

Atf İçin: Ozkoc, I., Bilgi, M., Gurkanli, C. T., ve Mustafa, L. B. (2023). Bazı Orkide Türlerinde Ekim Öncesi Tohum Uygulamaları ve Bu Uygulamaların Tohum Çimlenme ve Gelişmesine Olan Etkisi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2476-2484.

To Cite: Ozkoc, I., Bilgi, M., Gurkanli, C. T., & Mustafa, L. B. (2023). Pre-Sowing Seed Applications in Some Orchid Species and The Effect of These Applications on Seed Germination and Development. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2476-2484.

Bazı Orkide Türlerinde Ekim Öncesi Tohum Uygulamaları ve Bu Uygulamaların Tohum Çimlenme ve Gelişmesine Olan Etkisi

İbrahim Özkoç¹, Mustafa Bilgili¹, Cem Tolga Gürkanlı², Luay Burhan Mustafa^{1,3*}

Öne Çıkanlar:

- Bu çalışmada orkide tohumları *in-vitro* olarak başarıyla çimlenmiştir
- Tohumları laboratuvar ortamında endofitik bakteri ve mantarlarla başarıyla kaplanmıştır
- Orkide tohumlarının çimlenmesinde bakteriyel ve fungal endofitlerin sinerjistik etkisi gösterilmiştir

ÖZET:

Bitkilerin gelişimi söz konusu olduğunda öncelikle ilk aşama bitki tohumunun sağlıklı bir şekilde çimlenmesidir. Bu durumun gerçekleşmesi orkideler söz konusu olduğunda diğer bitki türlerine göre daha zor olabilmektedir. Bu çalışmamızda elimizde bulunan orkide tohumlarının *in-vitro* olarak çimlenmesi gözlemlenmiştir. Sıcaklık, kuraklık, Ph gibi abiyotik faktörler, tohum çimlenmesine karşı stres oluşturabilmektedir ve tohumun çimlenmesini engelleyici etkiye sahip olmaktadır. Bu durumu engelleyebilmek için tohumların bazı yöntemlerle biyolojik ajanlarla kaplanması sağlanmıştır. Bu çalışmamızda, daha önceki çalışmalarımızda izole ettiğimiz endofitik bakteri ve fungal izolatlar kullanılarak, laboratuvar ortamında tohumlar biyoprimum uygulamalara tabii tutularak kaplanmış ve orkide tohumlarının çimlenmelerine olumlu bir etkisi olup olmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan değerlendirmede özellikle hem endofitik fungal ve bakteri örneklerini içeren karışımların en etkili işlemler olduğu görülmüştür. Bu çalışma orkidelerde hem fungal hem de bakteriyel probiyotik denemesinin ilk örneğini oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler:

- PGPR
- Bio-priming
- Çimlenme
- Endofitik Bakteri ve Fungus

Pre-Sowing Seed Applications in Some Orchid Species and The Effect of These Applications on Seed Germination and Development

Highlights:

- In this study, orchid seeds were successfully germinated *in-vitro*
- Its seeds have been successfully coated with endophytic bacteria and fungi in the laboratory environment
- The synergistic effect of bacterial and fungal endophytes on the germination of orchid seeds has been demonstrated

ABSTRACT:

When it comes to the development of plants, the first step is the healthy germination of the plant seed. The realization of this situation can be more difficult when it comes to orchids compared to other plant species. In this study, *in-vitro* germination of orchid seeds was observed. Abiotic factors such as temperature, drought and Ph can create stress against seed germination and have an inhibitory effect on seed germination. In order to prevent this situation, the seeds are covered with biological agents by some methods. In this study, by using endophytic bacteria and fungal isolates isolated in our previous studies, the seeds were covered with bioprimum applications in the laboratory and it was observed whether there was a positive effect on the germination of orchid seeds. In the evaluation, it was observed that the mixtures containing both endophytic fungal and bacterial samples were the most effective treatments. This study constitutes the first example of both fungal and bacterial probiotic testing in orchids.

Keywords:

- PGPR
- Bio-priming
- Germination
- Endophytic Bacteria and Fungi

¹İbrahim Özkoç ([Orcid ID: 0000-0001-8179-0961](https://orcid.org/0000-0001-8179-0961)), ¹Mustafa Bilgili ([Orcid ID: 0009-0000-9000-9663](https://orcid.org/0009-0000-9000-9663))^{1,3*}Luay Burhan MUSTAFA ([Orcid ID: 0000-0001-8197-4357](https://orcid.org/0000-0001-8197-4357)), ¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye / ³Tikrit Üniversitesi, Temel Bilimler Eğitim Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tikrit, Irak

²Tolga Cem Gürkanlı ([Orcid ID: 0000-0001-8378-7109](https://orcid.org/0000-0001-8378-7109)), Ordu Üniversitesi, Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği, Ordu, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Luay MUSTAFA, e-mail: luayburhan25@gmail.com

Bu çalışma Ad Soyad'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir.

