ettiği hiflerin *Thanatephorus pennatus* olduğu sonucuna varmıştır.

CURRAH ve ark. (1989), yukarıdaki çalışmalarını daha genişleterek *C. bulbosa* 'nın mikorizal funguslarını araştırmak üzere ilerletmişlerdir. Çalışmalar bu orkide türünün hem herbaryum, hem de taze materyali üzerinde sürdürülerek *Rhizoctonia* izolatları izole edilmiştir. Bu izolatlardan sadece *Thanatephorus pennatus* basidium ve basidiosporlar üretmiştir.

TSUTSUI ve TOMITA (1988), 10 orkide bitkisinin 4' ünden izole ettikleri 7 *Rhizoctonia* izolatı ile *Spiranthes sinensis*' in simbiyotik ilişkisini yulaf ortamı üzerinde denemişlerdir. Bu orkideler arasında *Gymnadenia conopsea*' den elde edilen Rh AG-C izolatının bu orkide türüne en yüksek derecede simbiyont olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada *S. sinensis*' den elde edilen muhtemelen iki nukleuslu *Rhizoctonia repens* türünün bu

orkideye çok az simbiyont olduğunu bulunmuştur. Bu 2 *Rhizoctonia* izolatının etki bakımından aralarında önemli bir fark olduğuna ayrıca dikkat çekilmiştir.

DIJK (1987), bazı Avusturya orkidelerinden *Tulasnella calospora*, *Thanatephorus cucumeris* ve *Ceratobasidium cornigerum*' u izole ederek, bu fungusların bazı orkidelerde protokorm gelişimini teşvik ettiklerini saptamıştır.

SMRECIU ve CURRAH (1989), *Amerorchis rotundifolia*, *Calypso bulbosa*, *Coeloglossum viride*, *Corollorhiza maculata*, *Platanthera dilatata*, *P. hyperborea* ve *P. obtusata* orkide türlerinin mikorizaları üzerine yaptıkları çalışmada *Rhizoctonia* cinsine ait izolatlar elde etmişlerdir. Bu elde ettikleri izolatlardan birini *Rhizoctonia repens* olarak teşhis etmişlerdir. Diğer izolatlar ise *Ceratobasidium obscurum*, *Rhizoctonia anaticula*, *Phialocephala fortinii*, *Leptodontidium orchidicola* ve kültürel özellikleri bakımından *Rhizoctonia* 'ya benzeyen, sporlanan *Trichosporiella multisporum* olarak belirlenmiştir.

MASUHARA ve KATSUYA (1989), *Spiranthes sinensis* var. *amoena*, *Ponerorchis graminifolia* ve *Bletilla striata* karasal orkidelerinin erken gelişme ve çimlenmeleri üzerine fungusların etkisini araştırmak üzere yaptıkları çalışmalarda 2 yabani, 4 kültür orkidesinin kök ve protokormlarından *Rhizoctonia repens* ve diğer bazı *Rhizoctonia* izolatlarını izole etmişlerdir. Bu izole edilen funguslarla, yukarıda adı geçen orkidelerin tohumları yulaf ortamı üzerinde çimlendirme denemelerine tabi tutulmuştur. Çalışmanın sonucunda fungusların bulunduğu ortamda *S. sinensis*' in protokorm gelişiminde ve çimlenmesinde gelişme gözlenirken, *P. graminifolia* 'da bu gelişmeler daha geç gerçekleşmiştir. Araştırmacılar, simbiyotik ilişkinin bu 2 orkide türünü olumlu

etkilerken *B. striata* 'nın protokorm gelişimine etkili olmadığı sonucuna varmışlardır.

Aynı şekilde CLEMENTS ve ELLYARD (1979), simbiyotik ilişkilerin bazı Avusturalya karasal orkidelerinin çimlenmesinde etkili iken *Cypripedium* ve *Platanthera* gibi cinslere ait bazı orkidelerde olgun tohumların çimlenmelerini teşvik etmediklerini bildirmişlerdir.

TSUTSUI ve TOMITA (1988), *Spiranthes sinensis* , *Liparis nervosa* , *Epidendrum ibaguense* , *Amitostigma kinoshitae* ve *Habenaria radiata* türlerine ait orkide tohumlarının çimlenmeleri üzerine, 10 orkide türünün mikorizasından elde ettikleri 32 *Rhizoctonia* izolatının teşvikini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan izolatların birinci grubunu iki nukleuslu *Rhizoctonia* 'lar (B grubu), ikinci grubunu ise *R. repens* 'in (R grubu) streynleri oluşturmuştur. Araştırmacılar bu çalışmayı yaparken başarılı ve pratik olmak için her orkide türü ile en uygun simbiyontun birleştirilmesini önemle vurgulamışlardır. Aynı çalışmada *S. sinensis* , *E. ibaguense* , *H. radiata* , adı geçen bu izolatlarla % 100 'e yakın bir simbiyotik ilişki kurarken *L. nervosa* , iki tane R grubuna ait izolatla, simbiyotik bir ortaklık oluşturmuştur. Bu çalışmada *H. radiata* tohumlarının asimbiyotik şartlarda da çimlenebildiği vurgulanmıştır.

MASUHARA ve ark. (1988), çalışmalarında *Bletilla striata* 'nın köklerini her ay toplayarak aktif mikorizal fungusların mevsimsel değişimlerini saptamaya çalışmışlardır. Köklerden izole edilen funguslar genellikle *Rhizoctonia repens* olmuştur. Çalışmanın sonucunda kök hücrelerinde fungal yapıların ilkbahar ve sonbaharda bir dereceye kadar artış gösterdiğini, bu tip fungal yapıların kış ve yaz boyunca mevcut olduklarını bildirmişlerdir.

Ayrıca bu araştırmacılar, *R. repens* 'in 4 izolatının *Bletilla striata* tohumlarının kabuğunda çatlamalara sebep olduğunu gözlemlemişlerdir.

WILCINSON ve ark. (1989), Avusturalya karasal orkidelerinin fungus ile infekteli mikorizal dokularından yaptıkları izolasyon çalışmalarında 9 orkide türünde yaygın olarak *Pseudomonas fluorescens-putida* 'ya dahil edilen bakteri streynlerini izole etmişlerdir. İzole edilen bu bakterilerin funguslar tarafından infekte edilen bitkilerin bir bölümüne veya orkide taksasına özelleşmiş olabilecekleri sonucuna varmışlardır.

TSUTSUI (1989), simbiyotik kültürde *Lipari nervosa* ve *Spiranthes sinensis* fidelerinin gelişimi üzerine bitki yoğunluğunun etkisini araştırdığında, her iki orkide türünde benzer sonuçlar almıştır. Alınan bu sonuçlara göre bitki yoğunluğu yüksek olduğu zaman gelişmenin ilk safhalarında fide gelişiminin geciktiğini gözlemiştir. Yine bu çalışmada her iki orkide türü için *Rhizoctonia* izolatları kullanılmıştır.

SMRECIU ve CURRAH (1989), karasal orkidelerin simbiyotik ve asimbiyotik çimlenmelerini kıyaslamak amacıyla yaptıkları çalışmada 20 orkide türünü yine orkidelerden izole ettikleri 6 *Rhizoctonia* izolatı ile inokule etmişlerdir. Bu orkidelerin 17' sinde embriyo şişkinleşmesinden sürgün gelişimine kadar farklı gelişme düzeyleri gözlenirken 3 orkide türünde bu gelişmeler gözlenmemiştir. Burada *Ceratobasidium cereale* 'nin 11 orkide türüne ait tohumların çimlenmesini teşvik ettiği ve ayrıca bir patojen olma eğiliminde olduğu saptanmıştır. *Rhizoctonia anaticula* birkaç orkide türünün çimlenmesini teşvik ederken bu türe ek olarak *C. cereale* ve *Thanetophorus pennatus* 'un birçok orkidenin protokorm gelişiminde etkili olmadığı bildirilmiştir.

RASMUSSEN ve ark. (1989), *Dactylorhiza majalis*' in simbiyotik fungus *Rhizoctonia* sp. ile in vitroda heterotrofik fideler geliştirmesinin tamamen fungus yoğunluğuna bağlı olduğunu saptamışlardır.

CURRAH ve ark. (1990), *Platanthera* ve *Coeloglossum* orkide türlerinin mikorizal fungusları üzerine yaptıkları araştırmada *Leptodontidium orchidicola*, *Epulorhiza repens*, *E. anaticula* ve *Ceratorhiza goodyera-repentis* ' e ait fungal endofitleri teşhis etmişlerdir.

