



ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Ş.Evrim ARICI

**SOMAKLONAL VARYASYONDAN YARARLANARAK *IN VITRO*
SELEKSİYONLA BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA BAŞAK
YANIKLIĞINA DAYANIKLI BİTKİ ELDE EDİLMESİ**

BİTKİ KORUM ANABİLİM DALI

ADANA, 2006

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Ş.Evrin ARICI

**SOMAKLONAL VARYASYONDAN YARARLANARAK *IN VITRO*
SELEKSİYONLA BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA BAŞAK
YANIKLIĞINA (*Fusarium* spp.) DAYANIKLI BİTKİ ELDE EDİLMESİ**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2006

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SOMAKLONAL VARYASYONDAN YARARLANARAK *IN VITRO*
SELEKSİYONLA
BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA BAŞAK YANIKLIĞINA (*Fusarium* spp.)
DAYANIKLI BİTKİ ELDE EDİLMESİ**

Ş.Evrim ARICI

DOKTORA TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**Bu tez/06/2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.**

İmza.....

Prof Dr.N.Kemal KOÇ

DANIŞMAN

İmza.....

Prof.Dr. Rüştü HATİPOĞLU

ÜYE

İmza.....

Prof.Dr. Ali ERKILIÇ

ÜYE

İmza.....

Doç.Dr. Şener KURT

ÜYE

İmza.....

Doç.Dr. Gürsel KARACA

ÜYE

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof.Dr.Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç.Ü.Bilimsel Araştırma projeler Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No:FBE2002D209

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
DOKTORA TEZİ

SOMAKLONAL VARYASYONDAN YARARLANARAK *IN VITRO*
SELEKSİYONLA
BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA BAŞAK YANIKLIĞINA (*Fusarium* spp.)
DAYANIKLI BİTKİ ELDE EDİLMESİ

Ş.Evrin ARICI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. N.Kemal KOÇ

Yıl: 2006, Sayfa: 167

Jüri : Prof. Dr. N.Kemal KOÇ
: Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
: Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ
: Doç. Dr. Şener KURT
: Doç. Dr. Gürsel KARACA

Yapılan bu çalışma ile Çukurova Bölgesinde *F.graminearum* ve *F.culmorum*’un varlığını mikolojik ve moleküler yöntemlerle belirlemek ve bölgemizde yetiştirilen Adana 99, Seri 82, ve Genç 99 buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinin embriyogenik kallusları kullanılarak, *in vitro* seleksiyon ile Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı’na karşı dayanıklı bitkiler elde etme olanakları araştırılmıştır.

Survey çalışmaları sonucunda bölgemizde yetiştirilen buğday çeşitlerinde Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı’na neden olan *F.graminearum* ve *F. culmorum*’un varlığı belirlenmiş ve bölgede *F.graminearum* izolatlarının buğday ekim alanlarında daha yaygın olduğu gözlenmiştir.

In vitro seleksiyonda kullanılan buğday çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyoları ve olgunlaşmamış buğday taneleri ile olgun embriyolar, embriyogenik kallus elde etmek amacıyla 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Yapılan gözlemler sonucunda kallus oluşum oranları olgunlaşmamış embriyolarda % 45-92, olgunlaşmamış tanelerde kallus oluşumu % 0-21, olgun embriyolarda ise bu oran %57-70 arasında değişim göstermiştir. *In vitro* seleksiyonda embriyogenik kalluslar farklı konsantrasyonlarda *Fusarium* kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlar üzerinde 4 hafta süre ile kültüre alınmış ve seleksiyon için en uygun kültür filtratı konsantrasyonun %30, fusarik asit konsantrasyonunun 0,30 mM olduğu tespit edilmiştir. *In vitro*’da dört ay boyunca %30 kültür filtratı ve 0,30 mM fusarik asit içeren ortamlar üzerinde gelişim gösteren kalluslardan bitki regenerasyonu gerçekleştirilmiş, fakat tohum elde edilememiştir.

Seleksiyon sonucu kalluslardan regene olan bitkilerin genetik farklılıklarını belirlemek için RAPD-PCR (6 primer) moleküler analizi yapılmıştır. Kullanılan 6 primerden 3 tanesinde PCR ürünü elde edilmiş, fakat polimorfizm gözlenememiştir. *F.graminearum* ve *F.culmorum* izolatlarının genetik yakınlıkları RAPD-PCR ile belirlenmiştir. Kullanılan 10 primerden OPU-17, *F.culmorum* izolatlarıyla, OPU-19 ve OPU-17 primerleri *F.graminearum* izolatlarıyla yapılan RAPD analizi sonucunda amplifikasyon gerçekleşmemiştir. *F.culmorum* ile primerlerin RAPD-PCR ile amplifikasyon sonucunda 27 band da, *F.graminearum* ile primerlerin amplifikasyonu sonucunda elde edilen 9 band da polimorfizm gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Buğday Başak Yanıklığı, *Fusarium* spp. *In vitro* seleksiyon, kültür filtratı, fusarik asit, RAPD-PCR

ABSTRACT

PhD THESIS

IN VITRO SELECTION FOR RESISTANS TO HEAD BLIGHT (*Fusarium* spp.) VIA SOMACLONAL VARIATION IN WHEAT(*Triticum aestivum* L.)

Ş.Evrin ARICI

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Supervisor: Prof. Dr. N.Kemal KOÇ

Year: 2006 Page: 167

Jury : Prof. Dr. N.Kemal KOÇ
: Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
: Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ
: Assoc. Prof. Dr. Şener KURT
: Assoc. Prof. Dr. Gürsel KARACA

In this study it has been investigated to identify of *F.graminiarum* and *F.culmorum* based on mycological and molecular analysis in Cukurova region and selection of resistance to wheat head blight used embriogenic calli of three genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.) Adana 99, Seri 82 and Genç 99.

Wheat head blight caused *F.graminearum* and *F.culmorum* were identified on wheat fields and *F.graminearum* was the most widely distributed species in Cukurova region.

Immature and mature embrio and immature seeds of wheat varieties used *in vitro* selection were cultured on MS medium containing 2,4-D to initiate embriogenic calli The frequency of callus induction was 45-92% from immature embrio, 0-21% from immature seeds, and 57-70% from mature embrio. The wheat varieties calli were cultured on modified MS medium containing different concentration of *Fusarium* culture filtrate and fusaric acid for 4 weeks and the best selective effect was obtained at concentration of 30% culture filtrate and 0,30 mM fusaric acid

Developed calli which were cultured on MS medium containing 30% culture filtrate and 0,30 mM fusaric acid for 4 months were regenerated plants but did not produce seeds.

Genetic variation of plants regenerated from surviving calli in spite of culture filtrate and fusaric acid was investigated using RAPD-PCR (6 primers) analysis. 3 of the 6 primers resulted with amplification product but none of them were polymorphic. Genetic distances of *F.graminearum* and *F.culmorum* isolates were determined by RAPD-PCR (10 primers). One primer (OPU-17) with *F.culmorum*, two primers (OPU-19 and OPU-17) with *F.graminearum* did not react. Amplification products have given 27 polymorphic bands for *F.culmorum* and 9 bands for *F.graminearum*.

Key words: Wheat head blight, *Fusarium* spp, *In vitro* selection, culture filtrate, fusaric acid, RAPD-PCR

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın her aşamasında ihtiyacım olan bilgi ve ekipman desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışmamı yönlendiren ve tezimin hazırlanmasında büyük yardımlarını gördüğüm danışman hocam sayın Prof. Dr. N. Kemal KOÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme sırasındaki değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Ali ERKILIÇ ve Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞOLU'na teşekkür ederim.

Doktora tezimin arazi ve laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesinde yardımcı olan Doktor Hatice YÜCE SATAR'a, Araş. Gör. Semiha (Ünlü) YÜCEER'e, Ziraat Mühendisi Feray ERDAL'a ve bilgilerinden faydalandığım Bitki Koruma Bölümünde görev alan bütün hocalarım ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin yazım aşamasında moleküler biyoloji analizlerin değerlendirilmesinde ve yorumlanmasında bana destek olan Doç. Dr. Hakan ÖZKAN ve Yard. Doç. Dr. Çiğdem ULUBAŞ'a teşekkür ederim.

Doktora çalışmam boyunca maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Bunlara ek olarak projenin yürütülmesinde maddi destek sağlayan Ç.Ü. Araştırma Fonuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
EKLER	XVII
SİMGELER VE KISALTMALAR	XVIII
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı ile İlgili Çalışmalar.....	5
2.2. Mikotoksinler.....	8
2.3. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na Karşı Mücadele Yöntemleri ve Dayanıklılık.....	17
2.4. <i>İn vitro</i> Seleksiyon ile İlgili Çalışmalar.....	20
2.5. Buğdaydan Embriyogenik Kallusların Elde Edilmesi ve Bitki Regenerasyonu.....	27
2.6. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na Neden Olan Fusarium İzolatlarının Moleküler Analizleri.....	35
2.7. Buğdayın Moleküler Analizleri ile İlgili Çalışmalar.....	40
3. MATERYAL VE METOD.....	44
3.1. Materyal.....	44
3.2. Metod.....	44
3.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerin Toplanması, <i>F. graminearum</i> ve <i>F.</i> <i>culmorum</i> İzolatlarının İzolasyonu.....	44
3.2.2. İzole Edilen Fungusların Teşhis Edilmesi.....	45
3.2.3. Tek Spor İzolasyonu ve Fungusların Muhafazası.....	45
3.2.4. <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> 'un Farklı Ortam ve Sıcaklıklardaki Koloni Gelişiminin Belirlenmesi.....	46

3.2.5. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na Neden Olan <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> İzolatlarının Patojenitelerinin Belirlenmesi.....	47
3.2.5.1. Konukçu Bitkinin Yetiştirilmesi.....	47
3.2.5.2. <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> 'un Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	48
3.2.5.3. Patojenite Testi.....	48
3.2.5.4. Bazı Buğday Çeşitlerinin <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> 'a Karşı Sera ve Saksı Koşullarındaki Reaksiyonlarının Belirlenmesi.....	49
3.2.6. <i>In vitro</i> Seleksiyon.....	52
3.2.6.1. <i>In vitro</i> Seleksiyonda Kullanılan Bitki Materyalinin Elde Edilmesi.....	52
3.2.6.1.1. Olgunlaşmamış Buğday Taneleri ve Embriyolarının Kültürü Embriyogenik Kallusların Elde Edilmesi.....	52
3.2.6.1.2. Olgunlaşmış Buğday Embriyolarının Kültürü ve Embriyogenik Kallusların Elde Edilmesi.....	54
3.2.6.1.3. Embriyogenik Buğday Kalluslarından Bitki Regenerasyonu.....	55
3.2.6.2. <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> Kültür Filtratlarının Elde Edilmesi ve Fusarik Asitin Hazırlanması.....	56
3.2.6.2.1. <i>In vitro</i> seleksiyonda Kullanılan Kültür Filtratı Konsantrasyonunun Saptanması.....	57
3.2.6.2.2. <i>In vitro</i> Seleksiyonda Kullanılan Optimum Kültür Filtratı ve Fusarik Asit Konsantrasyonlarının Kalluslar Kullanılarak Saptanması.....	58
3.2.7. <i>In vitro</i> Seleksiyon Süreci.....	59
3.2.7.1. <i>In vitro</i> Seleksiyonda Kallusların Kullanımı.....	59
3.2.8. Kültür Filtrat ve Fusarik Asit'in Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi...	60

3.2.9. <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> 'a ait İzolatların Moleküler	
Analizlerinin Yapılması	61
3.2.9.1. DNA İzolasyonu.....	61
3.2.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD Analizi).....	64
3.2.10. <i>In vitro</i> Seleksiyon ile Regenere Edilen Bitkilerin Moleküler Analizi	65
3.2.10.1. DNA İzolasyonu.....	65
3.2.10.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD Analizi).....	67
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	68
4.1. <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> ' İzolatlarının Toplanması.....	68
4.2. <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> 'un Farklı Ortam ve Sıcaklıklardaki	
Koloni Gelişimi.....	73
4.3. <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> İzolatlarının Patojenitelerinin	
Belirlenmesi.....	81
4.4. Bazı Buğday Çeşitlerinin <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> 'a Karşı Sera	
ve Saksı Koşullarındaki Reaksiyonlarının Belirlenmesi.....	85
4.5. Olgunlaşmış ve Olgunlaşmamış Buğday Embriyolarının Kültürü ve	
Embriyogenik Kalluslarının Elde Edilmesi.....	97
4.6. Embriyogenik Buğday Kalluslarından Bitki Regenerasyonu.....	103
4.7. <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> Optimum Kültür Filtratı	
Konsantrasyonlarının Bitkiler Kullanılarak Saptanması.....	106
4.8. <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> 'un Optimum Kültür Filtratı	
Konsantrasyonları ile ve Fusarik Asit Konsantrasyonunun Kalluslar	
Kullanılarak Saptanması.....	111
4.9. Seleksiyon Süreci.....	115
4.9.1. Seleksiyonda Kallusların Kullanımı.....	115
4.10. Kültür Filtratı ve Fusarik Asit'in Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi....	120
4.11 <i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> 'a ait İzolatların Moleküler Analizi....	122
4.12. <i>In vitro</i> Seleksiyon ile Regenere Edilen Bitkilerin Moleküler Analizi...	139

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	143
KAYNAKLAR.....	147
ÖZGEÇMİŞ.....	160
EKLER.....	162

ÇİZELGELER DİZİNİ**SAYFA**

Çizelge 4.1.	2002 yılı Nisan-Mayıs aylarında Adana ve çevresinde Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı ile ilgili yapılan arazi çıkışları sonucunda elde edilen gözlem sonuçları	69
Çizelge 4.2.	<i>F.graminearum</i> 'un A-13 nolu izolatının 20, 25, 30°C sıcaklıkta ve beş farklı ortamdaki koloni gelişimi.....	75
Çizelge 4.3.	<i>F.culmorum</i> 'un B-4 nolu izolatının 20, 25, 30°C sıcaklıkta ve beş farklı ortamdaki koloni gelişimi	79
Çizelge 4.4.	<i>F.graminearum</i> izolatlarının Seri 82 buğday bitkisini hastalandırma derecesi	82
Çizelge 4.5.	<i>F.culmorum</i> izolatlarının Seri 82 buğday bitkisini hastalandırma derecesi	84
Çizelge 4.6.	Sera koşullarında yetiştirilen buğday çeşitlerinin Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı duyarlılıkları (%)....	88
Çizelge 4.7.	Saksı koşullarında yetiştirilen buğday çeşitlerinin Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı duyarlılıkları (%)......	90
Çizelge 4.8.	Sera koşullarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın 1000 tane ağırlığına etkisi (%)	94
Çizelge 4.9	Saksı koşullarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın 1000 tane ağırlığına etkisi (%)	94
Çizelge 4.10.	Olgunlaşmamış buğday embriyolarından kallus teşviki	99
Çizelge 4.11.	Olgunlaşmamış buğday tanelerinden kallus teşviki.....	99
Çizelge 4.12.	Olgunlaşmış buğday embriyolarından kallus teşviki.....	99
Çizelge 4.13.	Genç 99 buğday çeşidinin embriyogenik kalluslarının kültüre alındığı regenerasyon ortamları ve regenerasyon oranı.....	103
Çizelge 4.14	Farklı oranlarda sulandırılmış kültür filtratlarının domates (<i>L. esculantum</i> L.) fidelerinde oluşturduğu % hastalık şiddeti.....	106

Çizelge 4.15.	Farklı oranlarda sulandırılmış kültür filtratlarının buğday (<i>T.aestivum</i> L.) fidelerinde oluşturduğu % hastalık şiddeti..	109
Çizelge 4.16.	Genç 99 buğday çeşidi embriyolarından elde edilen embriyogenik kalluslarının farklı oranlarda <i>F.culmorum</i> kültür filtratını içeren MS ortamı üzerindeki gelişme oranları.....	112
Çizelge 4.17.	Genç 99 buğday çeşidi embriyogenik kalluslarının farklı konsantrasyonlarda fusarik asit içeren MS ortamları üzerinde gelişme oranları	114
Çizelge 4.18.	Kallusların kültür filtratı içeren ve içermeyen ortamlardaki aylık büyüme indeksleri (Büyüme indeksleri; kallusların ay sonu ile ay başı ağırlık farkından elde edilmiştir.....	116
Çizelge 4.19.	<i>Fusarium</i> kültür filtratları ile Fusarik asitin buğday tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi	120