Makale 6-7 Kasım 2018 tarihlerinde İğdır'da düzenlenen "İğdır 1. Uluslararası Multidisipliner Çalışmalar Kongresi'nde" poster/sözlü olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Çiçekli bitkiler denildiğinde genellikle aklımıza ilk gelen ve geniş bir tür çeşitliliğine sahip olan bitki familyalarından biri *Orchidaceae* familyasıdır. Gezegenimizde yaklaşık olarak 18.000-23.000 türü olduğu tahmin edilen orkideler, ülkemizde çeşitli bölgelerde yetiştirilmektedir. Estetik açıdan çok güzel görünmesi yanında, “Salep” adını verdiğimiz orkide ürünü, dondurma, bitkisel ilaç ve yiyecek- içeceklerde kullanılmaktadır. Ülkemizde en çok yetiştirilen orkideler, salep ve dondurma yapımında kullanılan, *Orchis*, *Serapias* cinsi orkidelerdir (Sezik, 1984).

Orkide tohumlarının çimlenmesinin diğer çiçekli bitkilerle karşılaştırıldığında daha zor olduğu görülmektedir, ayrıca çiçeklenmesinin yıllar alması ve tozlaşmada böceklere olan bağımlılığı gibi nedenler, orkidelerin doğadaki konumlarını oldukça hassas bir konuma getirmektedir (Özkoç ve Dalcı 1993). Çoğalma kapasiteleri son derece sınırlı olan ve endosperm taşımayan salep orkide tohumlarının çimlenebilmesi için uygun sıcaklık, ışık, nem ve oksijenin yanısıra, ortamda uygun bir mikorizal fungus ile mikorizal bir ilişki oluşturabilme gereği vardır (Özkoç ve Özden, 1997). Orkidelerin bu zorlu şartları göz önünde bulundurulduğunda orkide metabolizmasını olumsuz olarak etkileyerek büyüme ve gelişmesine engel olan durumlara “stres” denildiğini bilmekteyiz. Orkide fizyolojik ve kimyasal yapısı gereği bu stres durumuna karşı gelmeye çalışsa da bir süre sonra stresle olan mücadelesinde güçsüz düşer ve ölüm ile sonuçlanır. Bitkilerde stres faktörü, kaynağına göre farklılık göstermektedir. Abiyotik ve biyotik stresle mücadele ettiği durumlarda bitkiler hayatta kalma, biyokütlesini artırma ve besin ürünlerinin önemli ölçüde veriminin azalmasına neden olmaktadır (Kaur ve ark., 2008; Abd El Baky ve ark., 2016). Bunun yanında farklı stres mekanizmalarıda bitkilerin büyümesine ve çimlenmesine olumsuz etki yapabilmektedir.

Bitkiler ve mikroorganizmalar yaşamları boyunca sürekli bir etkileşim ağına dahil olmaktadır ve bunlardan bazıları bitkiler için yararlıdır ve bazıları zararlı olarak karşımıza çıkmaktadır. Tarımsal açıdan yararlı mikroorganizmaların kullanılması, tarımsal ekosisteme ciddi şekilde zarar veren geleneksel tarım tekniklerine potansiyel bir alternatiftir (Abhilash ve ark., 2016). Tohum, tarımda sürdürülebilir büyüme için hayati bir kaynaktır, çünkü gıda mahsullerinin yüzde doksanı tohumdan yetiştirilmektedir. Tohum muamelesi yoluyla kimyasal kontrol, yüksek kimyasal ürün maliyeti, hedef olmayan organizma üzerindeki etkiler, seçicilik, haşere direnci şansı, gıdanın kontaminasyonu, bitkiler için toksisite vb. dahil olmak üzere belirli sınırlamalara sahiptir.

Tohum ve fide hastalıklarının kontrolüne yönelik biyolojik tohum uygulamaları, yetiştiriciye biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı, ayrıca tohumların çimlenmesine fayda sağlayıcı alternatif yollar sunmaktadır. Bitki gelişimini teşvik ettiği bilinen mikroorganizmalar kullanılarak tohumların bu mikroorganizmalarla buluşturulması şeklinde yapılan işleme bio-priming denilmektedir. (Nancy ve ark., 1997). Bu işlemin kullanım amacının temelinde stres faktörleri vardır. Priming uygulamaları ise mevcut çeşitlerin potansiyel dayanıklılığını arttırmak için yapılan bazı ön uygulamaları içermektedir. Priming, normal ve stresli koşullar altında çimlenmeyi artırır. Çimlenme ile ilgili metabolitlerin artan sentezine bağlı olarak erken ve tek tip çimlenmeye neden olur. Bu uygulamalar hem tohum hem de fide aşamasında gerçekleştirilebilmektedir (Saboor ve ark., 2019). Tohum biyopriminginin birincil amaçları arasında tohumların uygun şekilde çimlenmesi, toprak kaynaklı patojenlerin yönetimi, kök rizosferinin kolonizasyonu yer almaktadır (Keswani ve ark., 2014).