TSUTSUI ve TOMITO (1990), *Rhizoctonia*' nın 706 nolu izoladı ile *Spiranthes sinensis* ve *Rhizoctonia repens* 'in aynı nolu izoladı ile *Liparis nervosa* ' yı eşleştirerek simbiyotik kültürlerde mono, di ve polisakkaritlerin uygunluğunu araştırmışlardır. Sonuğta *S. sinensis* ile *Rhizoctonia* ' nın 706 nolu izolatının birlikteliğinde fide gelişimi pektin, selüloz veya mannitol içeren ortamlarda en iyi olmuştur. *S. sinensis* ile *R.repens* 706 nolu izolatın ortaklığında, inulin üzerinde iyi gelişen fideler gözlenirken pektin, mannitol, nişasta veya glukoz üzerindeki fide gelişiminin seluloz veya inuline oranla daha az olduğunu belirtmişlerdir.

PETERSON ve CURRAH (1990), *Goodyera repens*' in protokormlarındaki mikoriza üzerine yaptıkları bir ęalıřmada Warcup'un sellüloz agar ortamında *Ceratobasidium cereale*' nin mevcut olduğu zaman ancak *Goodyera repens* tohumlarının ęimlendięini kaydetmişlerdir.

RASMUSSEN ve ark. (1990), simbiyotik ve asimbiyotik şartları gözönünde tutarak sıcaklığın *Dactylorhiza majalis* 'in tohumlarının ęimlenmesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu ęalıřmada asimbiyotik ęimlenme oranının simbiyotik ęimlenme oranından daha az olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca optimum 23-25

Çalışmada asimbiyotik çimlenme oranının simbiyotik çimlenme oranından daha az olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca optimum 23-25  C'nin üzerinde simbiyotik şartlarda önemli oranda düşüş kaydedilirken, asimbiyotik şartlarda 23 C'de çimlenme oranı maximum %21 olmuştur. Asimbiyotik şartlarda elde edilen fidelerin daha küçük olması simbiyotik kültürlerdeki gelişme uyarısının asimbiyotik şartlardan daha iyi olduğu gerçeğini ortaya koymuştur.

MASUHARA ve KATSUYA (1991), achlorophyllus orkide olan *Galeola septentrionalis*' in kökleriyle protokormları veya sadece protokormlarını *Rhizoctonia repens*, *R. solani* ve diğer *Rhizoctonia* spp. ile inokule ettiklerinde *R. repens* 'in 12 izolatından 8 tanesinin protokorm hücrelerinde fungal yapılar oluştururken 4 izolatın aynı zamanda kök hücrelerinde fungal yapılar oluşturduğunu saptamışlardır. *R. repens* dışındaki izolatlarının ise *G. septentrionalis* hücrelerinde fungal yapı oluşturmadığını belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Orkide Türlerinin Belirlenmesi

1993-1994 yıllarında Adana'nın Balcalı, Karatepe, Namrun ve Pozantı; Mersin'in Göksu; ve K.Maraş bölgelerine Mart-Mayıs ayları içerisinde değişik zamanlarda gidilerek orman, çayır, maki gibi bitki gruplarının olduğu bölgelerde orkideler aranmıştır. Bulunan orkidelerin o habitatda iken habitatın özelliği, orkidenin çiçek ve diğer yapısal özellikleri kaydedilmiştir. Daha sonra karşılaşılan bu orkide bitkilerinin 1-3 kadarı örnek olarak alınıp laboratuvarda kök ve yumru yapıları, çiçek ve yaprak özellikleri incelenmek suretiyle tanıları yapılmıştır.

3.2. Orkide Tohumlarının Elde Edilmesi

Adana, K.Maraş ve Mersin çevresinde varlığı saptanan orkide türlerinin kapsülleri 1993-1994 Haziran-Temmuz ayları boyunca araziden toplanarak laboratuvara getirilmiştir. Bu tohumlar kuru havada silica gel içeren kavanozlarda 4°C'de saklanmıştır.

Saklanacak tohumlar sterilize etmek için önce 2mg tartılarak kurutma kağıtlarından yapılan paketlere konulmuştur. Bu tohumlar, önce %70'lik alkolde 30 saniye çalkalandıktan sonra, %10'luk sodyum hipoklorit solüsyonunda 10 dakika, daha sonra %5'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda 15 dakika çalkalanmıştır. Tohumların bulunduğu bu paketçikler en son 3 kez steril destile sudan geçirilerek tohumlar üzerinden sodyum hipoklorit uzaklaştırılmıştır.

3.3. Fungusların İzolasyonu

3. 3. 1. Bitki Materyalinden Fungus İzolasyonu

1993-1994 yılları Mart-Mayıs dönemlerinde laboratuvara getirilen orkide bitkilerinin yumruları küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra bu parçalar %1' lik sodyum hipoklorit solüsyonunda 2 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Sterilizasyon işleminden sonra bu bitki parçacıkları patates dekstroze agar (PDA)' a ekim yapılarak 24°C 'de 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Her hangi bir bakteri gelişimini önlemek için PDA ortamına penicilin (100mg/lt) veya streptomycin (200mg/lt) antibiyotikleri eklenmiştir.

3. 3. 2. Topraktan Fungus İzolasyonu

Doğu Akdeniz Bölgesinde tesbit edilen salep orkidelerinin rizosferinden toprak örnekleri alınarak laboratuvara getirilmiştir. *Rhizoctonia* türlerinin mikoriza oluşturdıkları bilindiğinden alınan bu toprak örneklerinden *Rhizoctonia* spp. izole edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla önce PAPAİZAS ve ark. (1975)'a göre şeker pancarı tohumları, tuzak olarak izolasyon yapılacak toprağa karıştırılarak çalışılmıştır. Her orkide bitkisi rizosferinden alınan 0.5 kg toprak örneğinden 9.0cm'lik her petriye 50 gr olacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu amaçla her toprak örneği için 5 petri kullanılmıştır. Sonra her bir petri toprağına otoklavda steril edilmiş 1 gr şeker pancarı tohumu karıştırılarak 24°C 2 gün inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda topraktan çıkarılan bu tohumlar çeşme suyu ile iyice yıkandıktan sonra su agar petrilere ekilmiştir. Ekim yapılmış su agar petrilere yine 24°C'de 1-2 gün bekletilmiş ve bu

esnada tohumlardan gelişmiş fungus kolonilerinden saflaştırmalar yapılmıştır.

Rhizoctonia spp.' nin izolasyonu için tuzak şeker pancarı tohumu yönteminin yanısıra ROBERT ve HERR (1979)'dan alınan "toprak kalıntı yöntemine" başvurulmuştur. Bu yöntemle göre yine her bir orkide rizosfer toprağından 50gr toprak alınarak 300ml %2'lik hidrojen peroksit (H_2O_2) ile çalkalanmış ve bu karışımın üzerinde yüzen organik artıklar 0.25mm (60 mesh)' lik elekten süzülerek alınmıştır. Daha sonra aynı toprak örneğı bu kez çeşme suyu ile 3-4 kez süspanse edilerek her süspansiyondan sonra üstte yüzen organik artıklar aynı elekten süzülerek alınmıştır. Bir toprak örneğine ait organik artıklar birleştirilerek bir örnek oluşturulmuş ve bu örneğe ait organik artıkların tümü, otoklav edildikten sonra ve 45°C'ye soğutulmuş erlenmayerdeki 250ml su agar içerisine karıştırılmıştır. Organik artıklar ortam içine iyice karıştırıldıktan sonra, bu ortam 9cm çaplı 15 petriye dökülerek bu petriler 24°C 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petrilerde gelişen fungus kolonilerden saflaştırmalar yapılarak değişik izolatlar elde edilmiştir.

Her iki yöntem sonucunda elde edilen izolatların hangi orkide türü toprağından ve nereden izole edildiğine dair not alınmıştır.

3.4. *Rhizoctonia* spp.' nin Tür Teşhislerinin Belirlenmesi

Topraktan izole edilen *Rhizoctonia* spp.' nin tür teşhislerini yapılması için perfekt dönemin oluşmasını sağlayan farklı 3 yöntem kullanılmıştır.