Şekil 3.1.	Bazı buğday çeşitlerinin Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı reaksiyonlarının testlenmesi için kurulan sera denemesinden genel bir görünüm: Uygulamada kullanılan buğday bitkileri için hazırlanmış parsel alanı.....	49
Şekil 3.2.	Bazı buğday çeşitlerinin Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı reaksiyonlarının belirlenmesi için sera koşullarında (a) ve torbalarda yetiştirilmiş buğday bitkileri (b).....	50
Şekil 3.3.	<i>F.graminearum</i> A-13 ve <i>F.culmorum</i> B-4 izolatları ile inokule edilmiş sera koşullarında (a) ve torbalarda yetiştirilmiş buğday başakları (b).....	53
Şekil 3.4.	Adana 99 buğday çeşidinden alınan olgunlaşmamış embriyo (a) ve buğday tanelerinin (b) 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındıktan sonraki görünümü.....	54
Şekil 3.5.	Seri 82 buğday çeşidinden alınan olgunlaşmış embriyoların 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındıktan sonraki görünümü.....	55
Şekil 3.6.	<i>F. culmorum</i> (B-4) ve <i>F.graminearum</i> 'dan (A-13) kültür filtratı elde etmek için hazırlanan fungal sıvı kültür.....	57
Şekil 3.7.	Kültür filtratı ve fusarik asitin tohumu çimlendirme üzerine etkisinin araştırıldığı denemeden bir görünüm	61
Şekil 3.8.	Fusarium izolatları ve χ DNA'nın %0.8'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	63
Şekil 4.1.	Bazı <i>Fusarium</i> spp. izolatlarının PDA ortamı üzerindeki gelişimi.	70
Şekil 4.2.	<i>F.graminearum</i> (a) ve <i>F.culmorum</i> 'un (b) PDA ortamı üzerindeki gelişimi	70"
Şekil 4.3.	<i>F.culmorum</i> a ait makrokonidiler (X40)	72
Şekil 4.4.	<i>F.graminearum</i> un fialid (a) ve makrokonidileri (b) (X40).....	72
Şekil 4.5.	<i>F.graminearum</i> 'un A-13 izolatının 30 ⁰ C PDA (a), Sabourad (b),	

	Malt Ekstrakt Agar (c), Czapek-Dox Agar(d), Sentetik Nutrient Agar (e) ortamları üzerindeki gelişimi.....	73
Şekil 4.6.	<i>F.graminearum</i> 'un A-13 izolatının 20, 25 ve 30 °C sıcaklıklarda ve beş farklı ortam üzerinde zamana bağlı koloni gelişimi.....	76
Şekil 4.7.	<i>F. culmorum</i> 'un B-4 izolatının 30°C PDA (a), Sabourad (b), Malt Ekstrakt Agar (c), Czapek-Dox Agar(d), Sentetik Nutrient Agar (e) ortamları üzerindeki gelişimi.....	77
Şekil 4.8.	<i>F.culmorum</i> 'un B-4 izolatının 20, 25 ve 30 °C sıcaklıklarda ve beş farklı ortam üzerinde zamana bağlı koloni gelişimi.....	80
Şekil.4.9.	<i>Fusarium</i> izolatlarının patojenitelerinin belirlenmesi. <i>F. graminearum</i> ile inokule edilmiş Seri 82 buğday bitkisi (sağ), Kontrol (sol).....	81
Şekil 4.10.	<i>F.graminearum</i> izolatlarının Seri 82 buğday bitkisini hastalandırma şiddeti	83
Şekil 4.11.	<i>F.culmorum</i> izolatlarının Seri 82 buğday bitkisini hastalandırma şiddeti.....	84
Şekil 4.12.	Buğday Başak Yanıklığı etmeni ile inokule edilmiş buğday başakları üzerinde oluşan hastalık belirtileri.....	86
Şekil 4.13.	Sera koşullarında yetiştirilen buğday çeşitlerinin Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı duyarlılıkları (%)......	89
Şekil 4.14.	Saksı koşullarında yetiştirilen buğday çeşitlerinde Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na duyarlılıkları (%)......	91
Şekil 4. 15.	Buğday başak yanıklığına neden olan hastalık etmeninin buğday tanelerinde yapmış olduğu zarar.....	93
Şekil 4.16.	Sera koşullarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın 100 tane ağırlığına etkisi verime olan etkisi (%)......	95
Şekil 4.17.	Saksı koşullarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın 100 tane ağırlığına etkisi verime olan etkisi (%)......	96
Şekil 4.18.	Kallus ortamı üzerinde kültüre alınmış olgunlaşmamış buğday	

	embriyolarından oluşan hızlı gelişen kırılğan ve beyaza yakın renkteki embriyogenik kalluslar	101
Şekil 4.19.	Seri 82 buğday çeşidi olgunlaşmamış tanelerinin 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmaları ve kallus oluşumu.....	101
Şekil 4.20.	Olgunlaşmamış Seri 82 buğday tanelerinin 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınması ile kallus oluşumu	101
Şekil 4.21.	Genç 99 buğday çeşidi olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen embriyogenik kalluslarının MS+0,5mg/l IAA+1 mg/l BAP+ %2 sakkaroz içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınması vebitki regenerasyonu (a, b, c, d).....	104
Şekil 4.22.	Genç 99 buğday çeşidinin embriyogenik kalluslarından bitki regenerasyonu (a-b) ve doğal koşullara adaptasyonu (c-d).....	105
Şekil 4.23.	<i>F. culmorum</i> 'un 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/90, 1/100 oranlarında sulandırılmış kültür filtratının domates (<i>L. esculantum</i> L.) fideleri üzerinde oluşturduğu simptomların uygulamadan 24 saat sonraki görünümleri.....	107
Şekil 4.24.	Farklı oranlarda sulandırılmış kültür filtratlarının domates (<i>L. esculantum</i> L.) fidelerinde oluşturduğu hastalık şiddeti.....	108
Şekil 4.25.	<i>F. culmorum</i> 'un 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/90, 1/100 oranlarında sulandırılmış kültür filtratının buğday bitkileri (<i>T. aestivum</i> cv. Seri 82) üzerinde oluşturduğu simptomlar.....	108
Şekil 4.26.	Farklı oranlarda sulandırılmış kültür filtratlarının buğday (<i>T.aestivum</i> L.) fidelerinde oluşturduğu % hastalık şiddeti.....	110
Şekil 4.27.	<i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> 'dan elde edilen kültür filtratının tütün yaprakları üzerinde a: <i>F. graminearum</i> kültür filtratının 1/30 (yaprağın sağ ayası) ve 1/40 (yaprağın sol ayası), b: Kontrol (destile su uygulaması), c: <i>F. culmorum</i> kültür filtratının 1/20 (yaprağın sağ ayası) ve 1/30 (yaprağın sol ayası) oranındaki uygulamadan 5 gün sonra. oluşturdukları simptomlar.	111
Şekil 4.28.	Genç 99 buğday çeşidi embriyogenik kalluslarının MS+2mg/L	112

	2,4-D + %2 sakkaroz + farklı oranlarda <i>F.culmorum</i> kültür filtratı içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınması ile <i>in vitro</i> seleksiyonu.....	
Şekil 4.29.	Genç 99 buğday çeşidi embriyogenik kalluslarının MS+ 2 mg/L 2,4-D+ %2 sakkaroz+farklı konsantrasyonlarda fusarik asit içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınması	114
Şekil 4.30.	Fusarik asit (a) ve % 30 <i>F.culmorum</i> kültür filtratı (b) içeren kallus ortamları üzerinde gelişen kallus kolonilerinin 2. alt kültürden sonra gelişmesine devam eden ve etmeyen kallusların genel görünüşleri.....	117
Şekil 4.31.	Fusarik asit (a) ve % 30 <i>F.culmorum</i> kültür filtratı (b) içeren ortamlar üzerinde gelişen kalluslardan elde edilen bitkicikler.....	118
Şekil 4.32	Selekte edilmiş kalluslardan bitki regenerasyonu (a) ve başak oluşumu.....	119
Şekil 4.33.	Fusarium izolatlarının kültür filtratları ile fusarik asitin buğday tohumlarının çimlenmesine etkisi.....	121
Şekil 4.34.	0,3 mM Fusarik asitin buğday bitkisinin köklerine etkisi.....	122
Şekil 4.35.	<i>F.culmorum</i> izolatlarının OPT-01 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).....	124
Şekil 4.36	<i>F.culmorum</i> izolatlarının OPT-04 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü(MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları)..	124
Şekil 4.37.	<i>F.culmorum</i> izolatlarının OPT-06 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).....	125

Şekil 4.38.	<i>F.culmorum</i> izolatlarının OPT-16 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).....	126
Şekil 4.39:	<i>F.culmorum</i> izolatlarının OPT-18 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).....	126
Şekil 4.40	<i>F.culmorum</i> izolatlarının OPU-13 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).....	127
Şekil 4.41	<i>F.culmorum</i> izolatlarının OPU-15 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).....	128
Şekil 4.42	<i>F.culmorum</i> izolatlarının OPU-19 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).....	128
Şekil 4.43	<i>F.culmorum</i> izolatlarının UBC-85 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).....	129
Şekil 4.44	<i>F.culmorum</i> izolatlarının RAPD-PCR çalışması sonucunda genetik yakınlıklarını gösteren NJ ile elde edilmiş dendogram (MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).....	130

Şekil 4.45	<i>F.graminearum</i> izolatlarının OPT-01 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).....	131
Şekil 4.46	<i>F.graminearum</i> izolatlarının OPT-04 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü(MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları)	132
Şekil 4.47	<i>F.graminearum</i> izolatlarının OPT-06 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü(MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).....	132
Şekil 4.48	<i>F.graminearum</i> izolatlarının OPT-16 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).....	133
Şekil 4.49	<i>F.graminearum</i> izolatlarının OPT-18 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).....	134
Şekil 4.50	<i>F.graminearum</i> izolatlarının OPU-13 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).....	134

Şekil 4.51	<i>F.graminearum</i> izolatlarının OPU-15 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).....	135
Şekil 4.52	<i>F.graminearum</i> izolatlarının UBC-85 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).....	136
Şekil 4.53	<i>F.graminearum</i> izolatlarının RAPD-PCR çalışması sonucunda genetik yakınlıklarını gösteren NJ ile elde edilmiş dendogram (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).....	137
Şekil 4.54	<i>In vitro</i> seleksiyonda elde edilen bitkilerin DNA'larının OPA-04 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan PCR ürünlerinin elektroforezi sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: Adana 99, S: Seri 82, G: Genç 99, Fa: Fusarik asit, Fc: <i>F. graminearum</i> , Fc: <i>F. culmorum</i>).	140
Şekil 4.55	<i>In vitro</i> seleksiyonda elde edilen bitkilerin DNA'larının OPA-05 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan PCR ürünlerinin elektroforezi sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: Adana 99, S: Seri 82, G: Genç 99, Fa: Fusarik asit, Fc: <i>F. graminearum</i> , Fc: <i>F. culmorum</i>).	141
Şekil 4.56	<i>In vitro</i> seleksiyonda elde edilen bitkilerin DNA'larının OPD-05 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan PCR ürünlerinin elektroforezi sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: Adana 99, S: Seri 82, G: Genç 99, Fa: Fusarik asit, Fc: <i>F. graminearum</i> , Fc: <i>F. culmorum</i>).	141

EKLER

Ek 1.	<i>F. graminearum</i> A-13 ve <i>F. culmorum</i> B-4 izolatların koloni ve misel gelişimini belirlemek amacıyla kullanılan ortamların içerikleri.....	162
Ek 2.	Araştırmada kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamının içeriği.....	163
Ek 3.	Fungusların DNA izolasyonunda kullanılan lysis buffer....	164
Ek 4.	DNA izolasyonunda Kullanılan PEG soluyonu.....	164
Ek 5.	DNA izolasyonunda kullanılan TE solusyonu.....	164
Ek 6.	EtBr.' nin hazırlanması.....	164
Ek 7.	<i>F. graminearum</i> ve <i>F. culmorum</i> 'un RAPD analizinde kullanılan oligonükleotidlerin isimleri, baz dizimlileri ve konsantrasyonları.....	165
Ek 8.	Moleküler Biyoloji Testlerinde Kullanılan Ortamlar ve Stok Solüsyonlarının İçerikleri	165
Ek 9.	Agarose jelin hazırlanmasında kullanılan TAE buffer	166
Ek 10.	Regenere edilen bitkilerinin RAPD analizinde kullanılan oligonükleotidler (primer), baz dizimlileri ve konsantrasyonları	167

SİMGELER VE KISALTMALAR

bp	: Base pair(Bazçifti)
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	: Etil Alkol
MEA	. Malt Ekstrakt Agar
ME	: Malt Ekstrakt
µl	: mikrolitre
µM	: Mikromol
ml	: Mililitre
PD	: Patates Dekstroz
PDA	: Patates Dekstroz Agar
CA	: Czapeck-Dox Agar
SNA	:Sentetik Nütrient Agar
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA (Tesadüfi Olarak Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SN	. Sentetik Nutrient
SNA	: Sentetik Nitrient Agar
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
TE	:Tris-EDTA

1. GİRİŞ

Fusarium culmorum (W.G. Smith Sacc.) ve *Fusarium graminearum* (Schwabe)'un neden olduğu Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı dünyanın pek çok yerinde ve ülkemizde buğday tarımı yapılan alanlarda ürün kalitesini bozarak verimi olumsuz yönde etkileyen ekonomik öneme sahip hastalıklardan birisidir. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı, buğday ve diğer tahıl ürünlerinde ABD'nin orta kısmında 1993 yılında 1 milyar dolarlık zarara neden olurken, 1993-2001 yılları arasında ABD'nin toplam ekonomik kaybı sadece bu hastalık nedeniyle yaklaşık 8 milyar dolar olmuştur (Nganje ve ark., 2004). Dünyada bu hastalık daha çok doğu ve batı Avrupa, Rusya, Çin, Brezilya, Kuzey Amerika, Güney Amerika ve Asya'nın önemli buğday üretim alanlarında görülmektedir.

Türkiye yılda 16-21 milyon ton buğday üretimiyle dünyada en fazla buğday yetiştiriciliği yapılan 10 ülke arasında yer almaktadır (Braun ve ark., 2001). Ülkemizde de Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı buğday tarlalarında rapor edilmiştir. Orta Anadolu Bölgesinde *F. graminearum*, *F. culmorum* ve *Bipolaris sorokiniana* 12 buğday çeşidinde %24 oranında ürün kaybına neden olmuştur (Hekimhan ve ark., 2004). Ankara ili buğday ekim alanlarında, *F. culmorum*, *F. graminierum*, *F. acuminatum*, *F. heterosporium* türleri tespit edilirken (Murat-Çavuşcuoğlu ve Hancıoğlu, 1995), Sakarya yöresinde *F. graminierum*, *F. moniliforme*, *F. culmorum*, *F. sporodotricoides*, *F. tritica*, *F. heterosporium* ve *F. avenacearum*'un buğday başak yanıklığına neden olduğu ve en yaygın şekilde *F. graminierum*'un görüldüğü belirtilmiştir (Aktaş ve Tunalı, 1993; Anonymus, 2001). Konya ve çevresinde 1993-1998 yılları arasında *F. culmorum* yoğun bir şekilde saptanmış ve 2000-2001 yılları arasında Konya ilinde *Fusarium* başak yanıklığından dolayı meydana gelen ürün kaybının %31 oranında olduğu bildirilmiştir (Anonymus, 2001). Aktaş ve ark., (1996) Marmara Bölgesinde *F. graminearum*'un *F. culmorum*'dan daha yoğun olarak görüldüğünü ve Türkiye'nin kuzey Anadolu bölgesinde Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın epidemiyeye neden olduğunu rapor etmişlerdir. Orta Anadolu Bölgesi'nde ise *F. culmorum* *F. graminearum*'a göre daha yaygın olarak görülmüştür (Aktaş ve ark., 1999). Adana ve çevresinde 2001-2002 yıllarında 282.494 hektar

alandaki buğday ekimi yapılmış ve tüm çeşitlerde özellikle Kadirli, Kozan ve İmamoğlu ilçelerinde buğdayda *F. culmorum* ve *F. graminearum* yoğun bir şekilde saptanmıştır. Ticari buğday çeşitleri arasında bu hastalığa karşı dayanıklı çeşitler bulunmamaktadır. Bu nedenle bu hastalığın önümüzdeki yıllarda buğday yetiştiriciliğinde önemli sorunlar oluşturabileceği düşünülmektedir (Anonymus, 2002).

Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı dünyanın pek çok yerinde nemli koşullarda tahılların çiçeklenme ve tane dolum dönemlerinde görülmektedir. Patojen buğdayı döllenme esnasında veya döllenmeden kısa bir süre sonra enfekte etmektedir. Akınsanmi ve ark. (2004), *F. graminearum*'un tarla koşullarında %14 oranında buğday başaklarını hastalandırdığını rapor etmiştir. Etmen tohumla taşınabilmekte ve ekim nöbeti uygulanmayan yerlerde özellikle çiçeklenme döneminden sonra aşırı yağışın olması durumunda önemli verim kayıplarına neden olmaktadır (Anonymus, 2002). Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan funguslar tarafından enfekteli taneler küçük ve buruşuk olmakta, bu taneler enfeksiyon nedeniyle çimlenme güçlerini kaybetmektedirler. Enfekteli taneler üzerinde gelişen funguslar, sekonder metabolitlerden olan mikotoksinleri üretirler (Bahrii ve Shaner, 1994). Mikotoksin üreten funguslar, çevrede yaygın olarak bulunur ve kültür bitkilerinin gelişme dönemlerinde, taşınma ve depolanma sırasında tarımsal ürünlere bulaşır. Uygun koşullar bulunduğu takdirde mikotoksin üretimi gerçekleşir. Fusarium türleri tarafından en yaygın olarak üretilen toksinler; Trichothecene (Deoxynivalenol, Nivalenol, T -2 Toxin, HT -2 Toxin, Diacetoxyscirpenol), Zearalenon, Fumonisin ve Moniliformin'dir. *F. culmorum* ve *F. graminearum* insan ve hayvan sağlığı için oldukça tehlikeli olan DON (deoxynivalenol) toksini üretmektedirler (Bruins ve ark., 1993, Harris, 1999). Bu toksin canlılarda bağışıklık ve sinir sistemini olumsuz yönde etkiler, karaciğer ve böbrek hastalıklarına, kas spazmı ve kusmaya, kansere hatta ölümlere dahi neden olurlar. Yüksek oranda toksin içeren tanelerle beslenen hayvanlar yavru atar. Toksinler depolanmış ürünlerde yıllarca bozulmadan kalabilen metabolitlerdir. Böyle bulaşık tanelerden yapılan ekmeğin ise zehirlenmelere yol açtığı saptanmıştır (Walker, 2001). Tanelerde maksimum kabul edilebilen DON miktarı ise 0,5-2 mg/kg oranındadır (Bai ve ark., 2001).

Dünyada Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'nı kontrol altına almak, toksin üretimini azaltmak için çeşitli çalışmalar yürütülmektedir (Badea ve ark., 1997; Yang ve ark., 1998; Miedaner ve ark., 2001; Buerstmayr ve ark., 2002; Mesterhazy ve ark., 2005). Alınan önlemlerle hastalığın yayılması kısmen engellenmeye çalışılsa da günümüzde hastalığın vereceği zararı azaltmak için uygulanan kültürel ve kimyasal mücadele yöntemleri ile hastalık etmeni Fusarium türleri tarafından üretilen toksinleri önlemek mümkün olamamaktadır. Hastalığın bitkiyi topraktan enfeksiyonunu engellemek için doğrudan kimyasal mücadele yöntemi bilinmemektedir. Tohum ilaçlaması ile fungusun tohumla taşınması önlenilmekte, ancak topraktan gelecek inokulum önlenememektedir. Özellikle Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı fungusitler kullanarak mücadele etmek buğdayda başaklanma ve çiçeklenmenin aynı dönemde olmamasından dolayı oldukça zor ve çok pratik değildir (Wilcoxson ve ark., 1992). Ayrıca kimyasal mücadelede yapılan yanlışlıklar, bunun sonucu olarak ortaya çıkan çevre kirliliği, dayanıklılık, doğal dengenin bozulması, insan ve hayvan sağlığına olumsuz etkiler gibi, son günlerde insanlığın en güncel sorunları arasında yer alan olumsuzlukların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Anılan nedenlerden dolayı buğdayda sözkonusu hastalığın bilinen mücadele yöntemleri ile tamamen kontrol altına alınması oldukça zor olup en etkin çözümün hastalığa dayanıklı çeşit veya çeşitlerin geliştirilmesi olarak görülmektedir (Wilcoxson ve ark., 1992, Anonymus, 2002).

Yapılan çalışmalarda dayanıklı çeşitlerde duyarlı çeşitlere göre daha düşük oranda DON toksin seviyesi tespit edilmiştir (Mesterhazy ve ark. (1999). Bu nedenle, Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklı çeşitlerin yetiştiriciliğinin yapılması hem ekolojik hem de ekonomik sorunların çözümünde yardımcı olacaktır. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı bitkilerde, dayanıklılık genlerinin varlığı bilinmesine rağmen, bunların klasik ıslah çalışmalarında kullanılması oldukça zor, pahalı ve uzun sürmektedir (Goral ve Arseniuk, 1997). Birçok bitki türünde klasik ıslah yöntemlerinin sonuç vermediği durumlarda *in vitro* doku ve hücre kültürü tekniklerindeki gelişmeler mutasyon ve *in vitro* seleksiyonla somaklonal varyasyondan yararlanarak değişik stres faktörlerine (soğuk, sıcak, kuraklık, toksin, tuzluluk, herbisit) karşı dayanıklı hücre hatlarının seçiminde yeni olanaklar

sağlamıştır. Buna bağlı olarak son yıllarda *in vitro* seleksiyon teknikleri klasik ıslah çalışmaları dışında yeni araştırma konularının ortaya çıkmasına da neden olmuştur (Kasem ve ark., 1996; Bai ve ark., 2001). *In vitro* seleksiyon teknikleriyle dayanıklı bireylerin seçimi tamamen laboratuvar koşullarında daha güvenilir ve kısa zamanda gerçekleştirmek mümkün olmaktadır.

Bazı fungal patojenlerin üretmiş olduğu mikotoksinler stres faktörü olarak *in vitro* veya *in vivo*'da kullanılmak suretiyle hastalığa dayanıklı bitki veya hücrelerin seleksiyonu mümkün olmaktadır. Bazı duyarlı hücreler seleksiyon aşamasında dayanıklı hücreler tarafından korunabilmekte ve duyarlı olan bu hücrelerden bitki regenerasyonu olabilmektedir. *In vitro* teknikleri bitki regenerasyonu çalışmalarında bu gibi dezavantajlara sahip olsa da, seleksiyon çalışmalarında somaklonal ve epigenetik varyasyonların adaptasyonlarını mümkün hale getirdiği için avantajlara sahiptir. Patojen faktörü olarak toksinler *in vitro*'da kullanılmak suretiyle çok kısa zamanda *Fusarium* Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı hücre hatları ve bu hücre hatlarından da hastalığa dayanıklı bitkiler elde edilebilmiştir (Bruins ve ark., 1993; Kasem ve ark., 1996; Yang ve ark., 1998).

Yapılan bu çalışma ile buğday yetiştiriciliğinin önemli sorunları arasında yer alan Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklı veya tolerant yeni çeşitler geliştirmek amacıyla bazı buğday çeşitlerinin embriyogenik kallusları kullanılarak *in vitro* seleksiyonla yeni hatlar elde etme olanakları araştırılmıştır. Bu bağlamda tarla koşullarından izole edilen *Fusarium* tür ve izolatları ve *in vitro* seleksiyon sonucu elde edilen bitkiler RAPD-PCR yöntemiyle moleküler analizlere tabii tutulmuş, farklılıklar ortaya konulmuştur.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**2.1. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı ile İlgili Çalışmalar**

Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan *Fusarium* türleri Ireta ve Gilchrist (1994)'in bildirdiğine göre ilk olarak 1891 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (Artur, 1891), daha sonra da 1902 yılında Japonya'da rapor edilmiştir. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı nemli, ılıman iklim koşullarına sahip bölgelerde örneğin, kuzey Avrupa, Asya özellikle Çin ve Japonya'da epidemi düzeyinde rapor edilirken, kuzey Afrika kıyılarında, Amerika Birleşik Devletleri'nin güney kısmında ve güney Kanada'da, güney Amerika'nın güney ucunda, özellikle Brezilya, Arjantin, Paraguay ve Uruguay'da (Arthur, 1891; Cullen ve ark., 1982; Gallic, 1989; Kohli, 1989; Saari ve Wilcoxson, 1974; Stack ve Mullen, 1985, Ireta ve Gilchrist, 1994) tespit edilmiştir. Ülkemizde ise Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı ilk kez 1993 yılında belirlenmiştir (Aktaş ve Tunalı, 1993).

Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na genellikle *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. nivale*, *F. avenaceum* neden olmaktadır. Dünyada *Fusarium* Başak yanıklığı Hastalığı'na daha çok *F. graminearum* neden olmaktadır. Avrupa'da ise genellikle bu hastalığa neden olan etmen *F. culmorum* olarak belirlenmiştir. Sıcak iklim koşullarına sahip bölgelerde *F. graminearum* gelişirken, serin yerlerde *F. culmorum* daha yaygın olarak görülmektedir (Snidjers, 1989). Bu iki hastalık etmeninin dışında bazı *Fusarium* izolatlarının da buğdayda Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olduğu saptanmıştır (Wang ve Miller, 1988).

Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan etmen veya etmenlerin farklı tipte enfeksiyon yaptığı belirlenmiştir. Bu enfeksiyon tipleri; sporodochiaların üretmiş olduğu makrokonidilerle, perithecium içindeki askosporlarla, bitki artıklarında yada toprakta canlılığını koruyan klamidosporelerle, buğday bitki artıkları üzerinde canlı kalan misellerle, bitki artıklarında yada enfekteli taneler üzerinde bulunan makrokonidilerle olmaktadır. Hastalık etmenleri tarafından ilk enfeksiyon askospor yada makrokonidiler tarafından çiçek ve anterler üzerinde oluşmaktadır. Makrokonidiler 16-36°C sıcaklıklar arasında oluşurken optimum gelişme sıcaklığı

32°C, peritheciyumlar ise 13-33°C sıcaklık arasında oluşurken, optimum gelişme sıcaklığı 25-28°C olarak belirlenmiştir. Perithecium ve askosporların oluşumu için ultraviole ışınları oldukça önemli olup, yaklaşık bu değer 390 nm olarak saptanmıştır. (Andersen, 1948; Teich ve Nelson, 1984; Reis, 1989).

Makrokonidilerin konukçu dokusu üzerinde çimlendiği ve enfeksiyon çivisini oluşturduğu, enfeksiyon çivisini oluştururken nemli bitki yüzeyine yapıştığı, bitkiye giriş yapmadan önce kutikula üzerinde kolonize olduğu, stomalardan giriş yaptıktan sonra intracellular olarak çoğaldığı, enfeksiyon boyunca buğday yaprak dokusunu oluşturan hücreler arasında geliştiği, enfeksiyondan 48 saat sonra stomaların arasında yaprak yüzeyinde makrokonidilerin yoğun bir şekilde geliştiği gözlemlenmiştir. Bunu takiben, dokularda gözle görülebilen bir pörsümenin olduğu tespit edilmiştir (Teich ve Nelson, 1984; Reis, 1989).

Ireta ve Gilchrist (1994)'in bildirdiğine göre ilk olarak Andersen (1948), hastalık etmeninin buğday çiçeklerini enfekte ettiğini ve uygun koşullar bulana kadar fakültatif saprofit olarak yaşadıklarını belirlemiştir. İnokulasyonun gerçekleşmesi için rüzgar ve yağmura ihtiyaç olduğunu ve etmenin uygun koşulları bulduğunda aktif duruma geçtiğini tespit etmiştir. Strange ve ark., (1974) buğday anterlerinin amonyum bileşikleri olan kolin ve betain ürettiğini, bu bileşiklerin buğday çiçeklerinde patojenin gelişmesini teşvik ettiğini tespit etmişlerdir. Bu bileşiklerin normal koşullarda buğday bitkisinde bulunduğunu, ancak enfeksiyondan sonra konsantrasyonunda artışlar olduğunu saptamışlardır.

Bazı araştırmacılar, etmen tarafından enfekte edilen bitki dokularının kısa zamanda klorofil kaybına uğradığını tespit etmişlerdir. Hastalanan çiçek organlarının (özellikle dış kavuzlar) hafifçe koyulaşıp ve yağımsı bir görünüm aldığını, pembe renkte sporlar oluştuğunu ve yüksek nem içeren koşullarda ise fungusların koyulaşarak siyah renge dönüştüğü belirlenmiştir (Teich ve Nelson, 1984; Reis 1989).

Wilcoxson ve ark. (1992), yaptıkları bir araştırmada bütün küçük taneli tahılların bu hastalıktan etkilendiğini tespit etmişlerdir. Hastalık şiddetli olduğunda %50'den fazla verim kaybı ile birlikte tane kalitesinde belirgin bir azalma olduğunu gözlemişlerdir. *Fusarium* tarafından enfekteli tanelerde buruşukluk, protein miktarında azalma ve böylece tane kalitesinde azalmanın olduğunu ortaya

koymuşlardır. Yapılan analizler sonucunda %5'ten fazla hastalıklı tane bulunan ürünlerin insan ve hayvan sağlığına zararlı olabileceğini belirlemişlerdir.

Araştırma sonucunda Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan başlıca etmenlerden *F. graminearum* Schw (syn. *F. roseum* Lk. Synd &Hans cv. *graminearum*, eşeyli dönemi; *Gibberella zeae* (Schw). Petch. Syn. *G. roseum* f.sp. *cerealis* cv. *graminearum*; *G. saubineti* (mont.) Sacc.)) laboratuvar koşullarında PDA ortamı üzerinde pembeden kahverengiye doğru değişen koyu kırmızımsı bir misel tabakası oluşturduğu ve 24-26 °C sıcaklıkta gelişim gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucuna göre; *F. graminearum*'un kısa lateral fialidler oluşturduğu ve bunların 3.5-4.5µX10-14µ uzunluğunda olduğu, kültür ortamı üzerinde fialidlerin sprodochia yapıları oluşturduğu saptanmıştır. *F. graminearum*'un makrokonidiler oluşturduğu, bunların kano şeklinde olduğu ve 2.5-5µX35-62µ uzunluğunda olduğu ve makrokonidilerin ayak hücrelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Klamidosporların ise hif uçlarında veya ortasında bulunduğu, bunların balon şeklinde 10-12µ uzunluğunda olduğu, tarla koşullarında perithecium oluşturan ender türlerden biri olduğu ve peritheciumun uzun yıllar hastalık etmeninin canlı kalmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Booth, 1977, Gerlach ve Nirenberg, 1982, Nelson ve ark., 1983).

Chen ve ark. (2000), *F. graminearum*'un tek spor ve tek askospor izolasyonunu mikroskopik olarak araştırmışlardır. Ferric ammonium sulfate-hematoxylin boyaması ile farklı ve aynı izolatlar arasında aynı çim borucukları, askuslar veya konidporlar arasında farklı germtüpleri ve askospor ya da konidiosporlar arasında hifsel füzyonu (anastomosis) gözlemişlerdir. Çok hücreli askospor ve konidiosporların her biri tek bir hücre çekirdeğine sahip olduğu ve bunların sadece %2 sinde konidiofor hücrelerinde iki hücre çekirdeğinin bulunduğunu belirlemişlerdir. Çim borucuklarından oluşan hücrelerin tamamının 2-7 (genelde 3-5) hücre çekirdeğine, hifsel hücrelerin ise 1-7 (genelde 3 den az) hücre çekirdeğine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Hifsel füzyon köprüsünde bir veya iki hücre çekirdeği gözlenebildiğini, fakat köprüdeki tek hücre çekirdeğinin iki hücre çekirdekli füzyon sonucu mu meydana geldiğini belirleyemediklerini bildirmişlerdir.

