

## *Serapias orientalis*'in mikorizal fungus çeşitliliği

### *Mycorrhizal fungi diversity of Serapias orientalis*

Vildan AKIN MUTLU<sup>1</sup>  Hamdiye ŞEHİRLİ<sup>1</sup>  Yasemin ÖZDENER KÖMPE<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye

#### Eser Bilgisi / Article Info

Araştırma makalesi / Research article

DOI: 10.17474/ artvinofd.701282

Sorumlu yazar / Corresponding author

Vildan AKIN MUTLU

e-mail: vildanakin@hotmail.com

Geliş tarihi / Received

09.03.2020

Düzeltilme tarihi / Received in revised form

26.08.2020

Kabul Tarihi / Accepted

01.09.2020

Elektronik erişim / Online available

17.09.2020

#### Anahtar kelimeler:

*Serapias orientalis*

Mikoriza

Fungus

Çeşitlilik

ITS

#### Keywords:

*Serapias orientalis*

Mycorrhizal

Fungi

Diversity

ITS

#### Özet

Orkideler, yumrularının aşırı toplanması ve habitatlarının ciddi şekilde tahrip olması sonucu yok olma tehdidi altındadır. Doğada orkidelerin korunması mikorizal fungus biyolojik çeşitliliğinin varlığına bağlıdır. Bu çalışmada, Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde 4 ilin (Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon) sınırları içinde farklı habitatlardan toplanan *Serapias orientalis* (Greuter ) Bauman H, Künkele köklerindeki mikorizal fungusların moleküler tanımlaması yapılmıştır. Bitki kökleri 2015 bahar aylarında toplanmış ve önce mikroskopta incelenerek mikorizal funguslar izole edilmiştir. Saflaştırılan izolatlar, koloni özellikleri (koloni tipi, koloni rengi), hif yapısı (hif çapı ve dallanma yapısı) ve çekirdek sayılarının belirlenmesi amacıyla PDA (patates dektroz agar) ortamında geliştirilmiştir. İzolatları morfolojik özelliklerine göre gruplandırmak için küme analizi (UPGMA) yöntemi uygulanmış ve kladogram oluşturulmuştur. Kümeleme analizine göre oluşturulan 3 grubun izolatlarını moleküler düzeyde tanımlayabilmek için ITS-1 ve ITS-4 primerleri kullanılarak nükleer ribozomal DNA (rDNA)'nın ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesi çoğaltılmıştır. DNA dizilimine dayanarak, 13 *Rhizoctonia* benzeri izolatın *Tulasnella* cinsi ile 2 *Rhizoctonia* benzeri olmayan izolatın *Fusarium oxysporum* Schldl. türü ile yakın ilişkili olduğu bulunmuştur.

#### Abstract

Orchids are under a serious threat of extinction as a result of both excessive collecting and severe destruction of their habitats. Studies conducted have shown that the protection of orchids depends on the presence of mycorrhizal fungal biodiversity. In this study, molecular identification of mycorrhizal fungi of *Serapias orientalis* roots taken from different habitats within the borders of 4 provinces (Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon) in the Central and Eastern Black Sea region was conducted. Plant roots were collected in the spring of 2015 and first examined under a microscope and then mycorrhizal fungi were isolated. Purified isolates were developed in PDA (potato dextrose agar) medium in order to determine colony characteristics (colony type, colony color), hif structure (hif diameter and branching structure) and core numbers. Cluster analysis (UPGMA) method was applied to group the isolates according to their morphological characteristics and a cladogram was created. Nuclear ribosomal DNA (rDNA)'nın ITS 1-5.8S-ITS 2 gene region was amplified using ITS 1/ITS 4 primers in order to identify isolates of 3 groups formed according to morphological data at the molecular level. Based on the DNA sequence, 13 *Rhizoctonia*-like isolates were closely related to the *Tulasnella* genus, and 2 *Rhizoctonia*-unlike isolates were closely related to the *Fusarium oxysporum*.

## GİRİŞ

Orchidaceae familyası Asparagales takımı içerisinde yer almaktadır (Gabel 2005). Dünyanın en geniş bitki familyalarından biri olup, yaklaşık 800 cinse dahil 28000 orkide türü ile temsil edilmektedir. (Dressler 1993). Orkideler epifitler, litofitler, saprofitler ve karasal orkideler olmak üzere dört grupta toplanabilir (Sezik 1984). Türkiye'de doğal yayılış gösteren karasal orkidelerdendir (Koyuncu ve ark. 2011).

Orkide tohumları endosperme sahip değildir ve proembriyoları çok az besin içermektedir. Besin içeriklerinin yetersiz olması, orkide tohumlarını çimlenme ve fide gelişimi için funguslara bağımlı kılmaktadır (Rasmusen 1995, Stark ve ark. 2009).

Yetişkin orkideler ile mikorizal funguslar arasındaki ilişkinin spesifik olduğu ve bunun orkide-fungus türlerine göre ve coğrafi bölgelere göre değiştiği bilinmektedir (Rasmussen ve Rasmussen 2007, Valadares ve ark. 2015).

Orkideler ile ilişkili bulunan çoğu fungusun *Rhizoctonia* form cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Herrera ve ark. 2017). Doğada veya laboratuvarında eşeyli dönemleri nadiren görülen *Rhizoctonia* cinsine dahil bireyler öncelikle belirli vejetatif kriterlere göre sınıflandırılmaktadır. En önemli morfolojik özellikler, çekirdek sayısı, doksan derecelik hif dallanması ve septumların yeridir (Sneh ve ark. 1991) Eşeysiz (anamorf) üremelerine göre *Rhizoctonia* cinsi, *Ceratohiza* (telemorf: *Ceratobasidium* ve *Thanatephorus* dahil) ve *Epulorhiza* (telemorf: *Tulasnella* ve *Sebacina* dahil) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (Dearnaley ve ark. 2012). Vejetatif kriterlere göre yapılan tanımlamalar birbirinden uzak akraba fungusların birlikte gruplandırılmasına neden olduğundan, günümüzde moleküler taksonomi *Rhizoctonia* cinsine dahil fungusların sistematiğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kristiansen ve ark. 2001, Otero 2002).