Yaşamlarının en azından bir kısmını bitki gövdesi içinde hastalık belirtisi göstermeden geçiren ve çok sayıda mekanizma ile bitkilerin daha iyi büyümesine yardımcı olan mikroplara endofitler denilmektedir. Endofitler, bitki büyümesini destekleyen endofitik bakteriler (PGPEB) ve bitki büyümesini destekleyen endofitik mantarlar (PGPEF) olarak kategorize edilmektedir. Endofitler

doğada her yerde bulunur ve her tür bitki üzerinde kolonileşmektedir (Santoyo ve ark., 2016; Tsavkelova ve ark., 2016). Endofitler, üretim ve rekabeti kapsayan çeşitli mekanizmalar yoluyla bitkinin rizosfer mikroorganizmaları tarafından daha iyi büyümesine yardımcı olmaktadır. Yaygın olarak kabul edilen bu mekanizmalar arasında belirli hormonların salınması, azot fiksasyonu, fosforun çözüldürülmesi ve demirin tutulması yer almaktadır.

Dolaylı mekanizmalar arasında patojenik mikroplarla fiziksel ve kimyasal rekabet, indüklenmiş sistemik direnç, 1-aminosit klopropan-1-karboksilat (ACC) deaminaz ve siderofor üretimi (Santoyo ve ark., 2016; Altınkaynak ve Özkoç, 2020) bildirilebilir. Geleneksel yöntemler genellikle bakterilerin ekimden önce tohuma girmesi için uygun koşullar sunmamaktadır. Mikrobiyal tohum hazırlama, bio-priming, potansiyel olarak istenen mikropların tohumlara olası uygulaması için araştırılmış ve olumlu sonuçlanmıştır (Mahmood ve Kataoka, 2019). Eşitken ve ark. (2004), *Orchis palustris* tohumlarının simbiyotik çimlenmesi üzerine priming işleminin etkilerini araştırmış ve düşük su potansiyellerinin olumlu etkisi olduğunu tesbit etmişlerdir.

Bu çalışmada ise, daha önceki çalışmalardan farklı olarak *Orchis sancta* L. tohumları kullanılarak daha önce farklı orkide tohumlarından izole ettiğimiz hem endofitik bakteri ve hem de endofitik fungusları ile bunların biyopriming işleminin sonuçlarının değerlendirilmesi ve tohum çimlenme ve gelişme sürecinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada *Orchis sancta* L. tohumları bitki materyali olarak kullanılmış ve söz konusu tohumlar Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Mikroorganizmaların kültürünün yapılması ve tohum çimlendirme çalışmaları sırasında Patates Dektroz Broth (PDB), Patates Dektroz Agar (PDA), Nutrient Agar (NA) ve Modifiye Yulaf Ortamı (MYO) gibi bazı kültür ortamları kullanılmıştır (Samson ve ark., 1995; Ogoshi ve ark., 1990; Çebi Kılıçoğlu, 2009).

Deneylerde kullanılacak olan *Orchis sancta* tohumlarına canlılık (Tetrazolium) testi (Acemi ve Özen, 2019) uygulamış ve tohumların canlılık durumları tesbit edilmiştir. Tohumlara biyopriming işlemi uygulanmadan önce, yüzeysel sterilizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. İşlem sırasında ependorf tüplerindeki tohumlara, önce 1 ml %70'lik etil alkol ilave edilerek 1 dakika vortekslenmiş ve 6750 rpm'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra 1 ml 1/5 çamaşır suyu ve üzerine 1 veya 2 damla Tween 80 ilave edildikten sonra tekrar vortekslenerek 5 dk 6750 rpm'de santrifüj edilmiştir. Her bir ependorftaki tohum örneğini birkaç dakika olacak şekilde üç kez steril saf sudan geçirmek suretiyle tohum sterilizasyonu tamamlanmıştır.

Daha sonra sterilizasyonun başarılı bir şekilde yapıp yapılmadığını test etmek için steril PDA ve NA besi ortamlarına ekilmiş ve 35°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Birkaç gün sonra kontaminasyon olup olmadığı gözlemlenmiştir (Acemi ve Özen, 2019).