Buğdayda başak yanıklığına neden olan etmenlerden *F. culmorum* (W.G. Smith), syn: *F. roseum* laboratuvar koşullarında 25 °C sıcaklıkta PDA ortamı üzerinde karmen kırmızısı bir misel tabakası oluşturduğu araştırmalar sonucu tespit edilmiştir. *F. culmorum*'un monofialidler oluşturduğu, bu fialidlerin genellikle 3.5-5µmX15-20µm uzunluğunda olduğunu belirlemişlerdir. *F. culmorum*'un sadece makrokonidiler oluşturduğu, bu konidilerin kalın duvarlı kısa ventral ve dorsal yüzeyde kıvrımlara sahip olduğu, genellikle bunların 5 septalı olup 5-7.5X31-50µm uzunluğunda olduğu, oluşan makrokonidilerin *F. graminearum*'un konidilerinde olduğu gibi ayak hücrelerine sahip olduğu saptanmıştır. Klamidosporların genel olarak yaygın olmadığı ve çoğunlukla hiflerin ortasında bulunduğu, klamidosporların oval şekilde, tek yada zincir halinde bulunduğu ve 9-12µmX10-14µm uzunluğunda olduğu belirlenmiştir. *F. culmorum*'un tarla koşullarında perithecium oluşturup oluşturmadıklarının bilinmediği, *F. culmorum* kültür ortamı üzerinde nispeten stabil olmasına rağmen mutantların oluşabileceği, bu nedenle araştırmalarda tek spor izolasyonlarının yapılması gerektiği bildirilmiştir (Booth, 1977; Gerlach ve Nirenberg, 1982; Nelson ve ark., 1983).

2.2 Mikotoksinler

Bazı *Fusarium* türleri insan ve hayvanlarda fizyolojik ve farmakolojik zararlara neden olan sekonder metabolitler üretirler ki bunlar mikotoksin olarak isimlendirilirler (Nelson, 1993). Nüfus artışıyla ve gereksinim duyulan yiyecek miktarındaki artışla beraber toksinler büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Mikotoksinler düşük molekül ağırlığına sahip olup hücre metabolizmasında protein sentezini engellerler. Bunun yanı sıra mikotoksinler hücre membranına zarar vererek hücrenin lizise uğramasına neden olurlar. Hayvanlarda bulunan alyuvar kan hücrelerine toksik etki yaparak bu hücrelerin zarar görmesine neden olurlar (Wilcoxson ve ark., 1992, Nelson, 1993). Zararlı olan toksin miktarı hayvanlara göre değişmektedir. Bu toksin grubuna en duyarlı hayvan ise domuzlardır. Toksinler sığır ve atlarda deri soyulmasına, domuzlarda kıl dökülmesine neden olurlar. Tavuklarda ise tüy dökülmesi gözlenir ve

bazı hayvanlarda ise yüksek oranlarda ölümlere rastlanır (Möller, 1973). Toksinler insanlarda ise mide kanserine neden olmaktadır.

Mikotoksinlerin oluşmasında etkin olan faktörler,

- a) Mikotoksin üreten funguslar tarafından duyarlı konukçunun enfeksiyonu,
- b) Hastalığın gelişmesine etki eden çevresel faktörler,
- c) İnsan ve hayvanlarda zararlı metabolizma üretecek fungusların yapıları olarak belirlenmiştir (Marasas ve ark., 1988).

Sekonder metabolitler normalde hücrenin biyokimyasında ihtiyaç duyulmaz. Bunlar türe özgüdür, örneğin *F. graminearum* DON toksini üretirken *F. moniliforme* fumonisins üretmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda *Fusarium* türlerinin meydana getirdiği toksinler; Zearalenone, Vomitoxin (deoxynivalenol, DON), T-2 toksini, HT-2 toksini, Diacetoxyescirpenol, Ochratoxin Butenolide, Culmorin, Culmorone, Deoxysambucinol, Dihydroxyapotriconothione, Sambucinol, 7 Hydroxycalonectrin, Calonectrin, 8 Hydroxycalonectrin, 3 Acetildeoxynivalenol, 15 Acetildeoxynivalenol, Dihydroxycalonectrin, Zearalenone, Fusarin C, Fumonisins, Deoxynivalenol ve Nivalenol olarak belirlenmiş olup, en çok bilinen sekonder metabolitin trichothecene mikotoksini ve fumonisins olduğu saptanmıştır (Gelderblom ve ark., 1988; Miller, 1986; Trenholm ve ark., 1994; Nelson, 1993). Bu mikotoksinlerden bazılarının hala fonksiyonları tam olarak bilinmemesine rağmen DON toksininin tek çenekli bitkilerde pathogenesisde önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur (Bai ve ark., 2001).

F. graminearum ve *F. culmorum* türleri coğrafik dağılımlarına göre deoxynivalenol (DON), zearalone yada nivalenol toksini üretmektedirler. *F. graminearum* ve *F. culmorum*'dan elde edilen DON toksini ilk olarak 1950 yıllarında Japonya'da saptanmıştır. İnsanlar üzerinde hastalığa neden olan bu toksin *F. graminearum* tarafından üretilmekte ve vomitoksin olarak da bilinmektedir. Doğal koşullar altında patojenik veya heterotallik türlerde DON, 15-ADON toksini ve düşük oranda zearalone toksini üretirlerken gelişim oldukça hızlı olmaktadır. Patojen olmayan yada homotallik türler ise DON, 15-ADON üretmemekte, buna karşın yüksek oranda zearalone üretmektedir. Bu türlerin gelişimi ise oldukça yavaştır (Wang ve Miller, 1988; Wilcoxson ve ark., 1992). Yapılan çalışmalarda en az zearalone toksini en çok

perithecium oluşturan fusarium ırklarında gözlenmiştir. Bunun nedenin ise yüksek miktardaki zeralone toksininin perithecium oluşumunu engellediği düşünülmektedir (Wang ve Miller, 1988). İnsanlarda maksimum alınmasına müsaade edilen DON toksin miktarı erginlerde 3 µg/kg çocuklarda ise bu oran 1.5 µg/kg olarak belirlenmiştir (Gilbert ve ark., 2001).

Maier ve Oettler, (1996) iki farklı *F. graminearum* izolatının 36 farklı tritikale çeşidi üzerinde göstermiş olduğu patojeniteyi tespit etmek ve DON toksin miktarını belirlemek amacıyla iki yıllık bir çalışma yapmışlardır. *F. graminearum* kültürlerinden hazırlanan 3×10^5 spor/ml yoğunluğundaki spor süspansiyonunu sprey şeklinde uygulayarak tritikale başaklarını inokule etmişlerdir. Deneme sonucunda bütün tritikale çeşitleri buğday başak yanıklığından farklı düzeylerde etkilenmişlerdir. Her iki izolatın çeşitler üzerinde şiddeti farklı olmuş ve tane ağırlığındaki kayıpların %25-50 oranında değiştiğini tespit etmişlerdir. İzolatların çeşitler üzerindeki etkisinin tritikale çeşitleri üzerinde yıldan yıla değişiklik gösterdiğini belirlemişlerdir. Dayanıklı olduğu tespit edilen beş tritikale çeşidinde yapılan ölçümler sonucunda DON toksin miktarı 68 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Ayrıca inokulasyon için kullanılan iki *F. graminearum* izolatının *in vitro*'da üretmiş olduğu DON toksin üretimiyle, hastalığın saldırganlığı ve tanelerde DON toksin oluşumu arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını saptamışlardır.

Hart ve Schabenberger (1998), *F. graminearum* ile enfekteli buğday başaklarında önemli zararlar oluşturan ve sekonder bir metabolit olan DON toksinini (vomitoksin) tespit etmek amacıyla tesadüfen toplanan buğday tanelerinden toksin analizi yapmışlardır. Her bir örnekten alınan 50 gr buğday unundan yapılan analiz sonuçlarına göre analiz yapılan toplam örneğin %95'inde 1µg/g vomitoksin saptamışlardır. Alınan örneklerin %5-12'sinde ise toksin miktarını 0.5 µg/g olarak belirlemişlerdir.

Harris, (1999) trichothecene toksini üreten ve üretmeyen *F. graminearum* izolatlarının mısır bitkisinde hastalık oluşturma derecelerini araştırmıştır. Mısır koçanları *F. graminearum*'un yabani veya trichothecene geninin engellenmesiyle trichothecene biyosentezini yapamayan transgenik ırkları ile, trichothecene üreten ırklar ve rekombinasyon vasıtasıyla yeniden trichothecene üreten ırklarla inokule

edilmiştir. Mısır koçanlarının inokulasyonu ise makrokonidilerden oluşan spor süspansiyonunun mısır koçanlarına sprey şeklinde uygulanması ve mısır koçan tanelerinin enjeksiyonla inokulasyonu şeklinde olmuştur. Hasat edilen mısır koçanları daha sonra hastalık şiddetini, ürün miktarını ve DON toksin miktarını tespit etmek amacıyla test edilmiştir. Ayrıca PCR ve ergestrol saptama yöntemiyle fungal biyokütle test edilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda toksin üretmeyen *F. graminearum* izolatlarının mısır koçanlarında hastalığa neden olduğu, fakat toksin üreten ırklara ve gen rekombinasyonuna uğramış ırklara göre virülensliklerinin daha az olduğu tespit edilmiştir. Her iki inokulasyon metodunun da etkili olduğu, tanelerin enjeksiyonla inokulasyon oranının %100, sprey şeklinde inokulasyonu ise %94 oranında etkili olduğu belirlenmiştir. Trichothecene toksinin mısır koçanlarında protein sentezini engellediği, bitkinin patojene karşı savunma mekanizmasını baskı altına aldığı ya da zarar verdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak trithochene toksinlerinin mısırlarda *F. graminearum* ırkının virülensliğini arttırdığını tahmin etmiştir.

Bai (1996), 9 buğday çeşidinin 6 *F. graminearum* izolatına karşı reaksiyonlarını ve buğday genotiplerinin dayanıklılık derecelerini araştırmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda izolatların buğdayı hastalandırma açısından farklılıklar gösterdiği ve izolatların konukçuya özgü olmadıkları saptanmıştır. *In vitro* da yapılan çalışmalarda ise *Fusarium* izolatlarının 8 kez PDA ortamı üzerinde alt kültüre alınmasına rağmen virülensliklerini kaybetmedikleri belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan buğday çeşitlerinden Ning 7840, Suma, 3, Sumai 49, Fu 5114 genotiplerinin hastalık etmeni *Fusarium* türlerine karşı dayanıklı oldukları belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan fungusların dayanıklı çeşitlerde inokule edilen başaktan inokule edilmemiş başaklara yayılma oranı %20 den daha az olmuş, ancak hastalığın yayılmasının inokulasyondan 12 gün sonra gerçekleştiği saptanmıştır. Duyarlı bir çeşit olan Clark buğday çeşidinde ise inokulasyondan 8 gün sonra hastalığın tüm başaklarda yayıldığı gözlenmiştir. Başağın uç kısmında oluşan ani solgunluğun duyarlı çeşitlere özgü bir belirti olduğu ifade edilmiştir.

Derviş (1999), Ohiao eyaletinin (ABD) çeşitli bölgelerinden elde edilen *F. graminearum* izolatlarının patojeniteleri arasındaki farklılıkları araştırmıştır. Bu

izolatlardan en virulent olanı seçilerek bazı dayanıklıXdayanıklı kışlık buğday varyetelerinin Fusarium Başak Yanıklığı'na karşı dayanıklılıklarını değerlendirmek için yapılan segregasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Patojenite düzeylerinde, aynı bölgeden alınan isolatlar arasında bile önemli derecede farklılıkların olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, segregasyon yapan hatlar hakkında bir dizi genelleme yapılmıştır. Ning 7840'ın dayanıklılık için multigen taşıdığı tespit edilmiştir. Ayrıca Freedom ve Ning 7840'ın dayanıklı genlerinden en az bir tanesinin birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. DayanıklıXdayanıklı melezlerinde gözlemlenen dayanıklılık seviyesi buğday çeşidini Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı korumada yeterli görünse de, gelecekte daha yüksek dayanıklılık seviyelerinin ortaya konulmasında faydalı olacağı belirlenmiştir. Daha dayanıklı çeşitler tanımlandıkça bunların, daha güncel ama duyarlı çeşitlerle yer değiştirebileceği ileri sürülmüştür.

Mesterhazy ve ark. (1999), Avrupa'da yetiştirilen farklı dayanıklılık derecesine sahip 20 (1990-93) ve 25 (1994-96) buğday çeşidi, 8 adet *F. graminearum* ve 4 adet *F. culmorum* isolatları kullanarak; enfeksiyon yoğunluğunu, isolatların patojenitesini ve buğday genotipine bağlı olarak patojen bitki interaksiyonunu araştırmışlardır. Buğday çeşitlerinde *F. graminearum* ve *F. culmorum* isolatlarının buğday başaklarındaki enfeksiyon oranını, ürün kayıplarını ve tanelerdeki kalite farklılığını ortaya koymuşlardır. Hastalık etmeninin buğday çeşitleri üzerinde DON toksini üretimi açısından farklılıklar oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıklar buğday çeşidindeki tolerans mekanizması ile açıklanmıştır. Tanelerdeki enfeksiyona karşı dayanıklılık *Fusarium* spp'nin buğday başaklarında yapmış olduğu zararın azalmasına göre hesaplanmıştır. Düşük enfeksiyon gözlenen buğday genotiplerinde, yüksek DON toksini miktarı bulunmuş veya aksine bir durum tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan dayanıklı çeşitler hastalık etmenine karşı stabil reaksiyon gösterirken, duyarlı çeşitler çok farklı reaksiyonlar sergilemişlerdir. Yapılan araştırmalar sonucunda agresif *Fusarium* spp. isolatları ile DON toksini üretimi arasında pozitif bir ilişki tespit edilmiştir. Bu korelasyon *Fusarium* isolatlarından DON, Zeralone ve Nivalenol toksini içeren isolatlarda etkin bir şekilde gözlenmiştir. Trichothecena toksin üretim kapasitesi arttıkça patojenitenin arttığı tahmin edilmektedir. Alınan sonuca göre, Avrupa'dan elde edilen *Fusarium* isolatlarından

buğday çeşitlerine spesifik izolatlar tespit edilememiştir. Bu durumun tanelerdeki enfeksiyon, toksin oluşumu ve ürün azalması için de geçerli olduğu ve dayanıklılığın horizontal bir dayanıklılığın olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak çeşitler arasında *F. graminearum* ve *F. culmorum*'a karşı dayanıklılık arasında bir fark gözlenmemiştir.