Türkiye'de 24 cinse ait yaklaşık 170 civarında orkide türü bulunmaktadır (Kreutz, 2009). Türkiye'de yumru orkideler salep ve dondurma yapımı için aşırı toplanmaktadır. Gerek ticari amaçla aşırı toplanması, gerekse habitatlarının tahribatı sonucu ciddi yok olma tehdidi altındadırlar (Sezik 2002 Ghorbani ve ark. 2014a). Türkiye bitkileri listesine göre *Serapias* cinsine dahil 5 tür Türkiye'de bulunmaktadır (Güner 2012). *Serapias orientalis*, Orta ve Doğu Karadeniz bölgesinde taban suyu yüksek çayırliklarda ve nemli orman kenarlarında, fındık bahçelerinde ve çoğunlukla deniz seviyesinden 100 m yüksekliğe kadar yayılış gösterebilmektedir. Genellikle Nisan ayında çiçek açtığı ve Temmuz ayında tohum oluşturduğu bilinmektedir (Güner 2012). Bu tür, çiçeklenme safhasında iken bölge halkı tarafından salep yapımı için yumruları sökülmemektedir. *Serapias orientalis* türü yok olma kategorisinde olmamakla beraber Türkiye'de her sene aşırı yumru sökülmesi sebebiyle doğada sayıları her geçen gün azalmaktadır (Anonim 2015b).

Koruma problemleri olduğu bilinen orkide türlerinin korunması ve ekolojik restorasyonu için ilk uygulama, orkide türü ile ilişkili fungusların izolasyonu, teşhisi ve *in vitro* kuşullarda koruma altına alınmasıdır. Bir başka deyişle, koruma ve restorasyon çalışmaları, uygun funguslar ile orkide tohumlarının simbiyotik birlik kurarak

sağlıklı genç orkide bireylerinin oluşması ve doğaya adaptasyonlarının sağlanması ile mümkün olacaktır (Ramsay ve Dixon 2003, Pereira ve ark. 2018).

Bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmanın amacı, Karadeniz Bölgesindeki farklı habitatlarda yaygın olarak bulunan *Serapias orientalis* kökleri ile mikorizal birlik kuran fungusların izole edilerek morfolojik ve moleküler teşhislerinin yapılması ve daha sonra yapılacak tohum çimlenmesi yoluyla üretim çalışmaları için gerekli fungus koleksiyonunun oluşturulmasıdır.

## MATERYAL VE METOD

### Araştırma Alanı ve Bitki Örneklerinin Toplanması

*Serapias orientalis* kökleri, 2015 yılının Nisan-Mayıs aylarında Trabzon, Giresun, Ordu, Ordu -Ünye, Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi kampüs sahası içinde 4 ayrı lokalite, Samsun-Taflan ve Samsun-19 Mayıs ilçesi sınırları içindeki taban suyu yüksek çayırliklardan olmak üzere toplam 10 farklı lokaliteden toplanmıştır. Kökler plastik torbalar içinde laboratuvara getirilmiştir. Her lokaliteden 2'şer bitkinin tüm kökleri fungus izolasyonu için kullanılmıştır.

### Fungus İzolasyonu

Bütün kökler musluk suyu altında yıkanıp toprak kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kökler parçalara ayrılarak %1.5'lik NaOCl ile 5 dakika steril edildikten sonra steril saf su ile çalkalanarak NaOCl uzaklaştırılmıştır. Kök parçaları steril petri kabında küçük parçalara ayrılmış ve içinde fungus izolasyon ortamı olan petrilere konulmuştur (Clements ve ark. 1986). Petri kapları  $26 \pm 2$  °C'de karanlıkta 2 gün inkübe edilmiş ve fungal hifler gelişince 5mm parçalar alınıp fungus izolasyon ortamına (0.50 g L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.20 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.10 g L<sup>-1</sup> KCl, 0.10 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.10 g L<sup>-1</sup> Yeast ekstrat, 5.0 g L<sup>-1</sup> sükröz g L<sup>-1</sup>, 10.0 g L<sup>-1</sup> agar) aktarılmıştır (Clements ve ark.1986). İnkübasyon süresi sonunda petrilere Leica marka ışık mikroskopunda  $\times 10$ 'luk büyütmede incelenmiştir. (Akın 2001). Mikroskopik inceleme sırasında genç vejetatif hiflerde dik açılı dallanma, dallanma noktasında bir daralma ve dallanma noktasında başlangıç noktasına yakın bir septum sıklıkla, monilioid hücreler olarak bilinen şişirilmiş hipha zincir ve konidi oluşturmeyen funguslar *Rhizoctonia* benzeri ve konidi oluşturan, genç vejetatif

hiflerde düzensiz dallanma gösteren, hiflerde dik açılı dallanma ve hif boğumlanması görülmeyen funguslar *Rhizoctonia* benzeri olmayan olarak tanımlanmıştır (Sneh ve ark. 1991).

Son olarak saf funguslar, içinde fungus izolasyon ortamı olan kapaklı tüplere aşıl原因arak +4 °C'de saklanmıştır.

### **Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Kültürel ve morfolojik özellikleri belirlenecek örnekler önce PDA (Oxoid, CM0139) ortamında, 26 ±2°C karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Aktifleştirilen izolatların uç bölgelerinden alınan 5 mm çapındaki agar diskleri, içerisinde PDA (Oxoid) ortamı bulunan petrilerin merkezine aşıl原因ıp (Olaya ve ark. 1994) karanlıkta 25°C'de 3 hafta inkübe edilmiştir (Carling ve ark. 1987).

İnkübasyon işleminden sonra izolatların koloni rengi (kültür altı, kültür üstü pigmentasyonları) Royal Horticultural Society renk kataloğuna göre belirlenmiştir. Hif çapı ve çekirdek sayıları belirlemek için her bir izolattan 5 mm'lik agar diskleri, birer damla safranin O ve %3'lük KOH damlatılmış olan lam üzerine konulmuş ve Bandoni (1979)'nin belirttiği yöntemle boyanmıştır. Işık mikroskopunda ×400 büyütmede her izolat için 15 hücrede hem çekirdek sayımı hem de hif çapı ölçümü eş zamanlı olarak yapılmış ve fotoğraflanmıştır (Akın 2001). Denemeler her izolat için üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Buna göre izolatların çekirdek sayıları iki çekirdekli ya da çok çekirdekli olarak belirlenmiştir (Olaya ve Abawi 1994). Kültürel ve morfolojik özellikleri belirlenen izolatların benzerliklerini (veya farklılıklarını) ortaya koymak için PAleontolojik İstatistik (PAST: PAleontological STatistics) programı kullanılmıştır (Hammer ve ark. 2001). Morfolojik özellikler, Aritmetik Ortalama ile Ağırlıksız Çift Grup Yöntemi (UPGMA: Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages) kullanılarak kümeleme yapılmış ve fenogram çizilmiştir (Cruz 2008).