Çalışmada kullanılmış olan bakteri ve funguslar daha önceki laboratuvar çalışmalarında kullanılmış olan stok besiyerlerinde muhafaza edilen fungus ve bakterilerden seçilmiştir. Öncelikle funguslar PDA ortamına, bakterilerde NA ortamına aktarılmış ve mikroorganizmaların saflıkları test edilmiştir. Daha sonra saflıkları kontrol edilen kültürlerin, bakteriler için Nutrient Broth, Funguslar için PDB besi ortamlarında üretilmesi sağlanmıştır. Tohumların çimlenmesine katkı sağlaması düşünülen bakteri ve fungus örneklerini belirleyebilmek için 5 çeşit bakteri örneği ve 3 çeşit fungus örneği kullanılmıştır (Çizelge 1).

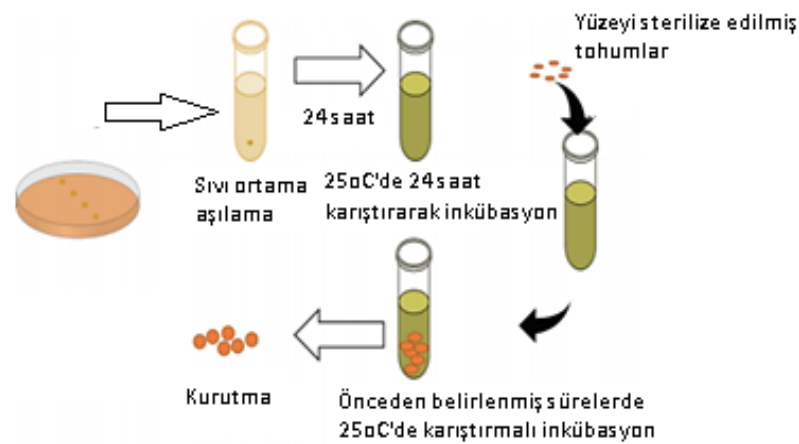
Çizelge 1. Çalışmada kullanılan bakteri ve funguslar

| | Organizma | Türü | Özellikleri | | | Literatür |
|---|-------------------|-------------------------------|-------------|--------|------|-----------------------------------|
| | | | ACC | Fosfat | Çöz. | |
| | Bakteriler | Endofit | | | | |
| 1 | HA13 | <i>Bacillus toyonensis</i> | - | - | | 17.1 (Altınkaynak ve Özkoç, 2020) |
| 2 | HA25 | - | + | + | | 18.4 (Altınkaynak ve Özkoç, 2020) |
| 3 | HA29 | - | - | + | | 10 (Altınkaynak ve Özkoç, 2020) |
| 4 | HA47 | <i>Pseudomonas sp.</i> | + | - | | <10 (Altınkaynak ve Özkoç, 2020) |
| 5 | HA112 | <i>Bacillus thuringiensis</i> | + | + | | 17.1 (Altınkaynak ve Özkoç, 2020) |
| 6 | HA116 | - | - | - | | 15.2 (Altınkaynak ve Özkoç, 2020) |
| | Funguslar | | | | | |
| 7 | VY13 | <i>Ceratobasidium sp.</i> | Endofit | | | |
| 8 | VY14 | <i>Epulorhiza sp.</i> | Endofit | | | (Özkoç ve ark., 2015) |

Her bir mikroorganizma ayrı ayrı steril ependorf tüplerinde tohumlarla buluşturulmuştur. Daha sonra sıvı bakteri kültürleri kendi aralarında kombinasyonlarla Şekil 1 karıştırılarak, sıvı fungus kültürleri kendi aralarında kombinasyonlarla Şekil 2 karıştırılarak ve en son bakteri-fungus karışımları yapılarak steril ependorf tüplerinde tohumlarla buluşturularak hibrit bir tohum kaplama işlemine tabi tutulmuştur. Kontrol grubu olması açısından bir grup tohuma mikroorganizma kaplama işlemi uygulanmamıştır. Oluşturulan tüpler 1 gün süreyle ependorf tüplerinde inkübasyona bırakılmış ve tohumların mikroorganizmalarla kaplanması sağlanmıştır. Kaplama işlemi yapılırken tohumların mikroorganizmalarla ependorf tüplerinde buluşturulması steril kabin içerisinde aseptik kurallara uyularak yapılmıştır.

Ependorf tüplerinde 1 gün inkübe edilerek kaplanması sağlanan tohumların laboratuvar ortamında çimlenmesinin kontrol edilebilmesi için modifiye yulaf ortamına aşılama yapılmış ve 25°C ve 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlığa ayarlanmış iklim odasında 60 gün boyunca inkübe edilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış olup elde edilen çimlenme değerlerinin aritmetik ortalaması alınmıştır.