Evans ve ark. (2000), enjeksiyon yöntemi ile yapılan buğday başaklarının inokulasyonundan 48 saat sonra DON ve A-DON toksinini tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre inokulasyondan sonraki nem ve sıcaklık gibi çevre faktörlerinin toksin üretiminde etkili olduğu tespit edilmiştir. Sonuçta yapay enfeksiyonlarda çevre faktörünün çok önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Bai ve ark. (2001), tarla ve sera koşullarında değişik ülkelerden seçilen 116 buğday çeşidini, bitkilerin çiçeklenme döneminde farklı *F. graminearum* izolatlarını karıştırarak 1000 spor/ml konsantrasyonundaki bir spor süspansiyonu ile enjeksiyon yöntemi kullanılarak inokule etmişlerdir. İnokule edilen bitkiler 23-25⁰C sıcaklıkta %100 nemli koşullarda 4 gün tutulduktan sonra normal gelişme ortamına alınmış ve inokulasyondan 21 gün sonra hastalık değerlendirilmeleri yapılmıştır. Daha sonra hastalıklı buğday taneleri toplanarak içerdikleri toksin miktarını belirlemek amacıyla HPLC analizlerine tabii tutulmuşlardır. Deneme sonucunda bütün buğday çeşitlerinde buğday başak yanıklığı simptomlarının belirtileri gözlenmiş, fakat çeşitlerin reaksiyonlarında farklılıklar tespit edilmiştir. Dayanıklı buğday çeşitlerinde enfekteli olan başakların oranı % 5, duyarlı olan buğday çeşitlerinde ise enfekteli başakların oranı %100 olarak tespit edilmiştir. Dayanıklı çeşitler daha çok Çin'den seçilen buğday çeşitlerinde görülmüş ve enfekteli başak oranı %10'dan daha az oranda belirlenmiştir. Amerika Birleşik Devletlerinden getirilen buğday çeşitlerinde enfekteli buğday başaklarının oranı ise %20'den daha az olduğu gözlenmiştir. Sera koşullarında DON toksin seviyesi çeşitlere bağlı olarak 283 mg/kg oranında, tarla koşullarında ise 2.8-52 mg/kg oranında tespit edilmiştir. Sera koşullarında 16 buğday hattında DON toksin miktarı 2 mg/kg 'dan daha az olarak belirlenmiştir. Çoğu Çin buğday çeşitlerinde Tip II dayanıklılık tespit edilememiş, düşük oranlarda ise DON toksini ürettikleri gözlenmiştir. Buğdayda hastalık simptomu, tohum kalitesi ve toksin miktarı arasında bir korelasyonun varlığı tespit edilmiştir. Daha az hastalığın gözleendiği başaklarda ve tanelerde daha az DON toksini belirlenmiştir. Sumai 3 buğday çeşidi

ise *Fusarium* Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklılık göstermiş ve az oranda DON toksini tespit edilmiştir. Sonuç olara, Sumaii 3 ve bunun türevlerinin Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklı bitki olarak buğday yetiştiriciliğinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Gilbert ve ark. (2001), prinç ortamı üzerinde vegetatif uyum grubu (VCG) oluşturma özelliği çok yüksek olan, ergestrol ve toksin üretiminde farklılık gösteren 15 adet *F. graminearum* izolatının buğday başaklarını hastalandırma derecesini ve patojenlerin şiddetini belirlemek için araştırma yapmışlardır. Uygulanan çalışmada 4 buğday çeşidi üzerinde iki farklı inokulasyon yöntemi (injeksiyon ve sprej yöntemi) uygulanmıştır. Sonuç olarak bütün izolatlar injeksiyon metodunda 17.2-39.1 oranında, sprej yönteminde ise 39.1-69 oranında bitkileri hastalandırarak birbirine yakın virülenslik göstermişlerdir. Bitkilerin inokulasyonunda sprej yönteminin daha etkili sonuç verdiği bildirilmiştir. Hastalık yoğunluğu, ergestrol üretimi ve toksin üretimi arasında bir korelasyonun varlığı gözlenmemiştir. Nitrat kullanan yararlı olmayan mutant; 15 izolat ve 14 VCGs içerisinde gruplandırılmıştır. Çeltik üzerinde bütün izolatlar 0.2-249 ppm deoxynivalenol (DON) toksini üretmişlerdir. 15 izolattan 14 tanesi 0.4-44,6 ppm 15-acetyldeoxynivalenol toksini üretmişlerdir. Sonuç olarak Kanada kökenli *F. graminearum* izolatlarında bazı karakterlerde çok fazla varyasyonun olduğu tespit edilmiştir.

Miedaner ve ark. (2001), buğday genotipin ve çevre faktörünün *Fusarium* Başak Yanıklığı Hastalığı'na ve DON toksini üretimine olan etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada farklı dayanıklılık derecesine sahip 12 çavdar, 8 buğday ve 6 tritikale çeşidi, kontrollü ve doğal koşullar olmak üzere iki farklı çevre faktörü kullanmışlardır. Çalışmada buğday başak yanıklığına neden olan *F. culmorum* izolatı kullanmışlardır. Bitkiler çiçeklenme dönemine geldiklerinde *F. culmorum* izolatından 5×10^5 spor /ml yoğunluğunda hazırlanan spor süspansiyonunun bitkilere sprej şeklinde uygulanmasıyla inokulasyon gerçekleştirilmiştir. Deneme sonucunda başak yanıklığına karşı 8 dayanıklı çeşit ve enfekteli taneler içerisinde DON, 3-DON ve ergestrol tespit edilmiştir. Kontrollü koşullar altında yapılan çalışmada buğday çeşitleriyle çavdar çeşitleri hastalık etmeninden benzer oranda etkilenmişler, fakat buğday genotiplerinde DON üretimi çavdardan 2 kat daha fazla olmuştur. Tritikale,

buğday ve çavdara göre hastalıktan daha az etkilenmiş, DON toksin üretimi çavdar bitkisindeki kıyasla biraz daha fazla olmuştur. Buğday ve Çavdar Başak Yanıklığı Hastalığı'na benzer yoğunlukta yakalanmış, fakat çavdarda tane ağırlığı hastalıktan daha az etkilenmiş ve tanelerde DON toksin üretimi buğday bitkisine göre 9 kat daha az oranda olduğu belirlenmiştir. Çavdar ve buğday genotipleri arasında DON toksin üretimi arasında farklılıklar belirlenmiştir. Sonuç olarak Başak Yanıklığı'nın bitkileri hastalandırma derecesi ve toksin üretimi açısından, genotip ve çevrenin önemli faktörlerden olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber tanelerde toksin üretiminin direk çevre faktörüyle ilişkisinin olmadığı, ayrıca hastalığa karşı dayanıklı genotiplerde DON toksin üretiminin daha az olduğu vurgulanmıştır.

Carter ve ark. (2002), Avrupa, USA ve Nepal'den buğday ve mısır tarlalarından toplanan 188 *F. graminearum* izolatını SCAR yöntemi uygulayarak test etmişlerdir. Bunlar 3 farklı genotip olarak (A,B,C) isimlendirilmiş, A ve B grubundaki izolatlar Nepal'den C grubundaki izolatlar ise Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerinden gelen izolatları oluşturmuştur. *F. graminearum* izolatlarından 118'inden 42'si RAPD-PCR ile analiz edilmiş ve izolatlar analiz sonuçlarına göre gruplandırılmışlardır. Mısır ve buğdayda yapılan patojenite testleri sonucunda C grubundaki izolatların A ve B grubundaki izolatlara göre daha agresif olduğu tespit edilmiştir. İzolatlar için uygulanan toksin analizi sonuçlarına göre trichothecenes grubu toksinlerden olan nivalenol (NIV) ve DON toksini tespit edilmiştir. A grubundaki izolatlar NIV yada DON grubu toksin üretirken, B grubundakiler genelde NIV toksini, C grubundakiler ise genellikle DON toksini üretmişlerdir. A grubunda her iki toksini üreten izolatlar buğdayda eşit düzeyde patojenite gösterirken, mısırdaki ise NIV toksini üreten izolatlar daha az patojenite göstermişlerdir. Sonuç olarak; *F. graminearum* yaygın olarak Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olduğu ve her iki konukçuda da önemli ölçüde ekonomik zararlara neden olduğu belirlenmiştir.

Langevin ve ark. (2004), tahıllarda görülen Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'nın, Fusarium izolatlarının ürettiği trichothecenes toksini ile ilişkisini araştırmışlardır. Denemede 6 farklı tahıl türü ve iki farklı *F. graminearum* ırkı kullanmışlardır. Denemede kullanılan *F. graminearum* ırklarından birisi trichothecenes toksini üretirken (Tri+5), diğeri ise mutasyona uğratılmış ve toksin

üretmemektedir (Tri-5). İnokulasyondan sonra yapılan incelemede trithohecene üreten ırkın genel olarak daha agresif olduğu, fakat bunun daha çok kültür bitkisi çeşidine bağlı olduğu belirlenmiştir. Hastalığa dayanıklı bir çeşit olan çavdar ve yulaf bitkisi üzerinde iki *F. graminearum* ırkının agresifliği arasında fark gözlenmemiş ve bu bitkiler hastalığa karşı dayanıklılık reaksiyonu göstermişlerdir. Arpa bitkisi söz konusu hastalığa karşı dayanıklı olmasına rağmen (2.tip dayanıklılık) inokulasyondan sonra hastalığın hızla inokule edilmemiş başaklara da yayıldığı gözlemlenmiştir. Ekmeklik buğdayın trithocenes toksini üreten *Fusarium* ırkına karşı daha duyarlı olmasına rağmen, toksin üretmeyen ırka karşı oldukça dayanıklı olduğu saptanmıştır. Tritikalenin her iki ırka karşı ekmeklik buğdaylara benzer reaksiyon gösterdiği belirlenmiştir. Makarnalık buğday çeşitlerinin toksin üreten *Fusarium* ırklarına karşı oldukça duyarlı, toksin üretmeyen ırklara karşı ise orta derecede dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, trithothecenes toksini üretmeyen *Fusarium* ırklarının, buğday, çavdar, arpa, tritikale ve çavdar başaklarında yayılamaması ile ve makarnalık buğday başaklarında hastalığın yayılma şiddetinin azalmasının başlıca nedeninin trithocenes toksininin hastalığın yayılması ve gelişmesinde majör rol oynadığından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.

Mesterhazy ve ark. (2005), 1999-2000 yıllarında 7 *Fusarium* spp. ve *F. nivale* izolatlarını kullanarak farklı buğday çeşitlerinin yukarıda belirtilen etmenlere karşı dayanıklılığını test etmişlerdir. Bunun için buğday bitkileri *Fusarium* izolatlarından hazırlanan spor süspansiyonlarının sprey şeklinde buğday başaklarına uygulanmasıyla inokule edilmişlerdir. Çalışmada buğday, çeşitlerinde *Fusarium* Başak Yanıklığı Hastalığı'nın şiddeti, hastalıktan zarar gören tanelerin oranı, hastalığın ürün miktarına etkisi ve *Fusarium* izolatlarının DON toksin üretim miktarı araştırılmıştır. *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. sambucinum* ve *M. nivale*, izolatlarına karşı buğday genotiplerinin benzer dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir. Buğday genotipleri ve *Fusarium* izolatları arasındaki farklı bir ilişki tespit edilememiştir. Sadece *F. culmorum* ve *F.graminiarum* izolatlarının DON toksini ürettiği gözlemlenmiştir. *Fusarium* Başak Yanıklığı Hastalığı'nın şiddeti, hastalıktan zarar gören tanelerin oranı, hastalığın ürün miktarına etkisi ve *Fusarium* izolatlarının DON toksin üretim

miktarı arasında önemli korelasyonlar gözlenmiştir. Bu patojenlere karşı dayanıklı buğday çeşitlerinde, duyarlı çeşitlere göre ya hastalık semptomu gözlenmemiş ya da çok az semptom gözlenmiştir. Dayanıklı çeşitlerde ise DON toksin üretiminin az olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak dayanıklı çeşitlerde DON toksininin detokside edildiği ve DON toksin üretim mekanizmasının inaktive edildiği düşünülmüştür.

2.3. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na Karşı Mücadele Yöntemleri ve Dayanıklılık

Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı kimyasal, kültürel ve genetik mücadele yöntemleri bilinmektedir.

Bu hastalığa karşı fungusitler kullanılarak kimyasal mücadele etmek oldukça zor olmakta ve özellikle yağışlı ekim alanlarında ekonomik olmamaktadır. Bir çok ülkede bu hastalığa karşı uygun dayanıklı buğday çeşitleri bulunmaması nedeniyle üreticiler zorunlu olarak fungusit uygulaması yapmak zorunda kalmaktadırlar. Özellikle üretim seviyesini sabit tutmak için kısa süreli koruma yöntemi alternatif yöntem olarak görülmektedir. Piyasada Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'nı kontrol altına almak için kullanılan kimyasalları daha uygun duruma getirmek amacıyla kimyasal mücadele yönteminin kontrollü bir şekilde uygun duruma getirilmesi için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda thiabendazole ve carbendazim uygulanan tohumlardan oluşan bitkilerde hastalığın daha az etkili olduğu ve propiconazole ve prochloraz'ın tanelere birlikte uygulanması durumunda çok daha etkin sonuçlar alındığı gözlemlenmiştir (Netto ve Giordani, 1989, Doohan ve ark.,1999; Felix D'Mello ve ark., 1998).

Kimyasal kullanılarak Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı her zaman etkin bir koruma sağlamak mümkün olmadığı gibi, uygulanmasında da güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu nedenle hastalığa karşı dayanıklı çeşit yetiştiriciliğinin yapılmasının yanı sıra, kültürel önlemler ve sağlıklı bitki yetiştirmek alternatif yöntemler olarak öngörülmektedir. Bunların içerisinde bitki artıklarının tarladan

uzaklaştırılması, ekim nöbeti uygulaması, yabancı otlarla mücadele ve sertifikalı tohum kullanımı yer almaktadır (Teich ve Nelson, 1984; Reis, 1989).

Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı fungusitler kullanarak mücadele etmek buğdayda başaklanma ve çiçeklenmenin aynı dönemde olmamasından dolayı zor ve çok pratik olmamaktadır. Bu nedenle hastalığa karşı dayanıklı çeşit yetiştiriciliğinin yapılması tek çözüm yolu olarak görülmektedir. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı bazı dayanıklı çeşitler belirlenmesine rağmen bugüne kadar belirlenen bu genlerin diğer bitkilere aktarılması mümkün olamamıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı 3 tip dayanıklılığın varlığı belirlenmiştir (Wilcoxson ve ark., 1992).

1.tip (Penetrasyon dayanıklılığı): Bitki ilk enfeksiyona karşı dayanıklıdır. Patojen konukçu dokuyu penetre edemez.

2.tip (Saldırı dayanıklılığı) Patojen konukçu bitkiyi penetre eder, fakat etmenin hifleri komşu hücrelere giriş yapamaz ve hastalık bitkide yayılma gösteremez.

3.tip (Biyokimyasal dayanıklılık). Bazı genotipler funguslar tarafından üretilen toksinleri parçalama yeteneğine sahiptirler. Ayrıca çoğu dayanıklı genotipler yüksek konsantrasyonlardaki fungal toksinleri tolere edebilirler.

Tarla ve yarı kontrollü sera koşullarında *Fusarium* türleri enfeksiyonuna karşı genetik araştırmalar yapılmıştır. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklılık kalıtsal olup bazı genler tarafından kontrol edildiği ve bu dayanıklılığın nesilden nesile taşınmasının polygenik olduğu bildirilmiştir (Wilcoxson, 1992). Araştırmacılardan bazıları Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın bazı minör genler tarafından kontrol edilmekte olduğunu ve major etkili genlerin varlığı için bunun olmasının gerekliliğini belirtmişlerdir. Bazı araştırmacılar ise birkaç genin Başak Yanıklılığı Hastalığı'na karşı dayanıklılığı kontrol ettiğini, diğer genlerin ise bunu muhafaza ettiğini işaret etmişlerdir (Snidjers, 1990a; Cai ve ark., 2003). Çin ve Japon araştırmacılar dayanıklılıkta 3 majör ve bazı modifiye olmuş minör genlerin var olduğunu göstermişlerdir (Snidjers, 1990a; Snidjers, 1990 b; Cai ve ark., 2003). Buğdayda *Fusarium* spp.'ye karşı dayanıklılıkta etkili minör genler bilinmesine rağmen dayanıklı bitkiler elde etmek oldukça zor olmaktadır.

Buerstmayr ve ark. (2002), buğday bitkisinin Buğday Başak Yanıklığı'na dayanıklı genle bağlantılı olan DNA markırı tespit etmek için çalışmalar yapmışlardır. Hastalığa dayanıklı olan CM-82036 buğday çeşidi ile hastalığa duyarlı olan Remus buğday çeşidinden elde edilen F₁ nesilleri 2. tip dayanıklılık için araştırılmıştır. Markır analizi için AFLP ve SSR analiz yöntemleri uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı genin bulunduğu bölge belirlenmiştir. 2. Tip dayanıklılık 3B kromozomu üzerinde tespit edilmiştir. Diğer QTL bölgesi ise 5A ve 1B kromozomları üzerinde saptanmıştır. 5A ve 3B'deki QTL bölgesi SSR markırlarla işaretlenmiştir. 1B kromozomunun QTL glutenin locusu ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, buğdayda Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklılık, sayısı bilinmeyen minör genlerle birlikte çalışan az sayıdaki major QTLs ile kontrol altına alındığı ortaya konulmuştur. Buğdayda Başak Yanıklığı'na karşı dayanıklı geni içeren major QTL bölgesinin belirlenmesi hastalığa karşı dayanıklı bitki elde edilme olanağını hızlandırılacağı ileri sürülmüştür.