### **Fungusların Moleküler Analizi**

Moleküler olarak teşhisleri yapılacak örnekler önce PDB (Oxoid, CM0962) ortamında, 25° C'de, karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Daha sonra gelişen fungus miselleri sıvı azot yardımıyla toz haline gelinceye kadar ezilip steril 1.5 ml'lik ependorflar içine konarak 50 °C'de saklanmıştır (Carling ve ark. 1987). Fungus misellerinden DNA

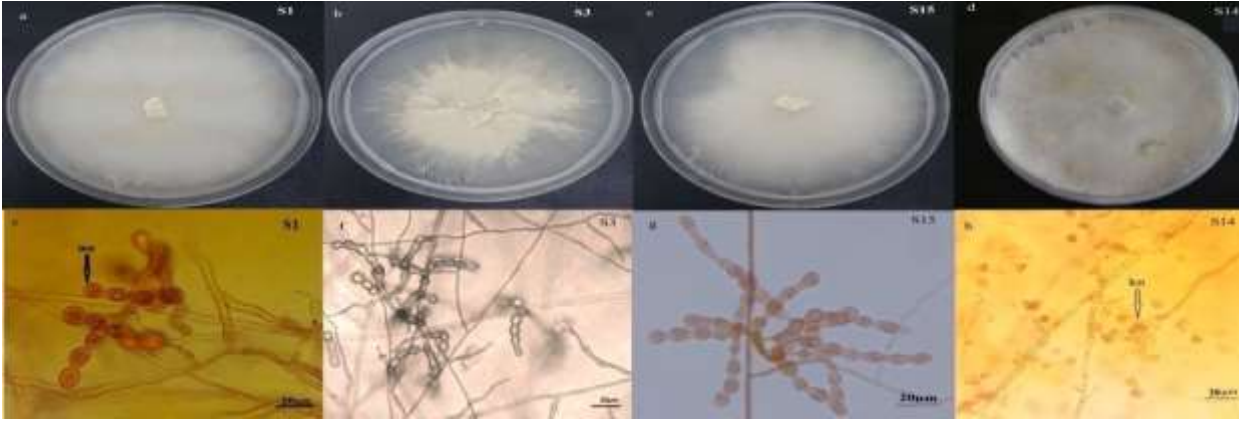
izolasyonu, Pascual ve ark. (2000) tarafından belirtilen CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır. DNA'sı elde edilen izolatların nüklear ribozomal DNA (rDNA)'nın ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesinin amplifikasyonu için ITS-1 ve ITS-4 primerleri (White ve ark. 1990) kullanılarak 50 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımında 1µl kalıp DNA (1ng/µl), 5µl 10XPCR buffer, 4µl 2.5 mM dNTP karışımı, 1µl Primer ITS-1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve 1µl Primer ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 0.25µl (5U) Taq polimeraz, 37.75µl steril ddH<sub>2</sub>O kullanılmıştır. PCR için uygulanan sıcaklık profili; başlangıç denatürasyonu 94°C 3dk, denatürasyon 94°C 1dk, yapışma 49°C 2dk, uzama 74°C 3dk, son uzama 72°C 7dk olacak şekilde 30 döngülük reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Salazar ve ark. 1999). Amplifikasyonu gerçekleştirilen her bir PCR ürününün 1 µl'si hazırlanan %1'lik agaroz jelde 80 voltta 30 dakika koşturularak ürün varlığı doğrulandıktan sonra elde edilen ürünler sekanslama (dizileme) işlemleri için Macrogen firmasına gönderilmiştir. İzolatların ITS-1 ve ITS-4 primerleri kullanılarak iki yönlü okunan ham sekans verilerinin konsensusunu elde etmek amacıyla Sequencher 4.7 Demo programı kullanılmıştır. NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri bankasına girilip elde edilen diziler için BLAST analizi yapılmıştır. Bu analize göre mevcut dizilerimize veri bankasından aldığımız ilişkili diziler eklenerek veri seti oluşturulmuştur. Veri seti SeqMan programıyla bir araya getirilmiş ve CLUSTAL X (2.0) programında diziler otomatik olarak hizalanmıştır. (Thompson ve ark.1997) Filogenetik ağaçların oluşumunda temel değişim modelinin doğru seçimi için jModeltest programı kullanılmıştır (Posada 2008). İzolatların kimliği ve aralarındaki filogenetik ilişkileri ortaya koymak amacıyla MEGA 6 software programında Maximum likelihood (ML) algoritması ile ağaç oluşturulmuştur (Tamura ve ark. 2013).

### **BULGULAR**

Doğu ve Orta Karadeniz 'de farklı lokalitelerden alınan *Serapias orientalis* türüne ait bireylerin köklerinden toplam 15 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar morfolojik özelliklerine göre *Rhizoctonia* benzeri (Basidiomycetes)

ve *Rhizoctonia* benzeri olmayan (Ascomycetes) olarak ikiye ayrılmıştır (Şekil 1). Bu izolatlardan %86'sı *Rhizoctonia* %14'ü *Fusarium* cinsi olarak belirlenmiştir. Her iki gruptaki izole edilen fungusların morfolojik özellikleri (hif çapı, çekirdek sayısı, koloni rengi, koloni görünümü) belirlenmiştir (Çizelge 1, Şekil 1). PDA ortamında iki hafta boyunca karanlıkta  $26 \pm 2$  °C'de inkübasyona bırakılan *Rhizoctonia* cinsine ait izolatların