Tohumlar, 45 günlük bir inkübasyon süresinin sonunda, 20 kat büyütme altında stereo mikroskop ile gözlemlenerek sayılmıştır. Petri kapları, saymayı kolaylaştırmak için 2x2 cm boyutlarında karelere bölünmüştür. Tohumların çimlenme aşamaları Yamazaki ve Miyoshi 2016'ya göre değerlendirilmiştir. Çimlenme yüzdeleri, her ortam için aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 1. Tohum hazırlama yoluyla laboratuvar ölçekli endofitik bakteri uygulamasının şematik gösterimi



Şekil 2. Laboratuvar ölçekli endofitik mantar uygulamasının şematik gösterimi

Büyük ölçekli uygulama için sıvı süspansiyon salin tamponu veya su içerebilir.

Çimlenme yüzdesi (%) = $\frac{\Sigma \text{Tohum sayısı (Aşama 2-5)}}{\Sigma \text{Tohum sayısı (Aşama 0-5)}} \times 100$

Petri kabı başına bir miligram tohum ($\approx 180-200$ tohum) kullanılmıştır. Her deney, üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Tohum çimlenme ve canlılık verileri ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verilmiştir. Ortalamalar Duncan'ın Çoklu Aralık Testi (DMRT) kullanılarak $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics yazılımı, versiyon 21 kullanılmıştır (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, ABD).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bitki ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşim, bitki için tarımsal ürünlerin, sürdürülebilir bir şekilde üretilmesine yardımcı olan çeşitli hizmetler sunmaktadır. Bitki ve mikrobiyom arasındaki rizosferik etkileşimler, toprağın verimliliğini, bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve verimini etkiler. Tüm faktörler arasında, bitki mikrobiyom etkileşimini artırabilecek en etkili faktör, toprak mikroorganizmalarının, toprağın ve bitki köklerinin birbirleriyle etkileştiği "rizosferin" toprak mikrobiyal topluluğudur. Tohum, tarımın ve diğer tüm tarımsal girdilerin etkinliğinin artırılmasında itici güçtür, sulama, gübreler ve bitki koruyucu maddeler ve insan emeği kaliteli tohum kullanımına bağlıdır. Tohum, gelişmiş teknolojilerin sağlanması için bir araçtır ve çeşitli hibritlerin, doğal genetik potansiyellerini tasvir etmek için bir aynadır (Gosal ve Kaur, 2017).

Tohumu geliştirmek, "çimlenme veya fide büyümesini artıran veya ekim sırasında gerekli tohum ve diğer malzemelerin verilmesini kolaylaştıran hasat sonrası işlemler" olarak tanımlanabilir. Tohum hazırlama, tohumlar geri verildiğinde daha hızlı çimlenmeye neden olan kontrollü bir hidrasyon (suya batırma) ve kurutma tekniğidir.

Tohum hidrasyonu ve tohumların faydalı mikroorganizmalar ile aşılması kombinasyonunu ifade eden, bir biyolojik tohum muamelesi işlemidir. Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler ve mantarlar zirai kimyasalların kullanımını azaltabilir ve bitki verimini, beslenmesini, biyotik-abiyotik streslere karşı toleransı ve tohumların çimlenme potansiyelini artırabilir. Biyoprimer tohumları korumak için tohumların aşılması gibi biyolojik yönleri, hastalıkları kontrol altına almak için yararlı organizma ve hidratlandırılan tohum gibi fizyolojik yönleri birleştiren ekolojik bir yaklaşımdır. Bu yeni tohum muamelesi trendi, faydalı mikroorganizmalar ile kontrollü hidrasyonu ve çimlenme öncesi hazırlık süreçlerinin geliştirilmesini içerir (Sukanya ve ark., 2018).

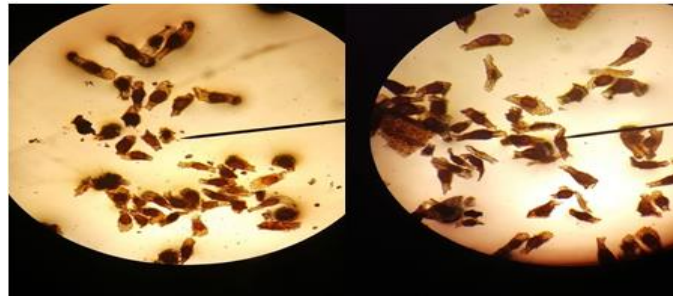
Çalışmada kullanılan tohumlar *Orchidaceae* familyasına ait *Orchis sancta* türünden seçilmiştir. Tohumlar canlılık testine geçmeden önce bu tip çalışmalarda olduğu gibi yüzeysel dezenfeksiyon işlemleri yapılmış ve tohumların yüzeysel dezenfeksiyonu için en uygun işlemin % 70'lik etil alkolde 1 dakikalık % 1'lik NaHCl solüsyonunda da 5 dakikalık işlem olduğu tesbit edilmiştir. Bu işlemleri

uygularken Acemi ve Özen, (2019)'in yüzeysel dezenfeksiyon uygulamaları kullanılmıştır. Yüzeysel dezenfeksiyonu yaptıktan sonra, tohumlar öncelikle canlılık değerlendirmesi açısından Tetrazolium testine tabii tutulmuş (Pradhan ve ark., 2022) ve tohum canlılığının % 98 olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 3).