Cai ve ark. (2003), hastalığa dayanıklı ve duyarlı çeşitlerin melezlenmesi üzerine yapmış oldukları araştırmada bazı kültürlerin Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklılığının aktarılan genler tarafından oluşturulduğunu gözlemlerken, bazılarında ise ilave edilmeyen unsurların dayanıklılıkta daha önemli rol oynadığını belirlemişlerdir. Yapılan araştırmalar ve melezlemeler sonucunda dayanıklılığın nesilden nesile aktarımının %28-86 oranında olduğu tespit edilmiştir. Monozamik analizlerle 8 buğday çeşidinde yapılan araştırmada farklı kromozomlar üzerinde Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı genler belirlenmiştir. Her buğday çeşidinde 9 kromozomdan ikisi üzerinde Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklı genlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan monozamik analizler, orta dayanıklı buğday çeşitleri arasında yapılan karşılaştırmalar duyarlı genlerin dayanıklı genlere göre daha az olduğunu göstermiştir. F₂ bitkilerinde Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklılığın nedeni monozamik analizlere dayandırılmıştır. Adı geçen hastalığa karşı dayanıklılığın nicel olduğu ve tek bir bitkide dayanıklılığın değişiminin her zaman tekrarlanmayabileceği belirlenmiştir. Buna ek olarak F₂ bitkilerde heterozigotluğun Başak Yanıklılığı Hastalığı'na karşı

dayanıklılığın değişiminde nasıl bir rol üstlendiği tam olarak belirlenememiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı 2.tip dayanıklılığın var olduğu ortaya konulmuştur. Dayanıklılıkta çok az sayıda major genin aktif rol oynadığı, söz konusu hastalığa karşı dayanıklı olduğu tespit edilen Sumai 3 buğday çeşidinde bir major gen ve birkaç tane minör genin varlığı kanıtlanmıştır (Ireta ve Gilchrist, 1994). *Fusarium* Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklılık ile ilgili araştırmalarda *in vitro* seleksiyon sonucunda buğdayda *Fusarium* tarafından oluşturulan toksinlere karşı dayanıklı (trichothecene) genlerin varlığı belirlenmiştir. Bu genler; ABC transporter proteinleri, (acting as drug efflux pump), glutathion S transferaz (trithocene toksinlerini inaktif eder) ve MRP homologları (glutathionun birleşmesinin vakuoller olarak engellenmesi ve toksini inaktif etme rolü), (MRP homologları glutathionun konjugantların vakuoller içerisinde transferini sağlayan) ve RPL 3 (ribosomal protein R3, trithoceneslerin ribosomal hedefi) genleridir. Buna ilaveten PR proteinleri ve özellikle de antifungal proteinlerin rolleri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Bu proteinlerin fungusların gelişmesini direk olarak engellemediği, fakat *Fusarium* türlerinin DON toksinini üretmesini engellediği belirlenmiştir.

2.4. *In vitro* Seleksiyon ile İlgili Çalışmalar

F. graminearum ve *F. culmorum* ve diğer *Fusarium* türlerinin üretmiş oldukları DON toksini *in vitro*'da *Fusarium* spp.'ye dayanıklı veya tolerant hatların elde edilmesinde kullanılmıştır. Yapılan araştırmalar ortam içerisinde sadece DON toksinin bulunması, UV ışığı altında absorbe edilmeyen diğer toksinlerin yok olduğu anlamına gelmemektedir. *Fusarium* türlerinin 100'den fazla toksin ürettiği ve bunlardan bir çoğununun selektif ajan olarak DON toksininden daha iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır. Fadel ve Wenzel (1993), *Fusarium* toksinleri üzerine yaptıkları araştırmalarda DON toksini dışındaki toksinleri selektif ajan olarak kullanmışlardır. Liu ve ark. (1991), ise buğday da *in vitro* seleksiyon çalışmasında DON toksini kullanarak *Fusarium* spp.'ye karşı dayanıklı yada tolerant bitkiler elde etme başarısını gösterememiştir. *In vitro* seleksiyon üzerine yapılan araştırmalarda *Fusarium* kültür

filtratı kullanarak *in vitro* seleksiyon yapmanın kolay olduğu, ancak bitki regenerasyonun azlığının bu yöntemin olumsuz yönü olarak görülmüştür. Bununla beraber dayanıklılıkta rol oynayan minör genlerin belirlendiği genotiplerin üretiminde kullanımı mümkün olabilmektedir. Anter veya mikrospor kültürünün kullanımı ile homozigot, rekombinant ve resesif genlerin bulunabilmesi *F. graminearum*'a dayanıklı bitkilerin elde edilmesi yeni bir görüşün ortaya atılmasına neden olmuştur. Toksinler kullanılarak regenere edilen R₃ bitkilerinden bazılarının *F. graminearum*'a karşı daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Wenzel ve Froughi-Wehr, 1990).

Chawla ve Wenzel (1987), Dissa ve W192 arpa çeşitlerinden elde ettikleri embriyogenik kallusları bir Fusarium toksini olan fusarik asiti *in vitro* seleksiyonda kullanarak Fusarium'a dayanıklı bitkiler elde etme olanaklarını araştırmışlardır. Olgunlaşmamış arpa embriyolarından (7-10 günlük) elde edilen Dissa çeşidinden 100 kallus, W192 çeşidinden 50 kallus 0,8mM fusarik asit içeren kallus ortamı üzerinde 4 kez altkültüre alınmış ve ilk seleksiyon sonucunda kallusların %80'ninin öldüğü, 4. kez alt kültüre alınan kallusların % 8-11'i fusarik asite karşı dayanıklılık göstererek canlı kaldığı, bunlardan da bitki regenerasyonunun gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Toksin içermeyen ortam üzerinde kültüre alınan dayanıklı kalluslar 3 ay boyunca alt kültüre alındıkları halde dayanıklılıklarını koruduklarını saptamışlardır. Canlı kalan kalluslardan elde edilen bitkilerin yapraklarına uygulanan 0,8 mM fusarik asite karşı %75 oranında dayanıklılık gösterdikleri belirlenmiştir.

Kasem ve ark., (1991) çift tabaka tekniği kültürü kullanılarak yazlık ve kışlık buğday çeşitlerinden elde edilen kalluslardan Fusarium'a dayanıklı bitkiler elde etmişlerdir. *F. graminearum* ve *F. culmorum* PDA ortamına inokule edildikten bir hafta sonra fungal hücreler otoklav edilerek öldürülmüş ve termostabil toksin içeren bu ortam üzerine MS kallus ortamı ilave edilmiştir. Daha sonra kalluslar bu ortam üzerinde 4-5 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Canlı kalan kallus hücreleri regenerasyon ortamları üzerine aktararak kültüre alınmıştır. Buğday çeşitlerinin 4'ünden regenere edilen R₁ bitkilerinden sera koşullarında elde edilen R₂ bitkileri Fusarium'a dayanıklılık açısından test edilmiş ve R₂ bitkilerinin %3'ünün orjinal hatta (kontrol bitki) göre hastalığa daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir.

Lijuan ve ark. (1991), *F. graminearum* kültür filtratı ve mutagen kullanarak Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklı buğday kallusları elde etme olanaklarını araştırmışlardır. Araştırmada bazı kalluslar 0, 1, 2.5 g/L *F. graminearum* kültür filtratı ortam içerisine ilave edilerek buğday kalluslarının gelişimi gözlenmiştir. Bazı kalluslar ise önce 1500 rad ⁶⁰Co γ-ray uygulandıktan sonra 2 g/L kültür filtratı içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Alınan sonuçlara göre sadece kültür filtratı içeren ortam üzerinde geliştirilen ve mutajen uygulanmamış kalluslarda farklılaşma oranı %5.71 olurken mutasyona uğramış kalluslarda farklılaşma oranının ise %12 olduğu tespit edilmiştir.

Maier ve Oettler (1992), *Fusarium* türlerinin patojenite ve virülensliğinde önemli rol oynayan DON toksinini *in vitro* seleksiyon metodu geliştirerek Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı tritikale bitkileri elde etmeye çalışmışlardır. Hastalığa karşı dayanıklı olduğu bilinen 4 tritikale ve Frontana buğday çeşitlerinden elde edilen embriyogenik kalluslar farklı konsantrasyonlarda (35, 70, 140, 280, 560 µM) DON toksini içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır. DON toksininin kalluslara olan etkisini araştırmak amacıyla, kalluslardaki artış, imaj analizi ve toksin uygulamasından sonra regenerasyon oranı gibi 3 metod kullanılmıştır. Genel olarak DON toksini konsantrasyonunun artışına bağlı olarak tritikale ve buğday kalluslarının canlılığında azalma gözlenmiştir. DON toksini konsantrasyonunun 195 µM üzerinde olduğu durumlarda buğday kallusları canlılığını kaybetmişlerdir. 17 µM üzerindeki DON konsantrasyonunun *Fusarium spp*'ye dayanıklı bitki elde etmek için kullanımın uygun olduğunu belirtmiştir. Tritikale tarla koşullarında Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı olmasına rağmen, yüksek DON konsantrasyonu uygulamasında kallusların gelişimi engellenmiştir. Tritikale çeşitleri Frontana buğday çeşidine göre daha fazla başak yanıklığı hastalığına karşı dayanıklılık göstermiştir. İmaj analizinin bitki seviyesinde patojene dayanıklılık ve toksine toleranslık arasında en iyi uyumu gösterebileceği ortaya konulmuştur.

Van Asch ve ark. (1992), *F. moniliforme*'nin üretmiş olduğu Fumosinin B1 (FB1) toksininin mısırdan elde edilen kalluslara karşı fitotoksitesini belirlemek ve daha önceden adı geçen kalluslara karşı toksik olduğu bilinen moniliformin ve T-2 toksini ile karşılaştırmak için araştırmalar yapmışlardır. Bunun için kalluslar 0, 0.1, 1,

10 mg/L toksin içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. FB1 toksini içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan kallusların gelişiminin azaldığı ve 1 mg/L ve daha fazla toksin konsantrasyonu içeren ortam üzerinde kallusların hiç gelişmediği tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda kallusların gelişiminin %50'den fazlasını engelleyen toksin konsantrasyonlarının FB1 için; 13 µM, moniliformin için; 102 µM, T-2 için ise 215 µM olduğu belirlenmiştir.

Bruins ve ark. (1993), 4 farklı buğday çeşidinin yaprak, koleoptil segmentleri ve anterlerinden elde edilen kalluslar ve embriyoları farklı konsantrasyonlarda deoxynivalenol (DON) ve 3-acetyldeoxynivalenol (3-DON) toksini içeren ortamlar üzerinde kültüre almışlardır. DON toksininin bütün buğday çeşitlerinden elde edilen eksplantların gelişimini engellediği tespit edilmiştir. Tarla koşullarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı ve duyarlı olduğu tespit edilen çeşitlere ait tohumların laboratuvar koşullarında $4 \cdot 10^{-5}$ M DON toksini içeren ortam üzerinde çimlendirilmesinde çeşitler arasında farklılık gözlenmemiştir. Genel olarak 10^{-5} M DON toksini içeren ortam üzerinde koleoptil segmentlerinin gelişimlerinin azaldığı belirlenmiştir. 10^{-4} M DON toksini içeren ortamların DON toksinine dayanıklı haploid buğday kalluslarının seçimi için uygun bir ortam olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra 40 kallus klonundan elde edilen verilere göre Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı olduğu bilinen donor buğday genotipleri arasında her hangi bir korelasyonun olmadığı belirlenmiştir. Anter kültürü ile elde edilen embriyoların regenerasyonu ise DON toksini içeren ortam üzerinde 100 kat azalmıştır. Embriyo ve kallus seleksiyonu ile ilgili araştırmalarda bitki regenerasyonu toksin içeren ortamlarda 20 kat azalmıştır.

Fadel ve Wenzel (1993), Fusarium toksini kullanarak *in vitro* koşullarında buğday çeşitlerinin Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı farklı dayanıklılıklar gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmalarda iki farklı yöntem kullanmışlardır. Anter kültürleri ile elde edilen embriyolar ve kalluslar ilk olarak, toksin içermeyen ortam üzerinde kültüre alınmışlardır. Daha sonra %0.3-0.9 Fusarium toksini içeren ortam üzerinde kültüre alınarak dayanıklı olan hücreler ve embriyolar selekte edilmiştir. Diğer metotta ise anterler ilk olarak farklı konsantrasyonlarda (1.5, 2, 2.5 ml/lt) sıvı patates-2 ortamı içerisinde kültüre alındıktan sonra embriyo ve kallus gelişimini teşvik

eden ortam üzerine aktarılmıştır. Araştırma sonucunda konsantrasyona bağlı olarak *Fusarium* toksininin kallus ve embriyo oluşumunu %10 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Hastalığa duyarlı buğday çeşitlerinin mikrosporlarının daha az duyarlı buğday çeşitlerinin mikrosporlarına göre daha düşük toksin konsantrasyonlarında öldüğü belirlenmiştir. Toksin içeren ortam üzerinde 242.000 anterden gelişen embriyo ve kallusdan 275 bitki elde edilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda *Fusarium* toksini uygulanarak *in vitro* koşullarında *Fusarium* toksinine dayanıklı bitki elde edilebileceği belirlenmiştir.

Kasem ve ark., (1996) dayanıklı, orta dayanıklı ve duyarlı buğday çeşitlerinden elde edilen kalluslara *F. graminearum* ve *F. culmorum*'dan elde edilen kültür filtratları uygulayarak bu hastalığa karşı dayanıklı hatlar belirlemişlerdir. *Fusarium* izolatları CA sıvı ortamında 2-6 hafta süre ile geliştirildikten sonra elde edilen kültür filtratı steril edilerek MS kallus ortamı içerisine %30 oranında ilave edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda en iyi seleksiyon ortamının %30 kültür filtratı içeren MS ortamı olduğu belirlenmiştir. %10 ve %20 kültür filtrat içeren MS ortamları (MST) üzerinde yapılan seleksiyon ise genotiplere bağlı olarak değişim göstermiştir. Dayanıklı kalluslar 2 kez MST ortamı üzerine aktarılmış ve selekte edilen R₀ bitkilerinin selekte edilmeyenlere göre daha az fertil olduğu tespit edilmiştir. Sera koşullarında *Fusarium*' a dayanıklılık bakımından test edilmiş 18 R₁ bitkisinden 2'sinin dayanıklı, bir bitkinin orjinaline göre duyarlı, kalanların ise kontrol bitkilerle aynı reaksiyonu gösterdiği belirlenmiştir. Buğday çeşitlerinin 3'ünden elde edilen R₃ bitkilerinin %36 oranında dayanıklı %64 oranında ise orjinal hatla aynı reaksiyonu gösterdiği belirlenmiştir. Alınan sonuçlara göre hastalığa dayanıklılığın stabil olmadığı *in vitro* seleksiyonla *Fusarium* türlerine karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesinde dayanıklılığın genotipe bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Badea ve ark. (1997), Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan *F. graminearum*'dan elde edilen kültür filtratı kullanılarak buğday kalluslarından dayanıklı bitki elde etmek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Çalışmada, embriyogenik buğday kallusları %10, %20 ve %40 oranında kültür filtratı ilave edilmiş kallus ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. Ortam üzerinde gelişen kalluslardan bitki regeneasyonu teşvik edilmiştir. Alınan sonuçlara göre; kalluslardan

bitki regenerasyonunu buğday çeşidi ve kültür filtratı konsantrasyonun etkilediği kalluslardan %10 ve %20 kültür filtratı içeren ortamlar üzerinde embriyogenik kalluslarda gelişme gözlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda uygulanan kültür filtratı nedeniyle buğday kalluslarında chitinaz enziminin artmasıyla embriyogenik kallus oluşumunda pozitif bir etkinin olduğu belirlenmiştir. %40 kültür filtratı konsantrasyonu içeren ortam üzerinde buğday kallus gelişimi ise çok az olmuş ve büyük oranda kalluslarda ölümler gözlenmiştir.

Goral ve Arseniuk (1997), buğday *Fusarium* Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı somaklonal varyasyonla dayanıklı bitki elde etmeyi amaçlamışlardır. Çalışmada somaklonal varyasyonla elde edilen, dayanıklı ve hastalığa tolerans hatlarla, hastalığa dayanıklı ve tolerans tritikale çeşitleri karşılaştırılmıştır. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklılık ve toleranslıkta farklılıklar, farklı hatlardan elde edilen somaklonal varyantlar, aynı hatlardan elde edilen somaklonal varyantlar arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Tarla koşullarında 458 somaklonal R₁, R₂, R₃ generasyonları ile 19 dayanıklı tritikale genotipleri test edilmiştir. Çalışmada, *F. culmorum*'un 10 izolatu kullanılmıştır. Somaklonal hatlar olgunlaşmamış tritikale embriyolarından elde edilmiştir. Araştırma sonucunda somaklonal varyasyon sonucu elde edilen tritikale hatlarının, donör bitkiler gibi dayanıklı olduğu belirlenmiştir. *In vitro*'da somaklonal varyasyonla *Fusarium* Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklı hatlar elde edilebileceği ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra somaklonal hatlar ile donör genotipler arasında sıkı bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir.