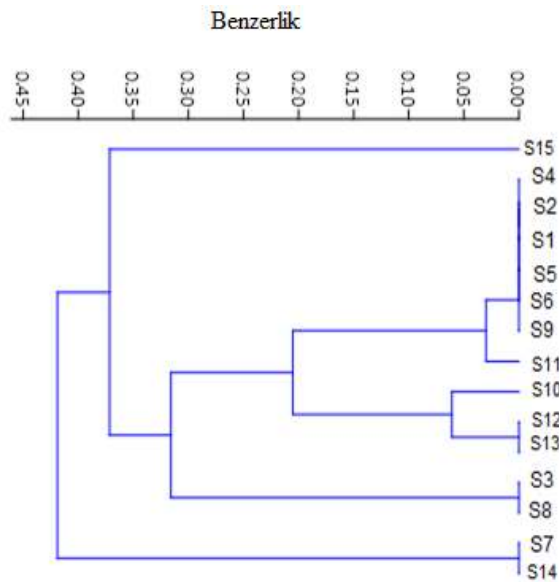
koloni rengi grimsi sarı, turuncu- beyaz ve grimsi sarı beyaz iken, *Rhizoctonia* dışı izolatların koloni renkleri grimsi-sarı olarak belirlenmiştir. *Rhizoctonia* cinsine ait izolatların tümünün 2 çekirdekli (binükleat) olduğu ve hif çaplarının da 2.5-5.01 µm arasında değiştiği, *Rhizoctonia* olmayan izolatların ise 3 çekirdekli (multinükleat) ve hif çaplarının 3.8 µm olduğu görülmüştür (Çizelge 1).



Şekil 1. Serapias orientalis izolatlarının koloni görünümü ve hif yapıları: (a-b-c) *Rhizoctonia* benzeri (S1-S3-S15) koloni görünümü (d) *Rhizoctonia* benzeri olmayan (S14) koloni görünümü (e-f-g) *Rhizoctonia* benzeri (*Tulasnella*) hif ve monoloid görünümü (f) *Rhizoctonia* benzeri olmayan (*Fusarium* sp.) hif görünümü ve konidi görünümü .mn=moniloid, kn=konidi

Elde edilen izolatlar arasında morfolojik özelliklerin benzerlik ve farklılıklarını bulmak için küme analizi (UPGMA) yöntemi kullanılmış ve sonuç olarak, %40-45 benzerlik aralığında birbirinden çok uzak iki grupta

toplanmış. Birinci grupta *Rhizoctonia* benzeri olmayan izolatlar (S7, S14), ikinci grupta ise *Rhizoctonia* benzeri izolatlar (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S15) kümelendi (Şekil 2).



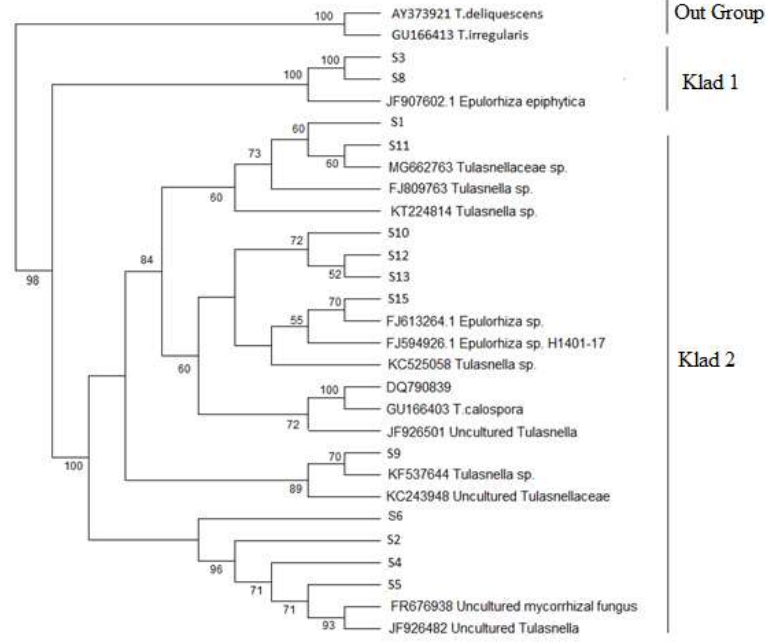
Şekil 2. Serapias orientalis funguslarının morfometrik verilere dayanan UPGMA-dendrogramı.

Morfolojik verilere göre 2 grupta kümelenmiş olan izolatların moleküler tanımlaması için ITS1 ve ITS4 primerleri ile çoğaltılmış ITS gen bölgeleri sekanslanmıştır. İzole edilen konsensüs dizilerinin, Blast analizi Genbank (NCBI) veri tabanında depolanan dizilerle karşılaştırılmıştır (Çizelge 1). Blast sonucuna göre bitki köklerinde sıklıkla görülen fungusun *Tulasnella* cinsine ait olduğu görülmüştür. İzole edilen fungus dizileri ile NCBI veri tabanında eşleşen ve benzerlik oranı %99'un üzerinde olan diziler seçilerek veri seti oluşturulmuştur. JModelTest programı sonucuna göre *Tulasnella* ve *Fusarium* izolatları için en uygun baz değişim modelinin Kimura-2 olduğu ve gama değerlerinin sırasıyla 0.419, 0.328 olduğu belirlenmiştir. Belirlenen değişim modeli değerleri ile fungusların filogenetik ilişkileri, Mega 6 programında Maximum likelihood (ML) algoritması ile belirlenmiştir.