Kullanılan ilk yöntem Yeast Ekstrakt eklenen (1gr/lt) PDA ortamıdır. *Rhizoctonia* izolatları bu ortamdan 25°C'de 4-6 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda gelişen fungus hifleri toprak ekstrakt üzerine transfer edilmiştir. Toprak ekstrakt agar ortamı hazırlanırken önce 1kg toprak 1lt su ile otoklav edildikten sonra 1 gece bekletilmiştir. Daha sonra suyun üzerinde yüzen artıklar filtre edilerek bu ekstrakta 1gr dextrose, 0.1gr yeast ekstrakt, 0.1gr KH₂PO₄, 20gr agar eklenerek destile su ile 1lt'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu ortamın pH'sı 6.8'e ayarlanarak otoklav edilmiştir. Yeast ekstrakt eklenerek hazırlanan PDA üzerinde gelişen *Rhizoctonia* hifleri toprak ekstraktı ortamı üzerine transfer edilerek 22-23°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra gelişen koloniler basidium ve basidiospor oluşumları için mikroskop altında incelenmiştir (SNEH ve ark., 1991), (Resim 1).

Rhizoctonia izolatlarının basidium ve basidiosporlardan tür teşhisleri için ikinci yöntem olarak 4gr patates ekstrakt, 5gr yeast ekstrakt, 5gr dekstrose, 17gr agar ve 1000ml destile su ile hazırlanan PYDA ortamı kullanılmıştır. PYDA ortamı otoklav edildikten sonra ortamın pH'sı %10'luk laktik asitle 4.5'a ayarlanmıştır. 27°C'de birkaç günlük inkübasyondan sonra hifler petri sınırlarına kadar ulaştığında havada kurutulmuş toprakla kültürlerin yüzeyi kaplanmıştır. Daha sonra petri kaplarının kapakları açılarak günde 1-2 kez nemlendirmek suretiyle oda

sıcaklığında inkübe edilmiştir. Gelişen hifler basidium ve basidiospor oluşumu için 3-14 gün içinde gözlem altına alınmıştır (SNEH ve ark., 1991), (Resim 1).

Rhizoctonia 'nın tür teşhisi için kullanılan üçüncü yöntemde, %5'lik sulu mancozeb süspansiyonuna batırılmış filtre kağıdı diskleri, içerisinde su agar bulunan petrilerin çevresine yakın olarak yerleştirilmiştir. 3-4 günlük *Rhizoctonia* kültürlerinin kenarından kesilen 5mm'lik agar diskleri mancozeb'li kağıt disklerden 3cm uzağa su agar üzerine yerleştirilerek 25-30°C'de 10-15 günlük inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda basidium ve basidiospor üretimi için mikroskopik gözlemler yapılmıştır (SNEH ve ark., 1991), (Resim 1).

3.5. *Rhizoctonia* spp.'nin Orkide Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkisi

3.5.1. Laboratuvar Çalışmaları

Rhizoctonia'nin orkide tohumlarının çimlenmeleri üzerine etkisi HUDSON (1986)'nin SMITH adlı araştırmacıya atfen açıkladığı "çift kap" yönteminden esinlenerek araştırılmıştır. Bunun için 9cm çaplı petriye bir miktar silica jel koyulmuş ve bunun içine steril orkide tohumları karıştırılmıştır. Bu petrilerdeki orkide tohumları ve silica jel üzerine Knudson çözeltisi emdirilmiş steril ve değişik yerlerinden delinmiş (5-10 kez) bir tane kurutma kağıdı yerleştirilmiştir. Kurutma kağıdı üzerine 3 günlük *Rhizoctonia* kültüründen alınan 5 mm'lik disk koyulmuştur. Her *Rhizoctonia* izolatu için bu çalışma 3 kez tekrarlanmış ve her tekrarda 3 petri kullanılmıştır. Petrilerdeki kurutma kağıtları steril destile su ile zaman zaman nemlendirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan petrilerde



Resim 1. *Rhizoctonia* spp.'nin tür teşhisinde kullanılan toprak ekstrakt(a), PYDA(b) ve fungusitli agar(c) yöntemleri

çimlenmeyi takip etmek amacıyla birer haftalık periyotla 4 ay boyunca kontroller yapılmıştır. Daha sonra herbir petrideki çimlenen fide sayısı hesaplanmıştır. Bunun için 2mg tohum 10 ml suda homojen bir şekilde karıştırılarak her 0.05 ml'de tohum sayımı yapılmıştır. Bunu takiben herbir petrideki tohum sayısı bulunmuş ve çimlenme oranları hesaplanmıştır.

Orkidelerde önemli bir mikorizal fungus olduğu bilinen diğer *Absidia* sp. ve *Trichoderma* sp.' nin birer izolatu orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine etkinlikleri açısından ayrıca testlenmiştir.

Bunun yanında birçok araştırmacının çimlendirme denemelerinde yulaf ortamını sıkça kullanması nedeniyle yulaf ortamı çalışma kapsamına alınmıştır. Yulaf ortamı 1000ml destile suya 2.5gr yulaf unu, 12gr agar eklenerek hazırlanmış ve ortamın pH'sı 7'ye ayarlanmıştır. Belirlenen orkide türü tohumları ile *Rhizoctonia* izolatu yulaf ortamı üzerinde 24°C' de 2 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 8 saat karanlık 16 saat ışık periyodunda 1.5-2 ay gözlem altına alınarak kontrolleri yapılmıştır (CLEMENTS ve ark., 1986).

3. 5. 2. Saksı Çalışmaları

Petri denemelerinin yanısıra kum ve toprak karışımı bulunan saksılarda çimlenme testleri yürütülmüştür. Bu amaçla orkide rizosferinden izole edilen *Rhizoctonia* izolatu kum-mısır unu ortamında kültüre alınmıştır. Ortamın hazırlanması için %96 kum+%4 mısır unu ve %20 su (v/W) oranında erlenmayer içerisinde karıştırılarak otoklav edilmiştir. Daha sonra bu erlenmayer içindeki karışım *Rhizoctonia* izolatının 3 günlük PDA kültüründen alınan 0.5cm'lik kültür diski ile inokule edilerek 24°C' de 4 hafta inkübe edilmiştir. Diğer yandan bir miktar kum (1/2) ve orkide rizosfer toprağı (1/2) alınarak 121°C' de 1 atm. basınçta 0.5 saat 2 gün ard

arda otoklav edildikten sonra saksılara konmadan önce *Rhizoctonia*'nin kum+mısır unu kültürü karışımı ile ağırlık olarak %2, %3 oranında bulaştırılmıştır. Bulaştırılan kum+toprak içerisinde inokulumun iyice dağılımını sağlamak amacıyla bunlar iyice karıştırılmıştır. Ayrıca saksıların bir kısmı kontrol olarak belirlenerek inokulum verilmemiştir. Her inokulum seviyesi için 3 saksı kum + toprak hazırlanmıştır. Daha sonra orkide tohumları bu saksılara yaklaşık 1-2cm derinlikte olacak şekilde ekilmiştir. Saksılar uygun bir çevrede, zaman zaman nemlendirilerek ve ortalama 2 ayda bir mikroskopta tohum ölçümleri yapılarak 1 yıl gözlem altında tutulmuştur.

3. 5. 3. Petrilerde Çimlenen Tohumlardan Gelişen Fidelerin Saksılara Taşınması

Petride çimlenen orkide türleri tohumlarından gelişen fideler, 1/2 kum+1/2 orkide toprağı içeren saksılara şaşırtılmıştır. Saksılardan bir kısmı steril kum+toprak karışımıyla hazırlanırken diğer bir kısmı da steril edilmeyen kum+toprak karışımı ile hazırlanmıştır. Fidelerin toprağı şaşırtılmasından sonra saksılar oda sıcaklığında, belirli aralıklarla nemlendirilerek 2 ay süreyle gözlem altına alınmıştır.

3. 6 Tohumların Çimlendirilmesinde Kullanılan Çözeltiler

Petri denemelerinde kurutma kağıtlarını nemlendirmek için kullanılan 1lt Knudson çözeltisinin içeriğı aşağıda verilmiştir.

Sakkaroz	20gr
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1gr
NH_4NO_3	500mg
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500mg
KH_2PO_4	250mg
KCl	250mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.5mg

Bu çözeltinin NaOH ve HCl kullanılarak pH'sı 5.2'ye ayarlanmıştır.