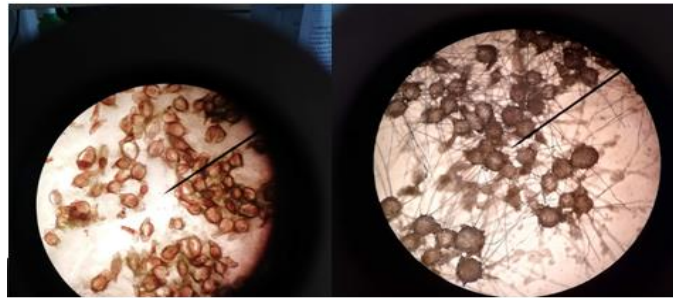
Tohumların yüzeysel dezenfeksiyonu ve canlılık oranlarını belirledikten sonra, bu çalışmanın hipotezini oluşturan biyoprimering (Biyöön hazırlama) işlemlerine geçilmiştir. Tohum hazırlama (Seed priming), çimlenmeden önce tohumlara doğal ve sentetik bileşiklerin işlenmesiyle bitkilerde belirli bir fizyolojik durumun indüklenmesidir. "Biyoprimering" olarak adlandırılan mikrobiyal aşılama ile tohum hazırlama, çeşitli mahsullerin tekdüzeliğini, oluşumunu ve büyümesini artıran tohumlara bakteriler, mantarlar aktinomisetler gibi faydalı mikropların uygulanmasını içerir (Kumar ve ark., 2020).

Çalışmada kullanılan bakteri ve fungusların sıvı kültürleri yapılmış ve bunlar steril tohumlara uygulanarak bu şekilde 1 gece inkübe edildikten sonra tohumların bir gün boyunca kuruması ve bu şekilde tohumların kurutulması sağlandıktan sonra bu tohumlar MYO'na aşılanmıştır.

Tohumların çimlenmesine katkı sağlayacağı düşünülen endofitik bakteri ve fungus örnekleri daha önceki çalışmalardan (Altınkaynak ve Özkoç, 2020 ve Yayınlanmamış veri) seçilerek kullanılmıştır. Bu amaçla 5 bakteri ve 3 fungus izolatu kullanılmış ve bu organizmalar tek tek ve kombinasyonlar halinde uygulanmıştır. Bakteriler tohumlara uygulandıktan sonra, 2. ve 5. haftada çimlenme oranları (%) belirlenmiştir (Çizelge 2; Şekil 4).



Şekil 3. Tohumların canlılık testi



Şekil 4. Çimlenmiş *O.sancta* tohumları

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan bakteri ve funguslar

| Tohumlara kaplanan bakteriler | Çimlenme oranları (%) | |
|---|-----------------------|--------------|
| | 2.Hafta | 5.Hafta |
| 1 Kontrol | 19.33±2.31 c | 69.33±2.31 b |
| 2 <i>Bacillus toyonensis</i> HA13 | 30.33±6.30 ab | 70.00±3.46 b |
| 3 <i>Pseudomonas</i> sp. HA47 | 30.33±3.51 ab | 78.66±3.05 a |
| 4 <i>Bacillus thuringiensis</i> HA112 | 28.67±5.51 ab | 78.00±4.00 a |
| 5 HA 116 | 25.66±3.05 bc | 69.00±5.57 b |
| 6 <i>B. thuringiensis</i> H112+ <i>B.toyonensis</i> H13 | 35.00±2.64 a | 81.00±4.58 a |
| 7 <i>B. thuringiensis</i> HA112+ <i>B.toyonensis</i> HA13+ <i>Pseudomonas</i> sp. HA 47 | 33.33±1.15 a | 79.67±2.51 a |

Diğer bir çalışma grubunda ise bakteri ve funguslar ve bunların kombinasyonları denenmiştir (Çizelge 3). Fungus karışımı ve bakteri-fungus karışımı ile bazı bakteri uygulamalarının kontrole göre

daha etkili olduğu tesbit edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, 3,4,6 ve 7 bakteri uygulamalarının kontrole göre farklı (daha iyi) olduğu görülmektedir. Bu organizmaların özellikleri incelendiğinde bunların ACC, Fosfat çözünürlüğü ve IAA sonuçlarının daha iyi olduğu görülmektedir. Biyotohum hazırlama işleminin, birçok bitki ve süs bitkisinde, özellikle bitki patojenleri ile istila edilmiş topraklarda, özellikle elverişsiz toprak koşullarında, çimlenmeyi hızlandırmaya ve fide oluşumunu iyileştirmeye yardımcı olan bir işlemdir (Taylor ve Harman, 1990; Rush, 1991; Halmer, 2000).