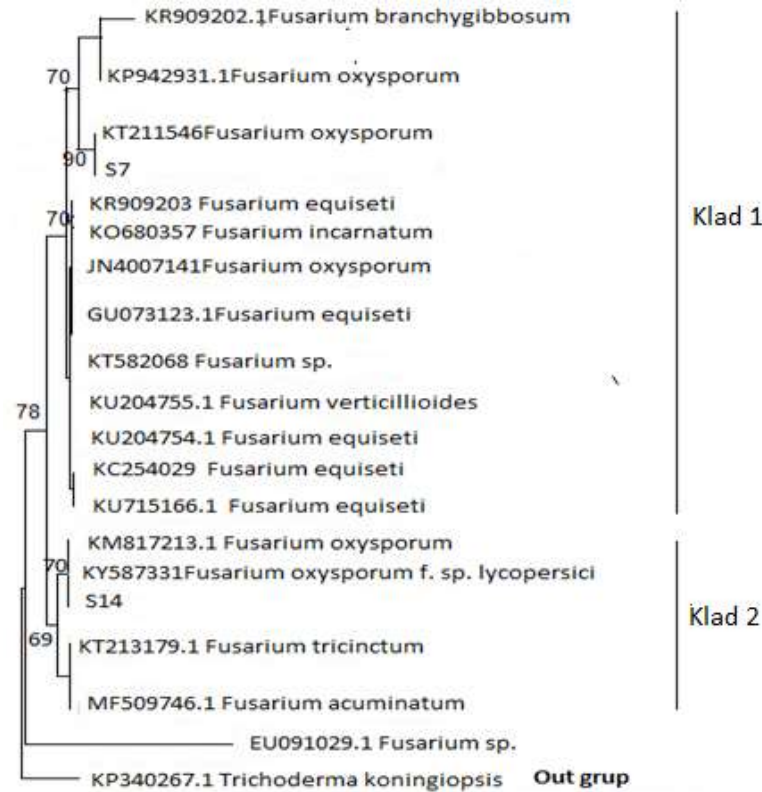
Filogenetik ağaca dayanarak, *Tulasnella* türlerinin izolatları iki ana klad (küme) olarak gruplanmıştır. *Tulasnella* türleri için oluşturulan veri seti, 13 fungus izolatı dizisini ve NCBI'den alınan 16 referans dizisini içermektedir. Veri kümesinde toplam 128 konum vardır. Klad1 de S3 ve S8 sekansları (%100 ML) *Epulorhiza epiphytica* (JF907602.1) ile ilişkili çıkmıştır. S1, S2, S5, S6, S7, S9, S10, S11, S12, S13ve S15 sekansları (%100) *Tulasnella* cinsi izolatlar klad 2'de kümelenmiştir (Şekil3). *Fusarium* türlerinin izolatları, % 78 bootstrap değerine sahip iki ana grupta gruplanmıştır (Şekil 4). *Fusarium* izolatları için oluşturulan veri kümesi, 2 fungus izolatı ve NCBI'den alınan 18 referans dizisi içermektedir. S7 izolatı % 90 bootstrap değeri ile *F. oxysporum* (KT211546) izolatı ile ilişkili görülmüştür. S14 izolatı ise %70 bootstrap değeri ile *F. oxysporum* (KM817213) ve *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) WC Snyder ve HN (KY587331) izolatının bulunduğu küme ile ilişkilidir (Şekil 4).

**Çizelge 1.** Serapias orientalis köklerinden izole edilen mikorizal funguslarının morfolojik ve moleküler özellikleri

Sekans No	Genbank (NCBI) Aksesyon Numarası	Lokalite	Koloni tipi	Koloni rengi	Çekirdek sayısı	Hif çapı	Baz çifti Uzunluğu (bp)	Filogenetik İlişki GenBank ile en yakın eşleşme	Sekans Benzerliği (%)	Aksesyon Numarası
S1	MT509572	Samsun OMÜ Kampüs 1	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	2	2,5µm	543	<i>Tulasnella</i> sp.	99	KF537644
S2	MT506704	Samsun OMÜ Kampüs 1	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	2	2,5µm	640	<i>Tulasnella</i> sp.	100	KT224814
S3	MT507055	Samsun OMÜ Kampüs 2	Besiyerine batık	Turuncu-beyaz	2	2,5µm	644	Uncultured <i>Tulasnellaceae</i>	100	KC243948
S4	MT508980	Samsun OMÜ Kampüs 2	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	2	2,5µm	562	<i>Tulasnella</i> sp.	99	FJ809763
S5	MT512506	Samsun OMÜ Kampüs 3	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	2	2,5µm	661	Uncultured <i>Tulasnellaceae</i>	100	KC243948
S6	MT508985	Samsun OMÜ Kampüs 4	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	2	2,5µm	565	<i>Tulasnella</i> sp. MUT4217	100	KC525058
S7	MT509562	Samsun OMÜ Kampüs 4	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	3	3.8 µm	690	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	KT211546
S8	MT508830	Samsun-AtakumTaflan	Besiyerine batık	Turuncu-beyaz	2	2,5µm	538	Uncultured <i>Tulasnella</i> clone SV16a	99	JF926501
S9	MT508670	Ordu	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	2	2,5µm	450	Uncultured mycorrhizal fungus	99	FR676938
S10	MT508632	Samsun-19 Mayıs	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	2	5,01	556	Uncultured <i>Tulasnella</i> clone	100	JF926482
S11	MT508979	Giresun	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	2	2,844	453	<i>Tulasnellaceae</i> sp.	100	MG662763
S12	MT506974	Samsun-19 Mayıs	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	2	4,489	457	Uncultured <i>Tulasnella</i> clone OF9	100	JF926482
S13	MT508593	Trabzon	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	2	4,489	356	Uncultured <i>Tulasnella</i> clone OF9	100	JF926482
S14	MT508558	Ordu	Besiyerine batık	Grimsi Sarı	3	3.882	520	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	99	KY587331
S15	MT508556	Ordu-Ünye	Havai hif	Grimsi Sarı-beyaz	2	3.161	632	<i>Epulorhiza</i> sp. H1401-17	99	FJ594926



Şekil 3. *Tulasnella* cinsi fungusların ITS rDNA nükleotid dizilerinin filogenetik ilişkilerini gösteren ML ağacı.



Şekil 4. *Fusarium* cinsi fungusların ITS rDNA nükleotid dizilerinin filogenetik ilişkilerini gösteren ML ağacı.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Salep ve dondurma yapmak için yumrularının aşırı toplanması, orkide türlerini yok olma tehdidine maruz bırakmaktadır. Orkidelerin doğada tohumdan çoğalmasını sağlayan faktör uygun mikorizal funguslardır.