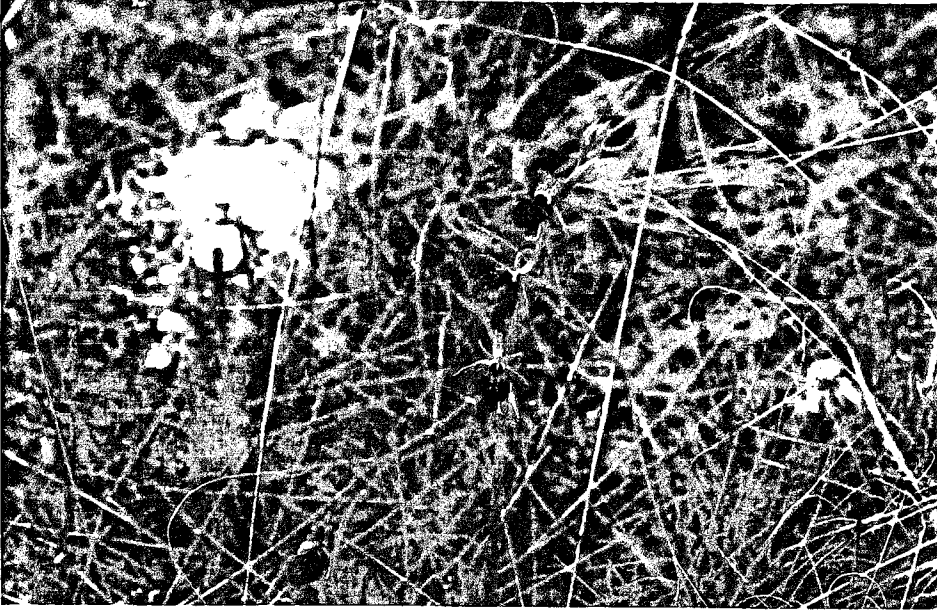
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4. 1. Doğu Akdeniz Bölgesindeki Orkide Türlerinin Belirlenmesi

1993 ve 1994 yıllarında Mart-Mayıs ayları içerisinde Doğu Akdeniz Bölgesinin değişik alanlarında yapılan sörveyler sonucunda 6 cinse ait 14 orkide türü saptanmıştır (Çizelge 1, Resim 2 ve 3)

Çizelge1. Tesbit edilen orkide türleri ve toplandığı bölgeler

Orkide Türleri	K. Maraş	Adana (Balcalı)	Adana (Karatepe)	Adana (Namrun)	Adana (Pozantı)	Mersin (Göksu)
<i>Anacamptis pyramidalis</i>			X			
<i>Epipactis</i> sp.				X		
<i>Himantoglossum affine</i>	X					
<i>Ophrys apifera</i>			X			
<i>Ophrys bornmuelleri</i>	X					
<i>Ophrys holosericea</i>			X			
<i>Ophrys transchyrana</i>		X		X		
<i>Ophrys umbilicata</i>		X				
<i>Ophrys vernixia</i>		X				
<i>Orchis anatolica</i>	X				X	
<i>Orchis collina</i>		X				
<i>Orchis coriophora</i>	X		X	X		X
<i>Orchis italica</i>		X				
<i>Serapias vomeracea</i>	X					



Resim 2. Çiçek döneminde *Ophrys transchyrana* fidesi



Resim 3. Yapraklı dönemde *Ophrys vernixia* fidesi

Çizelge 1'den görüleceği gibi Doğu Akdeniz Bölgesinde en yaygın görülen tür *Orchis coriophora* 'dır. Sörvey sırasında, *Orchis* cinsine bağlı 4, *Ophrys* cinsine bağlı 6 tür saptanırken, *Anacamptis*, *Epipactis*, *Himantoglossum* ve *Serapias* cinslerinden birer türe rastlanmıştır. Bunlardan *Anacamptis pyramidalis* 'e, Adana-Karatepe'de *Epipactis* sp'ye ve *Serapias* sp 'ne Adana-Namrun'da ve *Himantoglossum affine* ve *Serapios* sp 'ne K.Maraş bölgesinde rastlanmıştır.

Ophrys cinsine bağlı türlerin genellikle 10-45cm boyunda olmaları, 2 tane yuvarlak veya oval yumru, 4 veya daha fazla yaprağa sahip bulunmaları, *Orchis* cinsine bağlı türlerin ise benekli veya beneksiz yaprak şekillerine göre, yumruların genellikle 2 tane yuvarlak ve parçalanmamış oluşlarına ve çiçek yapılarına göre tür tanımları yapılmıştır. *Anacamptis pyramidalis* tepede konik sık çiçek oluşturmalarına göre, *Epipactis* sp., labellum yapısına göre, *Himantoglossum affine*, sarkık çiçek yapılarına göre, *Serapias vomeracea* ise göze çarpan labellum ve çiçek yapılarına göre tanımlanmıştır.

Burada dikkat çekici diğer bir nokta da *Orchis coriophora* 'nın sörvey yapılan 6 bölgenin 4'ünde görülmüş olup diğer bütün türler sadece bir veya iki bölgede saptanmıştır.

4.2. Tohum Elde Edilen Orkide Türleri

Doğu Akdeniz Bölgesinde yapılan sörveylerde sadece bazı orkide türlerinden tohum elde edilebilmiştir. Çiçeklenme döneminde

ayrıca diğer bazı orkide türlerinin belirlenmesine rağmen doğada dölleme gerçekleşmediği için tohum bağlama olayı oluşmamıştır. Yine bazı türlerin doğada tahrip oldukları veya öldükleri gözlenmiştir. Bu nedenle çimlendirme çalışmalarını sadece tohum elde edilebilen *Orchis anatolica*, *Orchis coriophora*, *Ophrys apifera*, *Ophrys transyrcana*, *Ophrys umbilicata*, *Ophrys vernixia*, *Himantoglossum affine* ve *Serapias vomaracea* türleri ile yürütülmüştür. Bunlardan *Orchis*, *Ophrys* ve *Himantoglossum* cinsine ait türler salep yapımında olarak kullanılmaktadır (SEZİK, 1984).

4. 3. Fungus İzolasyonları

4. 3. 1. Bitki Materyalinden İzolasyonlar

Çiçeklenme döneminde sörveyleri yapılan tüm orkide bitki örnekleri laboratuvara getirilerek tanıları yapılmıştır. Bu türlerin yumruları küçük parçalara ayrılarak yüzeysel sterilizasyonları yapıldıktan sonra patates dekstroze agar (PDA) üzerine mikolojik ekim yapılmıştır. Ancak belirli bir inkübasyondan sonra herhangi bir fungus gelişimi gözlenmemiştir.

4. 3. 2. Şekerpancarı Tuzaklama Yöntemi İle Toprakten Fungus İzolasyonu

Doğu Akdeniz Bölgesinde tesbit edilen sadece *Ophrys vernixia* ve *Orchis anatolica* orkide türlerinin rizosfer topraklarından, fungus izolasyonu yapılmış olup izolasyonlar sonucunda *Ophrys bornmuelleri* rizosfer toprağından bazı Pythiaceous funguslar, *Orchis anatolica* rizosfer toprağından ise *Fusarium* sp. izolatları elde edilmiştir.

4. 3. 3. Toprak Kalıntı Yöntemi İle Orkide Rizosfer Toprağından Fungus İzolasyonu

Orkide rizosfer toprağından bu yöntemle yapılan izolasyonlar sonucunda 11 orkide türünden 6 fungus cinsine ait 19 izolat elde edilmiştir ve sonuçlar Çizelge 2' de gösterilmiştir. Bu çizelge' den görüleceğı gibi mikorizal ilişkisi bilinen *Rhizoctonia* cinsine ait 2 izolat elde edilmiştir. *Rhizoctonia*' ya ait bu Rh-1, Rh-2 izolatları sırayla salep orkideleri olan *Orchis collina* ve *Ophrys vernixia*' dan

Çizelge 2. Orkide türleri ve rizosferlerinden izole edilen fungus grupları

Orkide Türleri	<i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i>	<i>Pythiaceae</i> fungus	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Macrophomina</i> sp.	<i>Absidia</i> sp.	<i>Fusarium</i> spp.
<i>Anacamptis pyramidalis</i>		X				
<i>Epipactis</i> sp.						X
<i>Ophrys bornmuelleri</i>		X				
<i>Ophrys holosericea</i>						X
<i>Ophrys transchyrana</i>						X
<i>Ophrys umbilicata</i>			X			X
<i>Ophrys vernixia</i>	X					X
<i>Orchis anatolica</i>						X
<i>Orchis collina</i>	X			X		X
<i>Orchis coriophora</i>		X		X	X	
<i>Serapias vomeracea</i>		X	X			X

izole edilmiştir. Bunun dışında *Orchis* ve *Ophrys* cinslerine ait salep orkidelerinden 2 Pythiaceous fungus, 1 *Trichoderma*, 2 *Macrophomina*, 1 *Absidia* ve 6 *Fusarium* izolatu elde edilmiştir. *Anacamptis pyramidalis*' den sadece 1 Pythiaceous fungus, *Epipactis* sp. 'den *Fusarium* izolatları elde edilirken *Serapis vomareceae*' den bir Pythiaceous fungus ve *Trichoderma* izole edilmiştir.