Yang ve ark. (1998), Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na ve deoxynivalenol (DON) toksinine tolerans bitkiler elde etmek amacıyla *in vitro* seleksiyon tekniği kullanmayı ve geliştirmeyi amaçlamışlardır. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı Sumai 3 ve bu hastalığa duyarlı olan Mianyang 11 buğday çeşitlerinin ve bunların hibritlerinin olgunlaşmamış embriyoları 2-4 D+0.6X10⁻⁴M DON toksini içeren ortam üzerinde kültüre alınarak kallus oluşumu teşvik edilmiştir. Sonuçta 0.6X10⁻⁴M DON toksini içeren ortam üzerinde dayanıklı ve duyarlı buğday çeşitlerinden kallus teşvikinin farklılıklar gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Sumai 3 buğday çeşidinde kallus teşviki Mianyang 11 buğday çeşidine göre oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde DON toksini içeren ortam üzerinde gelişen DON

toksinine tolerant kalluslardan bitki regenerasyonu Sumaii 3 ve Mianyang 11 buğday çeşidinde farklılık gözlenmiştir. Her iki buğday çeşidinden ve bunların hibritlerinde elde edilen DON toksinine toleranlı kalluslarda bitki regeneasyonu normal kalluslardan elde edilen kallusların bitki regenerasyon kabiliyetinden 3 kat daha az olduğu tespit edilmiştir. Yapılan testler sonucunda DON toksinine dayanıklı kalluslardan elde edilen bitkilerden bazılarının *F.graminarum*'a karşı dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Araştırmalar sonucunda somaklonal hatlar Sumaii 3 çeşidine göre sözkonusu hastalığa daha dayanıklı olduğu ve daha fazla ürün verdiği belirlenmiştir.

Hidalgo ve ark. (1999), *F. subglutinans*'dan elde edilen kültür filtratının değişik konsantrasyonlarının ananas kalluslarından bitki regenerasyonuna olan etkisini araştırmışlardır. Denemede dayanıklı çeşit olarak Perolera ve Spring, duyarlı çeşit olarak da Perola ve Smooth Cayenne çeşitleri kullanılmıştır. Ananas bitkilerinin kallusları farklı konsantrasyonlarda (%4, %8, %12, %16, %20) *F. subglutinans*'ın kültür filtratını içeren ortamlar üzerinde kültüre alınmışlardır. Kültür filtratı içeren ortam üzerinde duyarlı olan ananas çeşitlerinin kalluslarından bitki regenerasyonu azalmış, fakat dayanıklı bitki çeşitlerinden elde edilen kalluslarla elde edilen bitkilerin hastalığa dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Sonuçta, *F.subglutinans*'ın kültür filtratı kullanılarak *in vitro* seleksiyon yöntemi ile patojene karşı dayanıklı bitkiler elde edilebileceği belirlenmiştir.

Curir ve ark. (2000), zambak bitkilerinde hastalığa neden olan *F. oxyporium lini*'nin üretmiş olduğu fusarik asitin bitkiler üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada hastalığa karşı dayanıklı ve duyarlı olan 2 zambak çeşidi kullanılmıştır. Deneme sonucunda fusarik asit içeren ortamlar üzerinde bulunan duyarlı zambak bitkilerinde dayanıklı zambak bitki çeşidiyle karşılaştırıldığında bazı kimyasalların biriktiği belirlenmiştir. Duyarlı ve dayanıklı zambak bitki yumrularında polyfenol oksidase aktivitesi 1 mmol/L fusarik asit tarafından engellenmiştir. Daha düşük fusarik asit konsantrasyonunda ise sadece duyarlı zambak bitkisinde polyfenol oksidase enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. 1 mmol/L fusarik asit konsantrasyonunda her iki bitkide peroxidase enzimi sabit oranda bulunurken daha düşük fusarik asit

konsantrasyon uygulamasında ise duyarlı zambak bitkisinde peroxidase enzim aktivitesinde artış tespit edilmiştir.

Chen ve Swart (2002), *Amaranthus hybridus* bitkisinde solgunluğa neden olan hastalık etmeni *Fusarium oxysporum*'a karşı *in vitro* seleksiyonla dayanıklı bitkiler elde etmek amacıyla *F. oxysporum*'dan elde edilen kültür filtratı kullanılarak 5 çeşit *A. hybridus* bitkisini testlemişlerdir. *F. oxysporum*'un kültür filtratı kallus ortamı içerisine ilave edilmiş ve bu ortam üzerinde kallusların gelişimi teşvik edilmiştir. Fitotoksik olan kültür filtratı bir kısım kallusun gelişmesini engellerken bir kısım kallusun da gelişmesini teşvik ettiğini belirlemişlerdir. Patojenin kültür filtratına karşı *A. hybridus* çeşitleri farklı reaksiyonlar göstermişlerdir. Araştırma sonucunda patojenin kültür filtratına karşı *A. hybridus*'un 17 numaralı çeşidinin duyarlı, 20 numaralı çeşidinin ise dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Kültür filtratı içeren ortam üzerinde 20 numaralı çeşidin kallusları diğer çeşitlerin kalluslarına göre oldukça iyi gelişme göstermiştir. Ayrıca *A. hybridus* çeşitlerinin kökleri 6 gün kültür filtratına maruz bırakıldığında 20 numaralı çeşidin kökleri diğer çeşitlerin köklerine göre daha az zarar görmüştür. Bu çalışma sonucunda *A. hibritus*'un genetik yapısında bulunan ve *F. oxysporum* kültür filtratına karşı dayanıklılığın var olduğu ortaya konulmuştur.

2.5. Buğdaydan Embriyogenik Kallusların Elde Edilmesi ve Bitki Regenerasyonu

In vitro seleksiyon yöntemi ile hastalıklara karşı dayanıklı bitkiler elde etmek için yapılan çalışmalarda doku kültürlerinden yararlanmak için uygun kallus ve bitki regenerasyon sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Kalluslardan embriyogenesis ile bitki regenerasyonu tamamıyla buğday çeşidinin genotipine bağlıdır (Fennel ve ark., 1996). Tahıllarda kalluslar, bitki regenerasyonu ve gen transferi için en çok kullanılan eksplanttır (Ozias-Atkins ve Vasil, 1982; He ve Lazeri, 2001). Buğdaygiller familyasına ait değişik türlerde çeşitli bitki dokularından faydalanarak kallus kültürü yapılabilmekte ve bunlardan bitki regene edilebilmektedir. Monokotiledon bitkilerin en önemlisi olan buğdaylardan kallusların elde edilmesinde olgunlaşmamış embriyo (Ivanov ve ark., 1998; Vikrant ve Rashid, 2001), olgunlaşmış embriyo gibi

(Bannikova ve Barabanova, 1990; Özgen ve ark., 2001) bitki dokuları kullanılmaktadır. Olgunlaşmamış embriyolardan bitki regenerasyon kapasitesi çok daha yüksektir. Tahıllarda genetik varyasyonlar oluşturabilmek için alternatif metodlar geliştirilmiştir (Lee, 1989). Bu tekniklerin uygulanmaya başladığı kültür bitkilerden biri de tüm dünya için ekonomik öneme sahip olan buğdaydır. Embriyogenik kallus, hücre süspansiyon kültürü, protoplast ve bitki sisteminin kurulması amacıyla yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Sears ve Deckard (1982), buğdayın olgunlaşmamış embriyolarından embriyogenik kallus oluşumunu ve kallusların regenerasyon kabiliyetlerini araştırmışlardır. Ele alınan 29 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını MS+1 mg/L 2.4-D içeren ortam üzerinde kültüre almışlardır. Elde edilen embriyogenik kalluslar MS+1 mg/L 2.4-D içeren ortam üzerinde kültüre alınarak çoğaltılmıştır. Buğday kallusları MS+0.1 mg/L 2.4-D içeren ortam üzerinde kültüre alınarak bitki regenerasyonu teşvik edilmiştir. Kalluslardan regenere edilen bitkiler bazal MS ortamı üzerinde kültüre alınarak regenerasyon işlemi tamamlanmıştır. Yapılan bu çalışmada 18 buğday genotipi 4 kez altkültüre alındıktan sonra (yaklaşık 90-125 gün) kalluslarda regenerasyon yeteneği belirlenirken, 5 buğday genotipinde ise 240 gün sonra totipotensinin kaybolduğu belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, kallus oluşum ve gelişiminin, kalluslardaki totipotensinin, regenerasyon kabiliyetinin genotipe bağlı olduğu ve uygun genotip kullanıldığında ise olgunlaşmamış embriyolardan stabil bir şekilde embriyogenik kalluslar elde edilebileceği belirlenmiştir.

Bajaj (1984), buğday ve çeltiğin anter ve olgunlaşmamış embriyolarını sıvı azot içerisinde saklayarak eksplantların regenerasyon kabiliyetini araştırmıştır. Sıvı azot içerisinden çıkarılan eksplantlar MS+0.2 mg/L 2.4-D içeren ortam üzerinde kallus gelişimini araştırmak için kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyogenik kalluslar regenerasyon için MS+1 mg/L IAA+ 5 mg/L BAP+ 500 mg/L kasein hidrolizat içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Araştırma sonucunda, polen ve olgunlaşmamış embriyoların sıvı azot içerisinde uzun süre canlılığını koruduğu ve bunlardan da bitkiler elde edilebildiği ortaya konulmuştur.

Kim ve Kim (1989), bir buğday çeşidinin (*T.aestivum* L. Cv. Jang Kwang) olgun embriyolarından oluşturulan kalluslardan hücre süspansiyon kültürleri kurarak

tek hücre kültürleri elde etmiş ve bu hücre kültürlerinde bitki regenerasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca hücrelerin 10 µM 2.4-D içeren MS ortamında kültüre alındıklarında embriyogenik kallus gelişiminin olumlu yönde arttığı saptanmıştır. Embriyogenik kallusların 10 mg/L gümüş nitrat (AgNO₃) içeren hormonsuz MS ortamına transfer edildiklerinde somatik embriyo ve sürgün oluşumunun gerçekleştiği bildirilmiştir.

Bannikova ve Barabanova (1990), *in vitro*'da kültüre alınan kışlık buğdayın olgun embriyolarının histolojik karakterlerini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, kültüre alınan olgun embriyolarda bazı değişikliklerin meydana geldiğini, materyalin kültüre alındıktan 2 gün sonra skutellum bölgesinde mitotik bölünmelerin başladığını, ancak somatik embriyoların oluşmadığını, bunun yanında bazı koleoptillerin ve ikincil köklerin oluştuğunu gözlemişlerdir. Ayrıca olgun embriyolardan elde edilen kallusların bitki regenerasyon yeteneğinin çok düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Redway ve ark. (1990), embriyogenik kallus elde etmek amacıyla 8 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını, yapraklarını ve anterlerini 12 farklı ortam üzerinde kültüre almışlardır. En fazla embriyogenik kallus oluşumu olgunlaşmamış embriyolardan elde edilirken, anterlerden ve buğday yapraklarından elde edilen kallus oranı oldukça düşük olmuştur. Olgunlaşmamış embriyolardan kallus teşviki denenen farklı ortamlardan 11 tanesinde önemli ölçüde embriyogenik buğday kallusları elde edilmiştir. Ortam denemesinde en fazla embriyogenik kallus oluşumu 2 mg/L 2.4-D içeren MS ortamında gözlenmiştir. Bu kallusların 2 MS 2 mg/L 2.4-D ortamında gelişen kalluslar ile arasında bir fark gözlenmemiştir. Ortamlar üzerinde nodular kompakt kirli beyaz ve kompakt beyaz renkte iki tip embriyogenik kallus elde edilmiştir. Kalluslar bitki regenerasyonunu sağlamak amacıyla MS+1 mg/L IAA+1 mg/L zeatin içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Her iki embriyogenik kalluslardan bitki regenerasyonu gözlenmiştir. Bir aylık kalluslar regenerasyon ortamına alındığında yeşil sürgünler elde edilmiştir, fakat anterlerden elde edilen kalluslardan bitki regenerasyonu diğer eksplantlara göre daha az olmuştur. Kalluslar yaklaşık beş ay kadar altkültüre alındıktan sonra regenerasyon kapasitesini kaybettiği gözlenmiştir.

Vasi ve ark. (1990), yapmış oldukları çalışmada buğdayın olgunlaşmamış embriyolarını 2 mg/L 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre aldıktan sonra elde ettikleri embriyogenik kallusların regenerasyonunu sağlamak amacıyla farklı hormon konsantrasyonları ve kombinasyonları içeren (BAP, Kinetin, zeatin, 2.4-D, IAA) MS ortamı üzerinde kültüre almışlardır. En iyi regenerasyon ortamının 1mg/L Zeatin+ 1mg/L IAA içeren MS ortamı olduğunu belirlemişlerdir.

Felföldi ve Purnhauser (1992), 44 buğday ve 3 tritikale çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını 1 mg/L 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alarak kallus teşvikini araştırmışlardır. Genotiplere bağlı olarak kallus oluşumunda belirgin bir fark gözlenmemiştir. Kalluslar daha sonra hormon içermeyen MS ortamı üzerinde kültüre alınarak bitki regenerasyonu sağlanmıştır. Regenerasyon yeteneğini buğdayda %1-90 oranında (ortalama %40) iken tritikale de bu oran %5-84 (ortalama %38) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca buğdayda embriyogenik kallus benzeri kalluslar %0-39 oranında (ortalama %4), tritikalede ise %0-81 oranında (ortalama %32) tespit edilmiştir.

Qiao ve ark. (1992), tozlanmadan 12-14 gün sonra hexapoloid bir buğday çeşidi olan Oderzo'nun olgunlaşmamış embriyolarını MS+ 2 mg/L 2.4-D içeren ortam üzerinde kültüre almışlardır. Bu ortam üzerinde yüksek kapasitede elde edilen kalluslardan hücre süspansiyonu ve protoplast izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen protoplastlar MS+ 1mg/L IAA+0.5 mg/L zeatin içeren ortam üzerinde regenerasyonu teşvik etmek için kültüre alınmıştır. Protoplastlardan 2 ay içerisinde regenere edilen ve köklendirilen bitkilerin doğal koşullara adaptasyonu sağlanmıştır.

Fennel ve ark. (1996), 48 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını 3 farklı ortamda kültüre alınarak embriyogenesis oranını araştırmışlardır. Denemede olgunlaşmamış embriyolar N6+dicamba (E1), MS+ 2.4-D (E3) ve MS+2.4-D+ aminoasitler (E5) içeren ortamlar üzerinde kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyogenik kalluslar bitki regenerasyonu için MS+0.5 mg/L IAA+1 mg/L BAP+40 mg/L tiamin+150 mg/L l-asparagin+%2 sakkaroz içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Buğday genotipine bağlı olarak olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslar %2-94 oranında olmuştur. E5 ortamı üzerinde gelişen 13 buğday çeşidinin, E3 ortamı üzerinde gelişen 3 buğday çeşidinin ve E1 ortamı üzerinde

gelişen 1 buğday çeşidinin kalluslarından bitki regenerasyonu %50 oranında olmuştur. Kallus ortamları üzerinde elde edilen embriyonik kalluslar dört kez alt kültüre alındıktan sonra bitki regenerasyon oranı 41 buğday hattında %85 olurken düşerken yedi hatta ise bu oran %15'dir.

Ivanov ve ark. (1998), 5 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyoları kullanılarak MS+2 mg/L 2,4 dichlorophenoxyacetic asit (2.4-D)+ 20 g/L sakkaroz 8 g/L agar pH 5,8 ortamı üzerinde kültüre alarak embriyogenik kalluslar elde etmişlerdir. Daha sonra embriyogenik kalluslar bitki regenerasyonunu gerçekleştirmek için MS+0.1 mg/IAA+ 0.5 mg BAP+ 20 g/L sakkaroz 8 g/L agar pH 5.8 ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Bitki boyu 5-6 cm'ye ulaştığında köklendirilmek üzere 5 mg/IAA+ 0.1 mg/L Kinetin+ 146 mg/L L-glutamin+20 g/L sakkaroz +8 g/L agar içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Köklenen bitkilerin vernalize edilmek üzere tüpler içerisinde 2-4 °C'de 4-5 hafta muhafaza edilmiştir. R₀ regenerantları daha sonra sera koşullarında normal fizyolojik gelişimini tamamlamıştır. Yapmış oldukları çalışmada R₃ ve R₄ generasyonlarını elde etmişlerdir.