Bununla birlikte, Türkiye’de gerek orkide mikorizal fungus çeşitliliği gerekse orkide-fungus ilişkisi hakkında detaylı çalışmalar son derece sınırlıdır. Bazı *Dactylorhiza* (Kompe ve Mutlu 2017) ve *Orchis* (Mutlu ve Kömpe 2020) cinslerine dahil bazı türlerin mikorizal fungus çeşitliliği morfolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenip bu türlerin

fungus koleksiyonu oluşturulmuştur. Bununla birlikte Türkiye'de yaklaşık 170 civarında orkide türü bulunmakta ve bunların fungusları üzerinde henüz araştırma yapılmamıştır.

Bu çalışmada *Serapias orientalis*'in farklı lokalitelerdeki bireylerinin mikorizal fungusları izole edilip morfolojik ve moleküler yöntemlerle teşhis edilmiştir. Orkideler sıklıkla *Rhizoctonia* cinsine ait Basidiomycetes ile ilişkilidir (Rasmussen 1995, Brundrett 2007 Otero ve ark. 2013 Pereira ve ark. 2014, Herrera ve ark. 2017). Pecararo ve ark. (2015)'nin yaptığı bir çalışmada *Ophrys bertolanii* Mor bitkisinin kökleriyle ilişki funguslarının moleküler tanımlaması yapılmış ve analiz edilen orkide kök örneklerinde çoğunlukla Basidiomycetes ve az sıklıkta Ascomycota'ya ait birkaç mantar taksonu bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada *Serapias orientalis* funguslarının morfolojik özelliklerine göre birbirleriyle olan yakınlık dereceleri, UPGMA yöntemi kullanılarak ortaya konulmaktadır. Oluşturulan fenogramda 0.45-0.40 aralığında iki farklı küme (*Rhizoctonia* benzeri ve *Rhizoctonia* benzeri olmayan) oluşmuştur. UPGMA klodogramına göre, *Rhizoctonia* benzeri (Basidiomycetes) fungusları üç komşu gruba ayrılırken, S15 izolatu diğer iki kümede (S1, S2, S3, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13) bulunan izolatlardan daha uzak bir kümeleme göstermiştir. *Rhizoctonia* benzeri olmayan (Ascomycetes) grubun diğerlerinden çok uzak iki izolat (S7-S14) ile temsil edildiği görülmektedir. Cruz ve ark. (2011)'nin yaptığı bir çalışmada fungus izolatlarının tanımlanmasında morfolojik yöntemlerin yaygın olarak kullanıldığı ifade edilmiştir. Buna karşın aynı türün kültürel özellikleri (koloni rengi, morfolojisi ve büyüme oranına, koloni tipi) arasında farklılıkların görülmesinden dolayı moleküler tanımlamaların yapılmasının zorunlu olduğu bildirilmiştir (Horton ve Bruns 2001 Dearnley ve ark. 2012). Brezilya'da yürütülen benzer bir çalışmada *Epidendrum scendrum* L.Sanches ve Hagsater köklerinden izole edilen funguslar morfolojik olarak tanımlaması yapılamamış ve moleküler karakterizasyon ile bu izolatların farklı *Tulasnella* türleri olduğu gösterilmiştir (Peraira ve ark. 2014).

Çalışmamızda *Tulasnella* filogenetik ağacındaki izolatlar iki klada ayrılmıştır. Klada 1 de bulunan S3 ve S8 fungus dizileri Brezilya'dan *Polystachya concreta*(Jacq.) Garay ve

H.R.Sweet köklerinden izole edilen *Epulorhiza epiphytica* (FJ907602.1) türlerine yüksek oranda (%100) benzerlik gösterdiği görülmüştür. Klada 2 de bulunan S1 ve S11 izolatları Amerika'dan *Platanthera praeclara* Sheviak ve M.L.Bowles (MG662763), İtalya'dan *Serapias vomeracea* (FJ809763) Çin'den *Dendrobium officinal* (KT224814), S10-12-13-15 numaralı fungal izolatlar Çin'den *Cymbidium faberi* (FJ613264), *Cymbidium goeringii* ve *Cymbidium faberi* (FJ594926), İtalya'dan *Serapias lingua* (KC5255058), S9 izolatu Çin'den *Liparis japonica* (KF537644) ve Çek Cumhuriyeti'nden *Gymnadenia conopsea* (KC243948), S-2-4-5-6 numaralı izolatlar Hollanda'dan *Orchis morio* (FR676938) ve İtalya'dan *Ophrys fuciflora* (JF926482)'dan izole edilen *Tulasnella* cinsleri ile kümelenebilir.

*Rhizoctonia* türlerinin *Orchis anthropoda*, *O. mascula*, *O. militaris*, *O. purpurea* ve *O. simia* (Jacquemyn et al. 2011), *Anacamptis laxiflora*, *Orchis purpurea*, *Ophrys fuciflora* ve *Serapias vomeracea* türleri ile mikorizal birlik kurdukları belirlenmiştir (Girlanda ve ark.2011). Birçok başka araştırma, karasal veya epifitik orkidelerin mikobiyotlarının *Tulasnella*, *Ceratobasidium*, *Sebacina* ve/veya *Pezizales* olduğunu göstermiştir (Taylor ve ark. 2002, Dearnley 2007, Girlanda ve ark. 2011). Akdeniz bölgesinde yapılan bir çalışmada 11 farklı habitattan alınan 16 orkide türünden *Ophrys* ve *Serapias* bireylerinin kökleriyle mikorizal birliğe katılan fungusun *Tulasnella* cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Pellegrino ve ark. 2014). Ege ve Akdeniz Bölgesi'nden toplanan orkide kökleri ile simbiyotik ilişki kuran fungusların *Fusarium*, *Rhizoctonia* ve *Papulaspora* cinslerine ait olduğu belirlenmiştir (Gezgin 2004). Dört *Dactylorhiza* türünde mikorizal birliğe katılan 9 fungal izolatu 3 adedinin *Tulasnella* 5 adedinin *Ceratobasidium* ve 1 adedinin *Verpa* cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Kompe ve Mutlu 2017). Bazı *Orchis* türlerinin köklerinden mikorizal birliğe katılan 10 binükleat *Rhizoctonia* türü izole edilip morfolojik ve moleküler tanımlamalar sonucunda 7 adedinin *Tulasnella* 2 adedinin *Ceratobasidium* ve 1 adedinin *Pezizaceae* cinsine ait olduğu belirlenmiştir (Mutlu ve Kömpe 2020).