4. 4. *Rhizoctonia* spp'nin Tür Tanımları

Bu amaçla çalışılan toprak ekstrakt agar, PYDA ve mancozeb diski ile ikili kültür gibi yöntemlerin her üçünde de orkide rizosferinden elde edilen 2 *Rhizoctonia* izolatının perfekt dönemi elde edilememiştir. Ancak PARMETER (1979)'e göre bu izolatların PDA'da gösterdikleri 1) genç vejetatif hiflerde çok nükleuslu hücreler, 2) belirgin septal porlar, 3) genç vejetatif hifte hücrelerin septumdan uzak olarak dallanması, 4) hif dallanmasında dallanmanın orijin noktası yakınında bir septumun oluşumu ve dalın burada kıskılık göstermesi, ve 5) koloninin kahverenginin tonlarına sahip olması gibi özelliklerden bunların *Rhizoctonia solani* 'ye ait oldukları anlaşılmıştır. Ayrıca bu izolatların klamp konneksin içermemeleri, rizomorflar oluşturmamaları, kahverengiden başka bir renk almamaları, konidi üretmemeleri ve kabuk veya medula şeklinde sklerot üretmemeleri gibi özellikler nedeniyle *R. solani* oldukları kanısına varılmıştır.

4. 5. Orkide Tohumlarını Çimlendirme Denemeleri

4. 5.1.Laboratuvar Çalışmaları

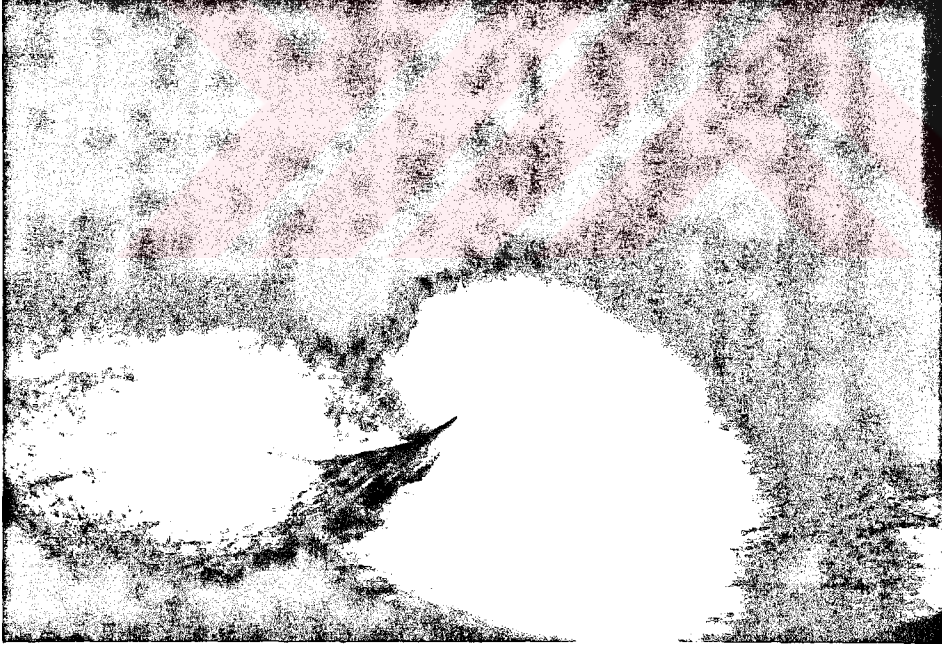
Bu denemede *Orchis coriophora*'nın 3 farklı bölgeden alınan tohumları, *Orchis anatolica*, *Ophrys apifera*, *Ophrys transyrcana*, *Himontoglossum affine* ve *Serapias vamaracea* tohumları

Rhizoctonia solani (Rh-1) izolatu ile çimlendirme denemelerine alınmıştır. Ayrıca *Orchis coriophora* , *Absidia* sp. ile çimlendirme denemesine alınırken , *Ophrys umbilicata* sadece *Trichoderma* sp. izolatu ile denenmiştir (izelge 3).

imlendirme denemesine ait petriler birer hafta aralıklarla 4 ay sureyle streoskopik mikroskopta tohumların şişmesi ve çimlenmesi yonnden incelenmiştir. Bu sure sonuna kadar *Absidia* sp. ve *Trichoderma* sp. izolatlarının inokule edildiği tohumlarda hiçbir çimlenme görülmemiştir. 4 aylık sure içinde 3 farklı bölgeden alınan *Orchis coriophora* ve *Ophrys vernixia* tohumlarının *Rhizoctonia solani* eşliğinde çimlendiği görülmüştür (Resim 4 ve 5). Bu iki türe ait tohumlar mikroskop altında incelendiğinde, 20-25. günde şişmeye başlamıştır. *Orchis coriophora* 'nın Göksu (Adana)'dan alınan tohumları 40 günde çimlenmiş ve yaprakçıklar oluşturmuştur. Bunu sırayla *Orchis coriophora* 'nın Namrun'dan alınan tohumları (45 gün), *Ophrys vernixia* (60 gün) ve *Orchis coriophora* 'nın K.Maraş'tan alınan tohumları (70 gün) izlemiştir (şekil 1).

imlendirme denemelerinde başarı sağlanan bu iki türün yanısıra *Orchis anatolica* ile yapılan mikroskopik incelemelerde tohumların şişerek protokorm geliştirdikleri gözlenmiş, ancak tohumun gelişmesi bu şekilde kalarak çimlenme gerçekleşmemiştir. Benzer durum *Trichoderma* sp. ile inokule edilmiş petrilerde *Ophrys umbilicata* tohumlarında da görülmüş ve tohumlar çok az şişmesine rağmen çimlenme olmamıştır.

imlendirme denemeleri sonucunda salep orkidesi olarak bilinen *Orchis* ve *Ophrys* cinslerine ait *Orchis coriophora* ve *Ophrys vernixia* 'da başarı sağlanmıştır. Çimlenme saptanılan orkide