Bazı endofitik bakteri ve fungusların tek tek ve birlikte tohum hazırlama işlemine katıldığında, işlemlerin tümünde çimlenme değerleri kontrole göre farklı yani daha iyi olduğu tesbit edilmiştir.

Çizelge 3. Çimlenme Üzerine Endofitik Bakteri ve Fungus Etkileşimlerinin Etkisi

| | Mikroorganizmalarla kaplanan tohumlar | Çimlenme oranları (%) | | | |
|---|---|-----------------------|----------------|--------------|---------------|
| | | 1.Hafta | 2.Hafta | 4. Hafta | 5. Hafta |
| 1 | Kontrol | 6.00±2.00 b | 23.67±1.53 d | 59.67±2.08 c | 68.00±3.61 d |
| 2 | VY13 endofitik fungus- <i>Ceratobasidium</i> sp. | 9.67±2.52 ab | 30.33±2.52 bc | 72.00±4.58 b | 80.00±1.00 bc |
| 2 | VY14 endofitik fungus <i>Rhizoctonia</i> sp. | 12.00±2.00 a | 35.00±1.00 ab | 73.67±5.51 b | 84.00±2.65 ab |
| 3 | HA25 endofitik bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. | 10.67±2.52 a | 24.67±3.06 d | 69.33±2.31 b | 81.00±3.61 bc |
| 4 | HA29 endofitik bakteri | 10.33±2.08 a | 28.00±4.00 cd | 70.00±4.00 b | 77.33±3.06 c |
| 6 | Fungus karışımı | 10.33±1.53 a | 36.00±2.00 a | 75.33±2.52ab | 84.33±4.04 ab |
| 7 | Bakteri + Fungus karışımı | 10.67±2.31 a | 32.33±4.51 abc | 81.33±4.16 a | 88.67±4.16 a |

VY14 nolu izolatin daha etkili olduğu, karışımların etkisini değerlendirdiğimiz de ise, bakteri+fungus karışımının daha etkili olduğu belirlenmiştir. Eşitken ve ark, (2004), *Orchis palustris* tohumlarının sadece fungal izolatlarla simbiyotik çimlenmesi üzerine priming işleminin etkilerini araştırmış ve düşük su potansiyellerinin olumlu etkisi olduğunu tesbit etmişlerdir.

SONUÇ

Bu çalışmada, *Orchis sancta* tohumlarına daha önceki çalışmalarımızda izole ettiğimiz endofitik bakteri ve endofitik funguslar biyoprimering (tohum hazırlama) amaçlı olarak uygulanmıştır. Bakteriyele izolatlardan PGPR özellikleri fazla olan ile funguslardan VY 14 nolu izolatin daha etkili olduğu, ancak en etkili işlemin bakteri ve fungus karışımıyla elde edildiği tesbit edilmiştir. Bu sonuçlardan bitkinin daha sağlıklı gelişimi açısından uygun mikrobiyomun belirlenmesinin önemi de ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla bu çalışma, hem endofitik fungus hem de endofitik bakterilerin priming yoluyla uygulanması ve bu uygulamaların sinerjistik etkileriyle ilgili ilk yayındır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma OMÜ BAPKOP PYO.FEN.1904.21.008 nolu proje ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlardan İbrahim Özkoç ve Mustafa Bilgi'nin katkısı daha fazladır.

KAYNAKLAR

Abd El Baky, H., A Nofal, O., & S El Baroty, G. (2016). Enhancement of antioxidant enzymes activities, drought stress tolerances and quality of potato plants as response to algal foliar application. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 8(1), 70-77.