Bu çalışmada, *Fusarium* filogenetik ağacındaki izolatlar %78 bootstrap değeri ile iki klada ayrılmıştır. S7 izolatu

*F.oxysporum* türü ile S14 izolatu ise *F.oxysporum f.sg lycopersici* türü ile ilişkili çıkmıştır.

*Fusarium oxysporum*'un bazı tropik orkidelerin tohum çimlenmesini teşvik ettiği gibi bazı orkidelerin de fide gelişimi sırasında köklerle mikorizal birlik oluşturduğu ortaya konmuştur (Ma ve ark. 2015). *F.oxysporum* fungusları genellikle orkidelerde endofit olarak bulunduğu bildirilmiştir (Ma ve ark. 2015, Sufaati 2016). *Serapias vomeracea* subsp. *laxiflora* bitkisinin köklerinden yoğun olarak *Fusarium* cinsine ait funguslar izole edilmiştir (Özkoç 1991).

Bu çalışmada Karadeniz bölgesinin dört farklı popülasyonundan örneklenen *Serapias orientalis* türünden elde edilen diziler, baskın fungusun *Tulasnella* sp. olduğunu ve 15 izolattan sadece 2'sinin *Fusarium oxysporum*'a ait olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız çalışma *Serapias orientalis* kökleri ile birlikteliğe katılan baskın fungusun *Tulasnella* cinsine ait olması *S. orientalis* ve *Tulasnella* cinsi arasında kuvvetli spesifik bir ilişki olduğunu işaret etmektedir. Aynı zamanda farklı popülasyonlardaki *S. orientalis* funguslarının *Tulasnella* ile ilişkili çıkması habitatlara göre varyasyonun olmadığını göstermektedir. Çalışmamızda, farklı lokalitelerde bulunan *Serapias orientalis* bitkilerinin mikorizal birliğine katılan fungusların çeşitliliği morfolojik ve moleküler tanımlama yöntemlerinin birlikte kullanılmasıyla daha kesin olarak belirlenmiş ve orkide fungus koleksiyonuna eklenmiştir.

Orkide türlerinin yeniden üretilmesi, korunması ancak uygun fungus türü mevcut olduğunda başarılı olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada *S. orientalis* türleri ile birliğe katılan fungusların izolasyonu, tanımlanması ve fungus koleksiyonu için stoklanması gelecekte *S. orientalis* türlerinin üretim ve yönetimini amaçlayan çalışmalar için olanak sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

Akın V (2001) Samsun İli Bafra, Ondokuzmayıs ve Tekkeköy ilçelerindeki Tarım Alanlarından İzole Edilen Patojen *Rhizoctonia* izolatları Üzerine Patojen Olmayan *Rhizoctonia* İzolatların

- Biyokontrol Etkisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, 60s.
- Anonim (2015b) T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Salep Eylem Planı 2014-2018
- Bandoni RJ (1979) Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia* 71: 873-874
- Brundrett MC (2007) Understanding the Roles of Multifunctional Mycorrhizal and Endophytic Fungi. *Microbial Root Endophytes* 21: 138-146. doi: 10.1007/3-540-33526-9\_16
- Carling DE, Leiner RH, Keblers KM (1987) Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 77: 1609-1612
- Clements MA, Muir H, Cribb PJ (1986) A Preliminary Report on the Symbiotic Germination of European Terrestrial Orchids, *Kew Bull.* 41(2): 437-445
- Cruz CD (2008) Programa Genes: Aplicativo computacional em genética estatística. Versão para Windows. Viçosa: Editora UFV
- Cruz D, Sua' rez JP, Kottke I, Piepenbring M and Oberwinkler F (2011) Defining species in *Tulasnella* by correlating morphology and nrDNA ITS-5.8S sequence data of basidiomata from a tropical Andean forest. *Mycol Prog* 10:229-238
- Dearnaley JDW (2007) Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6): 475-486. Doi:10.1007/s00572-007-0138-1. PMID:17582535
- Dearnaley JD, Martos F, Selosse, MA (2012) Orchid mycorrhizas: Molecular ecology, evolution and conservation aspects. In Hock B. (ed.), *The Mycota IX*: 207-230. Springer, Berlin
- Dressler RL (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family* Cambridge Cambridge University Press ISBN 9780521450584, Hong Kong
- Gabel R (2005) The role of CITES in orchid conservation. *Endangered Species Bulletin*. September. [http://findarticles.com/p/articles/mi\\_m0ASV/is\\_2\\_30/ai\\_n15763452](http://findarticles.com/p/articles/mi_m0ASV/is_2_30/ai_n15763452).
- Gezgin Y (2004) Çeşitli salep (orkide) türlerinde mikoriza oluşturan fungusların izolasyonu ve tanımlanması ile inokulant olarak kullanım olanaklarının incelenmesi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, İzmir,
- Ghorbani A, Gravendeel B, Naghibi F, de Boer HJ (2014 a) Wild orchid tuber collection in Iran: a wake-up call for conservation. *Biodiversity and Conservation*, 23: 2749-2760.
- Girlanda M, Segreto R, Cafasso D, Liebel HT, Rodd, M, Ercole E, Cozzolino S, Gebaue G, Perotto S (2011) Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *Amer.J. Bot.*, 98: 1148-1163.
- Güner A (2012) *Iris L.in Turkey Plants List (Vascular Plants)*, Edited by Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT, İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanical Garden and Flora Research Association Publication, 535-5.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electronica* 4 (1):4 pp 9 <http://palaeo-electronica.org>
- Herrera H, Valadares R, Contreras D, Bashan Y, Arriagada C (2017) Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal Range and Andes in south central Chile. *Mycorrhiza*, 27: 175-188
- Horton TR, Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol Ecol* 10: 1855-1871
- Jacquemyn H, Honnay O, Cammue BPA, Brys R, Lievens B (2011). Low specificity and nested subset structure characterize mycorrhizal associations in five closely related species of the genus *Orchis*. *Mol.Ecol.*,19: 4086-4095.