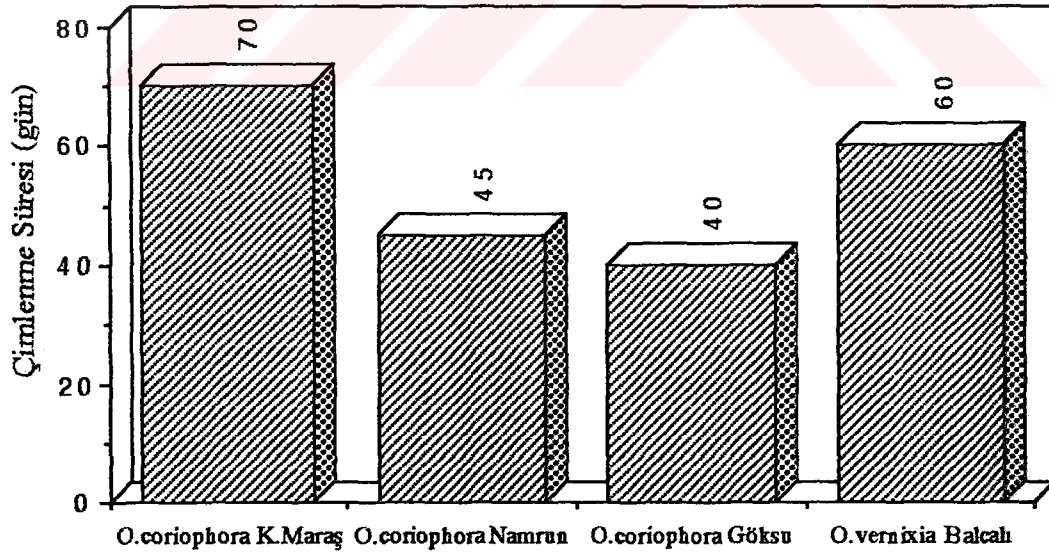


Resim 4. *Orchis coriophora* tohumlarından fide oluşumu



Resim 5. *Ophrys vernixia* tohumlarından fide oluşumu

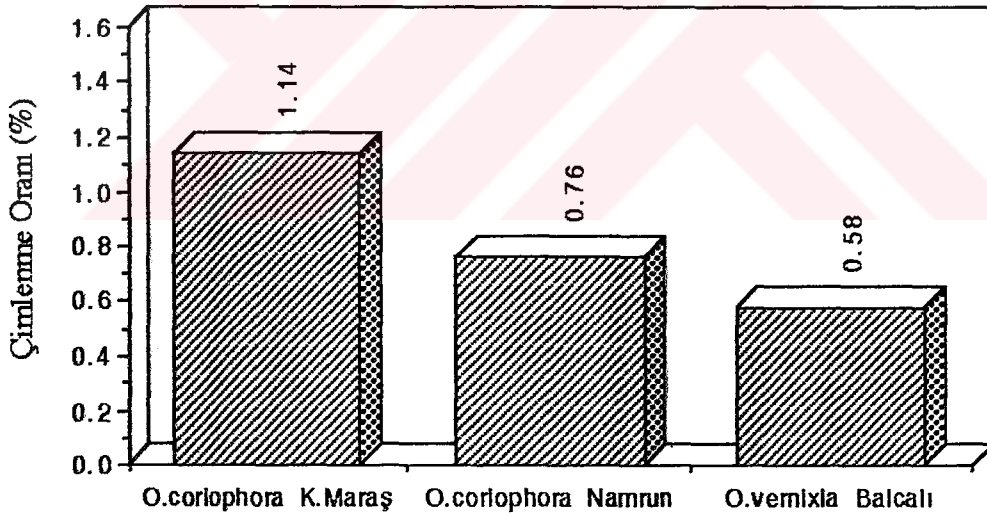
Orkide türleri	Bölgeler	İzolatlar
<i>Himantoglossum affine</i>	K. Maraş	Rh-1
<i>Ophrys apifera</i>	Karatepe	Rh-1
<i>Ophrys transchyrana</i>	Balcalı	Rh-1
<i>Ophrys umbilicata</i>	Balcalı	<i>Trichoderma sp.</i>
<i>Ophrys vernixia</i>	Balcalı	Rh-1
<i>Orchis anatolica</i>	K. Maraş	Rh-1
<i>Orchis coriophora</i>	K. Maraş	Rh-1 <i>Apsidia sp.</i>
<i>Orchis coriophora</i>	Namrun	Rh-1
<i>Orchis coriophora</i>	Göksu	Rh-1
<i>Serapias sp.</i>	K. Maraş	Rh-1



Şekil 1. Orkide tohumlarına ait çimlenme süreleri

türleri tohumlarını içeren petrillerdeki fide sayıları belirlenmiştir. *Orchis coriophora* (K.Maraş) orkide tohumları 47 protokorm oluşturmalarına rağmen sadece 21 fide oluştururken, *Orchis coriophora* (Namrun) 14 fide, *Ophrys vernixia* 11 fide oluşturmıştır. Petride gözlemler yapılırken *Orchis coriophora* ve *Ophrys vernixia* 'dan oluşan tüm protokormların fide oluşturduğu tesbit edilmiştir. Çimlenme oranı hesaplandığında en fazla çimlenme gösteren K.Maraş' dan alınan *Orchis coriophora* tohumlarında %1.14 *Orchis coriophora* (Namrun) tohumlarında %0.76 ve *Ophrys vernixia* tohumlarında %0.58 oranında bir çimlenme gerçekleşmiştir (Şekil 2).

Çimlendirme denemelerinde ayrıca yulaf ortamı kullanılmıştır. Bu çalışmada *Orchis coriophora*, *Ophrys apifera*, *Ophrys umbilicata* ve *Anacamptis pyramidalis* tohumları



Şekil 2. Orkide tohumlarına ait çimlenme oranları

Rhizoctonia solani 'nin Rh-1 izolatu ile yulaf ortamı üzerine yerleştirilmişlerdir. Yaklaşık 1.5-2 ay sonunda *Orchis coriophora* tohumlarında protokormların geliştiği görülmüş ve hemen ardından tohumlar çimlenerek sağlıklı fidecikler oluşturmuşlardır.

4. 5. 2. Saksı Denemeleri

Petrilerdeki çimlendirme denemelerinde başarılı bir çimlenme gösteren *Orchis coriophora* aynı zamanda saksı çalışmalarına alınmıştır. Bu saksılar *Rhizoctonia solani* 'nin Rh-1 izolatu ile inokule edilerek topraktaki tohumların gelişmeleri 2'şer ay arayla 10 ay süreyle incelenerek fungus içermeyen kontrole göre tohumların büyüklükleri belirlenmeye çalışılmıştır (Çizelge 4).

Çizelge 4' den görüleceği gibi fungus ile inokule edilmiş toprakta orkide tohumları kontrole oranla daha fazla şişkinleşmiştir. 2 ve 3gr *Rhizoctonia solani* inokulumu verilmiş saksılarda tohumların büyüklüğü ortalama 146.8-152.6 μm bulunmuştur. İnokulum miktarının artmasının tohum şişmesi üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır.

Saksılardaki tohumlarda 10 ay süreyle bu ölçümler yapılmış,

Çizelge 4. *Orchis coriophora*'nın farklı inokulum miktarlarına göre hazırlanmış saksılardaki tohum ölçümleri(mikron)

İnokulum miktarı	ZAMAN				
	2.AY	4.AY	6.AY	8.AY	10.AY
3 GRAM	143.6	150.0	137.8	144.0	146.8
2 GRAM	172.8	139.1	153.6	155.0	152.5
KONTROL	157.3	148.0	156.8	135.0	134.6

ancak daha sonra çimlenme olup olmayacağı gözlenmiştir. Fakat 1 yıllık sürenin sonuna kadar saksıların hiçbirinde herhangi bir çimlenme görülmemiştir.

4. 6. Petrilerde çimlenen Tohumlardan Gelişen Fidelerin Saksılara Taşınması

Petrilerde Knudson çözeltisi ve *Rhizoctonia solani* diski bereberliğinde çimlenen *Orchis coriophora*'nın 10 kadar fidesi gerek steril toprakla hazırlanan saksılara, gerekse steril edilmeden hazırlanan saksılara taşınmıştır. Oda sıcaklığında yaklaşık 2 ay süren gözlemler sonucunda steril edilmeyen toprak içerisinde saksılarda fideler daha sağlıklı bir gelişme göstermiştir. Bu 2 aylık süre sonunda 2-3cm büyüklüğe erişen bitkilerin kök boğazında fizyolojik olduğu tahmin edilen kararmalar gözlenmiş ve tahminen bu nedenle bitkicikler canlılıklarını kaybederek ölmüştür.

TARTIŞMA

Bu çalışma ile Doğu Akdeniz Bölgesinde 6 cinse ait 14 orkide türü belirlenmiştir. Bunlardan *Orchis coriophora* Doğu Akdeniz Bölgesindeki bütün sörvey alanlarında yaygın olarak bulunmuştur. Bu türün İskandinav ülkeleri hariç tüm Avrupa ve Türkiye'de her bölgede bulunduğu (BAUMANN and KÜNKELE, 1982) ve 0-1500 m arasındaki yüksekliklerde yetişebildiği bildirilmektedir (DELFORGE and TYTECA, 1984). Bu çalışmada saptanan diğer orkide türlerinin ise yayılma alanları daha sınırlı olup Türkiye'nin Karadeniz, Akdeniz ve Ege sahil şeritlerinde rastlanmaktadır (BAUMANN and KÜNKELE, 1982). Bölge ve habitat seçicilikleri nedeniyle bu türlere sörvey yapılan habitatlarda sıkça rastlanmamıştır.

11 orkide türünün rizosfer toprağından yapılan izolasyonlarda 6 cinse ait 19 fungus izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlardan 2'si *Rhizoctonia solani* izolatu olup diğerleri *Absidia* sp., *Fusarium* spp., *Macrophomina* sp., *Trichoderma* sp. ve bazı Pythiaceae funguslara ait izolatlardır. Bu güne kadar orkidelerdeki mikorizal ilişkileri saptamak amacıyla orkide rizosferlerinden yapılan izolasyonlarda *Phytophthora* ve *Trichoderma* türlerine rastlanmış ve bunların çimlenmeyi teşvik edici etkilerinden söz edilmiştir (ARDITTI, 1967). Ancak bu çalışmada elde edilen *Absidia* sp., *Fusarium* spp. ve *Macrophomina* spp.'den bu güne kadar başka bir yayında hiç söz edilmemiştir.