- Abhilash, P. C., Dubey, R. K., Tripathi, V., Gupta, V. K., & Singh, H. B. (2016). Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 847-850.
- Acemi, A., & Özen, F. A. Z. I. L. (2019). Optimization of *in vitro* asymbiotic seed germination protocol for *Serapias vomeracea*. *Eurobiotech Journal*, 3.
- Altinkaynak, H., & Ozkoc, I. (2020). Isolation and molecular characterization of plant growth promoting bacteria from the rhizosphere of orchids in Turkey. *Rhizosphere*, 16, 100280.
- Çebi Kılıçoğlu M 2009. Karadeniz Sahil Şeridinde Fasulye Bitkisi ve Rizosfer Bölgesinden İzole Edilen Multinükleat *Rhizoctonia spp*'nin Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Eşitken, A., Ercişli, S., Eken, C., & Tay, D. (2004). Seed priming effect of sybiotic germination and seedling development of *Orchis palustris* Jack. *Hortscience*, 39(7), 1700-1701.
- Gosal, S. K., & Kaur, J. (2017). Microbial inoculants: a novel approach for better plant microbiome interactions. *Probiotics in agroecosystem*, 269-289.
- Halmer, P. (2000). Commercial seed treatment technology. *Seed Technology and Its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, England, 257-286.
- Kaur, S., Dhaliwal, L., & Kaur, P. (2008). Impact of climate change on wheat disease scenario in Punjab. *Journal of Research*, 45(3-4), 161-170.
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma spp*. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 533-544.
- Kumar, A., Droby, S., White, J. F., Singh, V. K., Singh, S. K., Zhimo, V. Y., & Biasi, A. (2020). Endophytes and seed priming: agricultural applications and future prospects. In *Microbial endophytes* (pp. 107-124). Woodhead Publishing.
- Mahmood, A., & Kataoka, R. (2019). Application of endophytes through seed priming. *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings: Implication in Plant Stress Tolerance and Enhancing Productivity in Crop Plants*, 509-521.
- Nancy, KB., Vavrina, CS., & Kloepper, JW. (1997). Amendment of Muskmelon and Watermelon Transplant Media with Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Effects on Seedling Quality, Disease and Nematode Resistance, *Hort technology*, 13(3): 476-482
- Ogoshi, A., Cook, R. J., & Bassett, E. N. (1990). *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Phytopathology*, 80(9), 784-788.
- Özkoç, I., & Dalcı, M. (1993). Germination of the seeds *Serapias vomeracea* (Burm fil.) Briq. subsp. *laxiflora* (Soo') Gölz et. Reinhard (Orchidaceae) through asymbiotic culture techniques. *Turkish Journal of Biology*, 17, 5-11.
- Özkoç, İ., & Özdener, Y. (1997). Bazı Orkidelerde Mikrorizal Fungusların (*Rhizoctonia Spp.*) Tesbiti.
- Özkoç, İ., Kömpe Özdener, Y., & Mutlu Akın, V. (2015). *Spiranthes spiralis* Funguslarının Moleküler Tekniklerle Tanımlanması ve Tohum Çimlenmesi Üzerine Bu Fungusların Etkileri, Tubitak 1002 Projesi, Proje No: 113Z849.
- Pradhan, N., Fan, X., Martini, F., Chen, H., Liu, H., Gao, J., & Goodale, U. M. (2022). Seed viability testing for research and conservation of epiphytic and terrestrial orchids. *Botanical studies*, 63(1), 1-14.
- Rush, C. M. (1991). Comparison of seed priming techniques with regard to seedling emergence and Pythium damping-off in sugar beet. *Phytopathology*, 81(8), 878-882.

- Saboor, A., Mustafa, G., Arshad, M., Ahmad, M., Hussain, S., Ahmed, N., ... & Ali, M. A. (2019). Seed priming and metal/metalloid stress tolerance in plants. *Priming and Pretreatment of Seeds and Seedlings: Implication in Plant Stress Tolerance and Enhancing Productivity in Crop Plants*, 287-311.
- Samson, A. R., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., & Filtenborg, O. (1995). Introduction to Food-Borne Fungi p. 64. *CBS, The Netherlands*.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research*, 183, 92-99.
- Sezik, E. (1984). Orkidelerimiz Türkiye'nin Orkideleri, Sandoz Kültür Yayınları No 6, Güzel Sanatlar Matbaası AS. *Istanbul. Tekinşen, KK, Güner, A.(2010). Chemical Composition And Physicochemical Properties Of Tubera Salep Produced From.*
- Sukanya, V., Patel, R. M., Suthar, K. P., & Singh, D. (2018). An overview: Mechanism involved in biopriming mediated plant growth promotion. *Int. J. Pure Appl. Biosci*, 6(5), 771-783.
- Taylor, A. G., & Harman, G. E. (1990). Concepts and technologies of selected seed treatments. *Annual review of phytopathology*, 28(1), 321-339.
- Tsavkelova, E. A., Egorova, M. A., Leontieva, M. R., Malakho, S. G., Kolomeitseva, G. L., & Netrusov, A. I. (2016). *Dendrobium nobile* Lindl. seed germination in co-cultures with diverse associated bacteria. *Plant Growth Regulation*, 80, 79-91.