- Kreutz CAJ (2009) Türkiye Orkideleri Botanik Özellikler, Ekolojik İstekleri, Doğal Yayılış Alanları, Yaşam Tehditleri, Koruma Önlemleri, Rota Yayınları, İstanbul
- Kristiansen KA, Rasmussen FN, Rasmussen HN (2001) Seedlings of *Neuwiedia* (Orchidaceae subfamily Apostasioideae) have typical orchidaceous mycotrophic protocorms. *Amer. J. Bot.* 88: 956-959
- Koyuncu O, Yaylacı ÖK, Öztürk D, Erkara İP, Ardiç M (2011) Distribution, elements of destruction and evaluation of risk categories of Orchids in Osmaneli (Bilecik/Turkey) and its environs. *Biological Diversity and Conservation*, 4(1):117-128
- Kompe YO, Mutlu VA (2017) Mycorrhizal diversity in some species of *Dactylorhiza* genus (Orchidaceae). *Biol.Div.Con.* 10(1): 55-64.
- Ma X, Kang J, Nontachaiyapoom S, Wen T, Hyde KD (2015) Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Curr.Sci.* 109: 72–87
- Moore RT (1987) The genera of Rhizoctonia-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratohiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis* and *Rhizoctonia*. *Mycotaxon* 29: 91-99
- Mutlu VA, Kömpe YO (2020) Mycorrhizal Fungi Of Some Orchid Species of Turkey. *Pak.J.Bot.*,52(2): Doi: [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-2\(42\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2020-2(42))
- Olaya G, Abawi GS, Barnard J (1994) Response of *Rhizoctonia solani* and Binucleate rhizoctonia to five fungicides and control of pocket rot of table beets with foliar sprays. *Plant Dis.* 78: 1033–1037
- Olaya G, Abawi GS (1994) Characteristics of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* species causing foliar blight and root rot on table beets in New York State. *Plant Dis.*, 78: 800-804
- Otero JT, Ackerman JD, Bayman P (2002) Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *Am. J. Bot.* 89: 1852-1858. Doi: 10.3732/ajb.89.11.1852
- Otero JT, Mosquera AT, Flanagan NS (2013) Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. *Lankesteriana* 13:57-63
- Özkoç İ (1991) *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Briq. subsp. *laxiflora* (Soo) Gözl et. Reinhard ve *Orchis laxiflora* Lam. (Orchidaceae) tohumlarının simbiyotik ve asimbiyotik kültürlerde çimlenme ve gelişmesi üzerinde araştırılması., Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, Doktora tezi 40s
- Pascual CB, Toda T, Raymondo AD, Hyakumachi M (2000) Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathol.*, 49: 108-118
- Pecoraro L, Girlanda M, Liu ZJ, Huang LQ, Perotto S. 2015. Molecular analysis of fungi associated 578 with the Mediterranean orchid *Ophrys bertolonii* Mor. *Annals of Microbiology.* 65: 2001-2007.
- Pereira S, Zille A, Micheletti E, Moradas-Ferreira P, Philippis RD, Tamagnini PP (2009) Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol Rev* 33: 917-941
- Pereira MC, Coelho IS, Valadares RBS, Feliciano O, Bocayuva MF, Pereira OL, Araujo EF, Kasuya MCM (2014) Morphological and molecular characterization of *Tulasnella* spp. fungi isolated from the roots of *Epidendrum secundum*, a widespread Brazilian orchid. *Symbiosis* 62: 111-121
- Periera G, Suz LM, Albornoz V, Romero C, Garcia L, Leiva V, Atala C (2018) Mycorrhizal fungi associated with *Codonorchis iessonii* (Brongn) Lindl., a terrestrial from Chile. *Gayana Botánica* 75(1): 447-458
- Pellegrino G, Luca A, Bellusci F (2014) Relationships between orchid and fungal biodiversity: mycorrhizal preferences in Mediterranean orchids. *Plant Biosystems* 150 (2) :180-189 <http://dx.doi.org/10.1080/11263504.2014.940071>
- Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25(7): 1253-1256. Doi: 10.1093/molbev/msn083
- Ramsay MM, Dixon KW (2003) Propagation science, recovery and translocation of terrestrial orchids. In: Dixon, K.W., S.P. Kell, R.L. Barrett, and P.J. Cribb (eds). *Orchid Conservation*, pp 259-88
- Rasmussen H (1995) *Terrestrial orchids, from seed to Mycotrophic plant.* Cambridge University Press, Cambridge
- Rasmussen H, Rasmussen FN (2007) Trophic relationship in orchid mycorrhiza diversity and implication for conservation. *Lankesteriana* 7:334-341
- Salazar O, Schneider JHM, Julian MC, Keije J, Rubio V (1999) "Phylogenetic subgrouping of *Rhizoctonia solani* AG2 isolates based on ribosomal ITS sequences", *Mycologia*, 91 (3): 459-467
- Sezik E (1984) Orkidelerimiz, Türkiye Orkideleri. Sandoz Yayınları, No: 6, Güzel Sanatlar Matbaası AŞ. İstanbul.
- Sezik E (2002) Turkish orchids and salep. *Acta Pharmaceutica Turcica* 44:151-157.
- Shan XC, Liew EY, Weatherhead MA, Hodgkiss IJ (2002) Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*, 94(2): 230-239
- Sneh B, Burpee L, Ogoshi A (1991) Identification of *Rhizoctonia* species. APS PRESS St.Paul, pp 1-133
- Stark C, Babik W, Durka W (2009) Fungi from the roots of the common terrestrial orchid *Gymnadenia conopsea*. *Mycol. Res* 113: 952-959
- Sufaati S, Agustini V, Suhorno S (2016) *Fusarium* as endophyte of some terrestrial orchid from Papua, Indonesia. *BIO DIVERSITAS* 17(1): 366-371
- Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read DJ (2002) Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants. In: (Eds.): Sanders, I. & van der Hijden Ms. *Mycorrhizal Ecology*, vol 157. Springer, Berlin, pp 375-413
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipsk, A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729 Doi: 10.1093/molbev/mst197
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl.Acids Res.* 25: 4876-4882
- Valadares RBS, Otero JT, Pereira MC, Cardoso EJB (2015) The epiphytic orchids *Ionopsis utricularioides* and *Psychmorchis pusilla* associate with different *Ceratobasidium* lineages at Valle del Cauca, Colombia. *Acta Botanica Brasilica* 29: 40-44
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: (Eds.): Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky TJ White PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp. 315-322