Orkide tohumlarının çok küçük olması ve endosperm içermemeleri nedeniyle, başarılı bir şekilde çimlenebilmeleri için dışarıdan bir karbonhidrat kaynağına gereksinimleri vardır. Bu da uygun çevre şartlarının yanısıra tohumların uygun bir fungusla infektelenmesi ile sağlanabilmektedir (HUDSON, 1986; GARRETT,

1981; SEZİK, 1984). Böyle bir mikorizal ilişki ile ilgili olarak bugüne kadar en fazla çalışılan funguslar *Rhizoctonia* spp. olup, bunların pek çok orkide türü ile uygun bir mikorizal ilişki kurdukları ve çimlenmeyi teşvik ettikleri bildirilmektedir (HUDSON, 1986; SEZİK, 1984). Bu nedenle bu çalışmadaki çimlendirme denemelerinde *Rhizoctonia solani* izolatu ile çalışılmış ve ayrıca olanaklar içinde sınırlı da olsa *Absidia* sp. ve *Trichoderma* sp.'de çalışmaya dahil edilmiştir. Bir salep orkidesi olan *Orchis coriophora* 'nın Türkiye'nin bütün bölgelerinde ve değişik pekçok habitatda bulunması nedeniyle (BAUMANN and KUNKELE, 1982) mikorizal çalışmalarda öncelikle çalışmaya alınmıştır. Çimlendirme denemeleri sonucunda sadece *Orchis coriophora* ve *Ophrys vernixia* 'nın tohumları *Rhizoctonia solani* 'nin (Rh-1) izolatu ile inokule edildiğinde çimlenmişlerdir. Denemede kullanılan *Absidia* sp. izolatu *Orchis coriophora* orkide türü tohumlarında çimlenmeyi başlatıcı ve teşvik edici bir etki göstermemiştir. Bunun dışında Rh-1 izolatının *Orchis coriophora* ve *Ophrys vernixia* dışında hiçbir orkide türünde tohumların çimlenmesine bir katkısı olmamıştır. Bu durum orkide tohumlarının ancak uygun bir fungusla birlikte oldukları zaman mikorizal ilişkinin oluşarak çimlenmenin gerçekleşebileceği tezini kanıtlamaktadır (DIJK, 1987; GARRETT, 1981; HUDSON, 1986). Nitekim DIJK (1987), bazı orkide türlerinde *Ceratobasidium cornigerum*, *Thanatephorus cucumeris* ve *Tulasnella calospora* fungus türlerini izole etmişler ve bunların bazı orkide türlerinde çimlenmeyi teşvik ettiklerini saptamışlardır. Ancak *Orchis anatolica* tohumları *Rhizoctonia solani* varlığında sadece protokorm oluşturabilmiştir. Bu durum Rh-1 izolatının iki tür dışında diğer türlerin tohumlarının çimlenmelerini teşvik

etmediğini açıklamaktadır. Aynı zamanda bir fungus aşırı inokulum baskısı nedeniyle, orkide tohumu ile mikorizal ilişki kurması sırasında patojenik olabilir (GARRETT, 1981; SEZİK, 1984; HUDSON, 1986). Çünkü mikorizal olan pekçok fungus aynı zamanda bazı bitkilerde nektrotrofik patojen durumundadır (HUDSON, 1986). Bu bulgular Rh-1 izolatının denendiği çimlenme ve gelişme durumları için de geçerli olabilir.

Orkide tohumlarını çimlendirme denemelerinde Knudson çözeltisinden başka ayrı bir denemede yulaf ortamı kullanılmıştır. Bu ortamda *Rhizoctonia solani* (Rh-1) izolatı ve *Orchis coriophora* tohumları bir araya getirilmiştir. Bu ortamda Rh-1 izolatı ile inokule edilen *Orchis coriophora* tohumları çimlenmiştir. TSUTSUI ve TOMITA (1990)'nın da belirttiği bu ortamın, Knudson çözeltisine göre daha ucuz ve kolay hazırlandığından alternatif bir ortam olduğu görülmüştür.

Orchis coriophora ve *Ophrys vernixia* tohumlarının Rh-1 izolatı teşviki ile çimlendirme denemelerinde çimlenme oranı en yüksek *Orchis coriophora* (K.Maraş) tohumlarında 47 protokormdan sadece 21 tanesi fide oluşturmuş dolayısıyla %1.14 oranında bir çimlenme gerçekleşmiştir. ARDITTI (1967), bazı orkide türleri ile yaptığı çimlendirme denemelerinde çimlenmenin çok iyi olmasına rağmen 15 bin denemeden sadece birkaç yüzünde başarılı olmuştur. Yine TSUTSUI ve TOMITA (1989) petride yapılan çimlendirme denemelerinde yoğun oranda tohumun olması veya çimlenmenin yoğun olması durumunda fide gelişiminin geciktiğini ve yaprakçık oluşturmadıklarını belirtmektedir. Bu denemede çimlenme oranının düşük olması bu bilgilerin ışığında normal olarak görülebilir. Ayrıca inokulum baskısı nedeniyle fungusun bazı tohumlarda patojenik olması da söz konusu olabilir. Çimlenme oranında alınan

bu sonuçlar TSUTSUI ve TOMITA (1989) ve ARDITTI (1967)'in görüşleriyle desteklenmektedir.

Saksı denemelerinde *Rhizoctona solani* izolatu ile inokule edilmiş topraktaki tohumlarda, kontrole oranla şişme olmuş; fakat 10 aylık bir süre sonuna kadar hiçbir çimlenme görülmemiştir. Bu toprakta çimlenmeyi teşvik edici besin maddesi noksanlığı, *Rhizoctonia solani* 'nin inokulum baskısı gibi nedenlerden olabileceği gibi, bazı türlerin tohumlarının toprakta fotosentez yapıcı yeşil kısımlar oluşturması için 2 -10 yıl arasında bir zamana gereksinim duyduklarından kaynaklanabilir (INGOLD and HUDSON, 1993).

Petri denemeleri sonucunda elde edilen ve daha sonra saksılara şaşırtılan fidecikler, 2 aylık bir süre sonunda canlılıklarını kaybederek ölmüşlerdir. Bunun sebebinin bitkilerin kök boğazında oluşan ve fizyolojik olduğu tahmin edilen kararmalardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Orkide tohumlarının çimlendirilmesinde bugün hala pek çok güçlük vardır. Bu güçlükler uygun besin ortamlarının seçimi, mikorizal ilişki kurulacak olan uygun fungusun seçimi, bu fungusun inokulum düzeyinin uygunluğu, çimlenmeden sonra oluşan orkide bitkisinin büyütülmesi ve toprağa aktarılması gibi sorunlardan kaynaklanabilir. Bu konu ile ilgili çalışmaların artması bu sorunlara çözüm getirebilecektir. Böylece doğada tahrip gören bu bitkilerin, korunması, laboratuvar ve seralarda kitle halinde üretimi gibi konular aydınlığa çıkartılarak özellikle salep orkideleri yok olmaktan kurtarılabilirlerdir.

ÖZET

Doğu Akdeniz Bölgesindeki salep orkidelerinde, mikorizal fungusların teşhisi ve bu fungusların orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla yapılan bu çalışma 1993-1994 yılı boyunca yürütülmüştür.

Yukarıdaki adı geçen bölgelerde 14 farklı orkide türü saptanmıştır. Bu 14 türün rizosfer topraklarından yapılan izolasyonlar sonucunda 2 *Rhizoctonia solani* izolatu ve 6 fungus cinsi elde edilmiştir. Orkide tohumlarının çimlenmesi ve gelişimi ile ilgili olarak *Rhizoctonia solani* olarak teşhis edilen izolat kullanılmıştır. Elde edilen diğer fungus cinslerinin *Absidia* sp., *Fusarium* spp., *Macrophomina* sp., bazı Pythiaceae funguslar ve *Trichoderma* sp. oldukları belirlenmiştir.

Bu bölgelerde tesbit edilen *Orchis coriophora*, *Orchis anatolica*, *Ophrys transchyrana*, *Ophrys vernixia*, *Ophrys apifera*, *Ophrys umbilicata*, *Serapias vomaracea* ve *Himantoglossum affine* türleri tohumları ve *Rhizoctonia solani*, *Absidia* sp. ve *Trichoderma* sp. izolatları ile Knudson besin çözeltisi kullanarak petrilerde çimlendirme denemeleri kurulmuştur. Bu denemeler sonucunda *Orchis coriophora* ve *Ophrys vernixia* 'ya ait tohumlarda Rh-1'in varlığında çimlenme ve fide gelişimi gözlenirken, Rh-1'in bulunmadığı kontrol petrilerde protokorm oluşumu ve çimlenme gibi gelişmeler kaydedilmemiştir. *Orchis anatolica* tohumlarıyla kurulan petri denemelerinde ise *Rhizoctonia solani* sadece protokorm oluşumunu teşvik etmiş ve fide gelişimi gözlenmemiştir. Dolayısıyla Rh-1'in *Orchis coriophora* ve *Ophrys vernixia* üzerinde mikorizal etkisi kesinlik kazanırken *Orchis anatolica* 'da etki protokorm oluşumuyla sınırlı kalmıştır.

Fungus+Knudson çözeltisinin yanısıra ayrıca çimlendirme ortamı olarak kullanılan yulaf ortamındada *Orchis coriophora* + *Rhizotonia solani* (Rh-1) ortaklığı çimlenmede başarılı sonuç vermiş ve sağlıklı orkide fidecikleri elde edilmiştir.

Çimlendirme denemelerinin bir kısmı ayrıca orkide rizosferinden alınan bir miktar toprakla saksı denemesi kurularak gerçekleştirilmiştir. Saksı denemesinde belirli aralıklarla yapılan mikroskopik ölçümler sonucunda tohumlarda ne bir çimlenme ve ne de kayda değer başka herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.



SUMMARY

The main goal of this study was to identify the mycorrhizal fungi on the root of salep orchids and to investigate the effects on the germination of orchid seeds. The project was carried out in the Eastern Mediterranean region in 1993 and 1994.

In this region, 14 different orchid species were obtained during surveys. 2 *Rhizoctonia* isolate, which belongs to *R.solani* and 6 other different fungus isolates isolated from the rhizosphere of these orchid species. Only one *R.solani* isolate called Rh-1 was used to test the effects of the fungus on the germination of the seeds and on the seedling developments. Fungus genera isolated from orchids were identified as *Trichoderma* sp., *Fusarium* spp., *Macrophomina* sp. , *Absidia* sp. and some were as Pythiaceae fungi.

The effects of *R. solani* isolates on the germination were tested in petri dishes containing Knudson nutrient solution. Seeds of *Orchis coriophora* and *Ophrys vernixia* germinated and showed some seedling development in the presence of Rh-1 while controls did not show any germination or protocorm development. However the presence of *R.solani* stimulated the germination of *Orchis anatolica* but no seedling development observed.

Mycorrhizal relationship between *Orchis coriophora* and *Rhizoctonia solani* was observed on oat-meal medium as well as Knudson medium . In this trials, orchid seeds germinated and healthy seedlings developed.

Some of the germination tests were carried out using soil from the rhizosphere of orchids in experimental pots. The seeds were periodically checked was seen in terms of germination or other developmental changes.

KAYNAKLAR

- ARDITTI, J., 1967. Factors effecting the germination of orchid seeds. Bot. rev. 33, 1-97
- BAYTOP, T., and SEZİK, E. , 1968. Türk salep çeşitleri üzerinde araştırmalar. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Mec. 4, 61
- BEYRL, H., PENNIGSFELD, F. and HOCK, B., 1985. Orchid mycorrhiza. Zeitschrift-fur-Mykologie. 51: 2, 185-198
- BUCZACHI, S., 1989. Collins new generation guide to the fungi of Britain and Europe.
- CLEMENTS, M. A., and ELLYARD, R.K., 1979. Germination of Australian terrestrial orchids. Amer. Orchid Soc. Bull., 48: 810-816.
- CURRAH, R. S., 1986. *Thanatephorus pennatus* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of *Calypso bulbosa* from mycorrhizal roots Can. J. Bot. 65: 1957-1960
- CURRAH, R. S., HAMBLETON, S. and SMRECIU, A., 1988. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of *Calypso bulbosa*. Amer. J. Bot. 75 (5): 739-752.
- CURRAH, R. S., SMRECIU, E. A. and HAMBLETON, S., 1990. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum*. Can. J. Bot. 68: 1171-1181.
- DIJK, E., 1987. Mycorrhizas of orchids. Orchideen. 49:6, 197-202; 26 ref.
- GARRETT, S. D., 1981. Soil fungi and soil fertility. 2nd. Edition, Pergamon. Oxford, 150 pp.
- HACSKAYLO, E., 1969. Mycorrhizae. U. S. Government Printing Office. Washington

- HUDSON, H.J., 1986. Fungal Biology. Edward Arnold, London 198 pp.
- INGOLD, C. T. and HUDSON, H. J., 1993. The Biology. Sixth Edition Chapman Hall. London, 224 pp.
- KNUDSON, L., 1929. Physiological investigations on orchid germination. Proc. Int. Congr. Plant. Sci. 2, 1183-1189.
- MASUHARA, G. and KATSUYA, K., 1989. Effects of mycorrhizal fungi on seeds germination and early growth of three Japanese terrestrial orchids. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., Vol. 63, Pt, 4:345-353.
- MASUHARA, G. and KATSUYA, K., 1991. Fungal coil formation of *Rhizoctonia repens* in seedlings of *Galeola septentrionalis* (Orchidaceae). Bot. Mag. Tokyo. 104: 275-281.
- MASUHARA, G., KIMURA, S. and KATSUYA, K., 1988. Seasonal changes in the mycorrhizae of *Bletilla striata* (Orchidaceae). Trans. Mycol. Soc. Japan 29: 25-31.
- PAPAVIZAS, G.C., ADAMS, P.B., LUMSDEN, R.D., LEWIS, J.A., DOW, R.L., AYERS, W.A., and KANTZES, J.G., 1975. Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. Phytopathology. 65: 871-877.
- PARMETER, J. R., 1970. *Rhizoctonia solani*. Biology and Pathology, University of Press, Berkeley, 255 pp.
- PETERSON, R.L., and CURRAH, R.S., 1990. Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*. Can. J. Bot. 68: 1117-1125.

- RASMUSSEN, H., ANDERSEN, T.F., and JOHANSEN, B., 1990. Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant, Cell and Environment*. 13, 171-177.
- RASMUSSEN, H., JAHANSEN, B. and ANDERSEN, T.F., 1989. Density-dependent interactions between seedlings of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) in symbiotic in vitro culture. *Physiologia Plantarum*. 77: 473-478.
- ROBERTS, D. L., and HERR, L.S., 1979. Superiority of a soil debris isolation method over a beet seed colonization method for assay of *Rhizoctonia solani* at high soil inoculum densities. *Can. J. Microbiol*, 25: 1110-1113
- SEZİK, E., 1984. *Orkidelerimiz*. Sandoz Kültür Yayınları. No: 6. 166.
- SMRECIU, E.A. and CURRAH, R.S., 1989. Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe. *Lindleyana*. (1): 6-15.
- SNEH, B., BURPEE, L., and OGOSHI, A., 1991. Identification of *Rhizoctonia species*. APS. Press, St. Paul, Mn. 133 pp.
- TSUTSUI, K. and TOMITA, M. 1988. Differences in the symbiotic capacity among isolates of mycorrhizal fungi on some terrestrial orchids. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, Vol 63, Pt. 4:345-353.
- TSUTSUI, K. and TOMITA, M., 1989. Effect of plant density on the growth of seedlings of *Spiranthes sinensis* Ames and *Liparis nervosa* Lidl. in symbiotic culture. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 57 (4): 668-673.

- TSUTSUI, K., and TOMITA, M., 1990. Suitability of several carbohydrates as the carbon sources for symbiotic seedling growth of two orchid species. *Lindleyana* 5 (2): 134-139.
- WILKINSON, K.G., DIXON, K.W., and SIVASITHAMPARAM, K., 1989. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. *New Phytol.* 112, 429-435.



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yönetimini üzerine alan Sayın Hocam Prof.Dr. Mehmet Biçici'ye, çalışmalarım sırasında her türlü yardımı esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali Erkiliç'a, Prof.Dr. Erdal Şekeroğlu'na, manevi desteğini hiç bir zaman esirgemeyerek bana destek olan aileme ve sevgili arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim.



ÖZGEÇMİŞ

1968 yılı K.Maraş doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi K.Maraş'ta tamamladım. 1987 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde yüksek öğrenimime başlayıp 1991 yılında mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde master programına başladım.



YÜCE ÖĞRENCİ
KUTAN - KUTAN