Machii ve ark. (1998), 107 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından embriyogenik kallus oluşumunu ve bitki regenerasyon kabiliyetini araştırmışlardır. Tozlanmadan yaklaşık 14 gün sonra alınan olgunlaşmamış buğday embriyoları embriyogenik kallus teşviki için MS+2 mg/L 2.4-D+0.25 mg/L absisik asit (ABA)+ 500 mg/L L-glutamin+100 mg/L proline+ 100 mg/L casein hydrolysate+ 60 mg/L maltoz+ pH 5,8 ve 2 g/L fitojel içeren ortamlar üzerinde karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyogenik kallusların regenerasyon için MS+0.5 mg BAP+ 30 g/L sakkaroz+ 2 g/L fitojel pH 5,8 olan regenerasyon ortamı kullanılmıştır. Araştırmada ele alınan 107 buğday çeşidinden 83 tanesinde embriyogenik kalluslar elde edilmiş, bunlardan 45 buğday çeşidinde bitki regenerasyonu gözlenmiştir. Sadece 9 genotipte yeşil bitkiler, 25 genotipte sadece albino bitkiler, 11 genotipte ise hem yeşil hem de albino bitkiler elde edilmiştir.. Genellikle embriyogenik kallusların elde edilmesi buğday embriyolarının kalitesine ve canlılığına bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Barro ve ark. (1999), 8 buğday çeşidinin ve 7 arpa çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını ve yapraklarını kullanarak somatik embriyogenesisi ve bitki

regenerasyonunu araştırmışlardır. Buğday yaprakları ve olgunlaşmamış embriyolar 2 mg/L 2.4-D ve 2 mg/L piclorom içeren MS ortamları üzerinde karanlık koşullarda kültüre alarak somatik embriyogenesi teşvik etmişlerdir. Alınan sonuçlara göre piclorom içeren kallus ortamları üzerinde buğday yapraklarından somatik embriyo gelişimi piclorom içermeyen kallus ortamlarına göre iki kat daha fazla olmuştur. Buğday yapraklarından somatik embriyogenesi oluşumu ise (%92), olgunlaşmamış embriyolardan somatik embriyogenesi oluşumundan (%85) daha fazla olmasına rağmen ,bitki regenerasyonu olgunlaşmamış buğday embriyolarından elde edilen kalluslardan (%62) buğday yapraklarına oranla (%18) daha fazla olmuştur.

Benkirane ve ark. (2000), 10 buğday çeşidinin yapraklarından ve buğday koleoptilinden somatik embriyogenesi ve bitki regenerasyonunu araştırmışlardır. Bitki parçalarını farklı 2.4-D konsantrasyonu (2.3-11.3 μ M) içeren MS ortamları üzerinde kültüre almışlardır. Kültüre alma işleminden 4-6 hafta sonra her iki bitki dokusundan da embriyogenik ve embriyogenik olmayan kalluslar elde edilmiştir. En fazla 0.5-1 cm uzunluğundaki bitki yapraklarından 6.8 μ M 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Elde edilen embriyogenik kalluslar bitki regenerasyonu için MS+0.9 μ M 2.4-D+ 0.5 μ M 2iP içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Koleoptil segmentlerinden kallus oluşumunun ve bitki regenerasyon oranının yaprak segmentlerine göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Koleoptilin büyüklüğünün bitki regenerasyonunda önemli olduğu tespit edilmiş ve 1 mm uzunluğundaki koleoptillerden bitki regenerasyonunun 2-4 mm lik doku parçalarına oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kallus oluşumunda 2.4-D konsantrasyonları arasında bir farklılık gözlenmezken, bitki regenerasyonu aşamasında 9 μ M 2,4 D içeren ortamlar daha iyi sonuç vermiştir.

Delparte ve ark. (2001), Odean ve Minaret buğday çeşitlerinin olgun embriyolarından kallus oluşumunu ve bitki regenerasyonunu araştırmışlardır. Buğday çeşitlerinden elde edilen olgun embriyolar 10 μ M 2.4-D içeren kallus ortamları üzerinde kültüre alınarak kallus teşvik edilmiştir. Olgun embriyolar kültüre alındıktan 8 gün sonra %59 oranında kallus elde edilmiş ve en yüksek embriyogenik kallus oluşumu % 47 oranında belirlenmiştir. Embriyogenik kalluslardan bitki regenerasyonu için iki farklı regenerasyon yöntemi kullanılmıştır. Regenerasyon ortamı olarak

MS+0.45 μ M 2.4-D+ 46 μ M zeatin ve ½ MS ortamı kullanılmıştır. Embriyogenik kalluslardan 513 adet bitki elde edilmiştir. Protokole göre her 100 embriyodan 25-30 adet bitki elde edilmiştir.

Gonzales ve ark. (2001), 12 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından kallus oluşumunu ve kallus %'sini araştırmak için, elde ettikleri embriyoları 4 farklı MS ortamı üzerinde kültüre almışlar ve farklı karbon kaynakları ile NaCl içeren bu ortamların her birine 2 mg/L 2.4-D ilave etmişlerdir. Elde edilen kalluslar hem kompakt hemde embriyogenik olduğu gibi bazı kalluslar ise yumuşak ve sulumsu bir görünüşte olmuşlardır. Genotiplere bağlı olarak elde edilen kallus oranı % 54-100 arasında değişmiştir. Kalluslar regenerasyon için MS+2.22 μ M BAP+2.68 μ M NAA+20 g/L sakkaroz içeren ortamlar üzerinde kültüre alınmıştır. Genotiplere ve kallus ortamlarına bağlı olarak kompakt kalluslardan bitki regenerasyonu yumuşak kalluslara göre daha fazla olmuştur. En iyi kompakt kallus gelişimi 30 g/L maltoz ve 30 g/L sakkaroz+ 2 mg/L NaCl içeren ortamlar üzerinde gözlenmiş ve bu ortamlar üzerinde elde edilen kalluslardan en fazla bitki regenerasyonunun gerçekleştiği belirlenmiştir.

He ve Lazzeri (2001), 4 farklı buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarını ve bitki parçalarını kullanarak *in vitro*'da embriyogenesis sıklığını ve bitki regenerasyon yeteneğini araştırmışlardır. Embriyogenesisin teşviki için farklı konsantrasyonlarda piclorom ve 2.4-D denenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, olgunlaşmamış buğday embriyolarında somatik embriyogenesis oluşumunun 2 mg/L 2.4-D ve 2 mg/L piclorom içeren ortamlarda daha fazla olduğu saptanmıştır. Bitki regenerasyonunun olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslardan, yeşil aksamdan elde edilen kalluslara göre çok daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Optimize edilen bu ortam üzerinde olgunlaşmamış embriyolardan bitki regenerasyon oranı %97-100 oranında gözlenirken (2 mg/L piclorom içeren ortam üzerinde) yeşil aksamdan bitki regenerasyonunun ise %45-85 oranında olduğu (4 mg/L piclorom içeren ortam üzerinde) tespit edilmiştir. Bitki regenerasyonu için kültüre alınan embriyogenik kalluslarda 5 mg/L zeatin+0.1 mg/L 2.4-D içeren ortam üzerinde bitki regenerasyon oranında %20-30 arasında bir artış gözlenmiştir.

Özgen ve ark. (2001), 4 farklı kışlık buğday çeşidinin olgun embriyolarını kültüre alarak bunlardaki embriyogenik kallus oluşumunu araştırmışlardır. Olgunlaşmış buğday tanelerinden elde edilen embriyolar, kallus gelişimini teşvik etmek için 8 mg/L 2.4-D içeren sıvı ortam içerisinde karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır. Kültüre alınma işleminden 11 gün sonra gelişen kalluslar bitki regenerasyonu için MS+2 mg/L glycine+20 g sakkaroz+ 7 g/L agar içeren ortamlar üzerinde kültüre alınmıştır. Deneme sonucuna göre, olgun embriyolardan kallus oluşumu %75-100 oranında tespit edilmiş ve her 100 olgun embriyodan 14.1 bitki regenerasyonu gerçekleşmiştir.

Vikrant ve Rashid (2001), DT-46 tritikale çeşidinin olgunlaşmış ve olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen kalluslardan somatik embriyogenesinin teşviki 2.4-D konsantrasyonu içeren (9-25 μ M) MS ortamı ve N6 ortamı üzerinde araştırmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda, olgunlaşmamış tritikale tanelerinden alınan embriyolardan embriyogenik kallus oluşumunun daha iyi olduğu gözlenmiştir. 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan yaprak segmentlerinden kallus teşviki tespit edilememiş, aksine sürgün gelişimi gözlenmiştir. N6 ortamı üzerinde somatik embriyogenesis oluşumunun MS ortamına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. 2.4-D içermeyen MS ortam üzerinde embriyogenik tritikale kalluslarından bitki regenerasyonu gerçekleşmiştir.

Arun ve ark. (2003), tozlanmadan 14 gün sonra buğdayın olgunlaşmamış embriyolarını aseptik koşullarda çıkartarak MS+ 2 mg/L 2.4-D içeren ortamlar üzerinde 16 saat ışık/8 saat karanlık koşullarda kültüre almışlardır. Oluşan kırılğan, embriyogenik kalluslar regenerasyon için daha sonra bazal MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Bitkiler yaklaşık 2 cm boyuna geldikten sonra MS+0.5 mg/L NAA içeren ortam üzerinde köklendirilmeleri sağlanmıştır. R₀ bitkilerinde daha sonra R1-R4 generasyonları elde edilmiştir.

Wu ve ark. (2003), doku kültüründe 45 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından somatik embriyogenesis oluşumunu incelemek için araştırmalar yapmışlardır. Elde edilen aseptik embriyolar N6+9.05X10⁻⁶ mol/L 2.4-D+ 60 g/L sakkaroz içeren ortam üzerinde kültüre alınmıştır. Elde edilen embriyogenik kallusların bir kısmı N6+ 8.88X10⁻⁶ mol/L BAP+1.07X10⁻⁷ mol/L+ 500 mg/L kazein

hidrolizat +30 g/L sakkaroz içeren ortam üzerinde, bir kısmı da $N_6 + 4.52 \times 10^{-6}$ mol/L 2.4-D+ 30 g/L sakkaroz içeren ortam üzerinde bitki regenerasyonu için kültüre alınmıştır. Yeşilimsi, hızlı gelişen kaluslarda organogenesizin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Erken dönemde regenerasyon ortamına alınan kalluslarda bitki regenerasyon oranı daha fazla olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, sürgün sayısı ve sürgün boyunun organogenesisle pozitif bir korelasyonunun olduğu tespit edilmiştir.

Pellegrineschi ve ark. (2004), ekmeklik ve makarnalık buğday çeşitlerinde farklı NaCl ve 2.4-D konsantrasyonu deneyerek kallus teşvikini ve kallusdan bitki regenerasyonunu araştırmışlardır. Yüksek regenerasyon yeteneğine sahip olan MPB-Bobwhite 26 ve Mexicali adlı buğday çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyoları aseptik koşullar altında çıkarılarak 2.5 mg/L 2.4-D +%2 sakkaroz+%0.9 bacto agar içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. Bir ay sonra oluşan kalluslar farklı konsantrasyonlarda NaCl ve 2.4-D içeren sıvı ortam içersinde 20 gün süreyle kültüre alındıktan sonra yeniden 2.5 mg/L 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Bunu takiben 45 gün sonra embriyogenik kalluslar hormon içermeyen MS ortamı üzerine alınarak bitki regenerasyonu gerçekleştirilmiştir. Deneme sonucunda MPB-Bobwhite buğday çeşidinde kallus oluşumu ve bitki regenerasyonunun Mexicali buğday çeşidine göre çok yüksek olduğu gözlenmiştir. MPB-Bobwhite buğday çeşidinde kallus oluşumu ve bitki regenerasyonu 1 mg/L 2.4-D+ 1 mg/L NaCl içeren MS ortamı üzerinde, Mexicali buğday çeşidinde ise 2 mg/L 2.4-D+ 2 mg/L NaCl içeren MS ortamı üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

2.6. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na Neden Olan Fusarium İzolatlarının Moleküler Analizleri

Hastalığa karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesinde patojenin genetik farklılığının ve doğal yapısının bilinmesi çok önemlidir. Fitopatojen funguslarda genetik varyasyon analizinde moleküler markırlar başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bazı fitopatojen fungusların intraspesifik genetik varyasyonların araştırılması için RAPD markırları başarılı bir metod olarak kullanılmaktadır (Williams ve ark., 1990; Welsch ve McClelland, 1990). RAPD analiz yöntemi, buğday hastalıklarına neden

olan *Fusarium* spp'nin genetik farklılıklarını tespit etmek amacıyla bazı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır.

Quellet ve Seifert (1993), Buğdayda Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan *F. graminearum* izolatlarını RAPD-PCR ve PCR amplifikasyon analiz yöntemleriyle karakterize etmişlerdir. RAPD-PCR analizinde 40 oligonükleotid primer ve 17 *F. graminearum* izolatı kullanmışlardır. PCR amplifikasyonu için ise *F. graminearum* izolatlarının klonlanmış spesifik DNA iplikçiklerin diziliminde iki primer seti hazırlanmıştır. Analiz sonucuna göre, RAPD ve PCR primerleri kullanılarak *F. graminearum* izolatları arasındaki akrabalık derecesi ve izolatlar arasındaki genetik farklılıklar tespit edilebilmiştir. *F. graminarum* izolatları için kullanılan RAPD ve PCR primerleri başka *Fusarium* izolatları için reaksiyon vermemiştir.

Schiling ve ark. (1996), *F.graminarum* ve *F. culmorum* izolatlarının genetik varyabilitesini ve populasyon yapısını araştırmak amacıyla RAPD-PCR analizleri yapmışlardır. RAPD-PCR için 20 oligonukleotid primer kullanılmıştır. *F. culmorum* ve *F. graminearum*'da RAPD-PCR'da iplikçikler elde edilmiştir. Çalışma sonucunda RAPD-PCR için enfekteli dokulardan elde edilen 10^{-12} g fungal DNA 'nın yeterli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ITS bölgesi (internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal) evrensel primerlerle çoğaltılmış ve dizilim analizler yapılmıştır. *F. culmorum* ve *F. graminearum*'un ITS diziliminde e spesifik primerlerle yapılan analizde polimorfizm görülmemiştir. Her iki çeşidin ITS-1 ve ITS-2'si *F. avenaceum* ile karşılaştırıldığında özellikle ITS-2'de *F. avenaceum*'un spesifik olarak çoğalması, primerlerin türemesi için yeterli dizilim varyasyonu açığa çıkmıştır. Araştırma sonucunda, fungal populasyon genetiğinin tespiti, *Fusarium*'a dayanıklılığının saptanması, epidemiyolojisi ve teşhislerinde duyarlı PCR yöntemlerinin kullanışlı ve uygun olduğu belirlenmiştir.

Nicholson ve ark. (1998), RAPD-PCR analizi ile *F. culmorum* ve *F. graminearum* izolatları arasındaki karakteristik özellikleri tespit etmeye çalışmışlardır. *F. graminearum* ve *F. culmorum* için yapılan RAPD-PCR analizinde spesifik primerler kullanılmıştır. Spesifik PCR yönteminde *F. culmorum*'un buğday sapını inokulasyon zamanı ve inokulasyonun etkisi baz alınarak, *F.graminarum* için ise buğday tanesinde enfeksiyona neden olan trithocene üreten ve üretmeyen izolatlar

baz alınarak yapılmıştır. Deneme sonuçlarına göre fungal DNA ölçümü yapılan *F. culmorum*'un koloni büyüklüğü, mevsim başında bitkiyi ilk inokule eden izolatlarda daha büyük ve konidi artışıyla koloni oluşumunun arttığı tespit edilmiştir. Tanelerde trithocene üreten *F. graminearum* izolatlarının oluşturmuş oldukları koloni, trithocene üretmeyen izolatlara göre daha fazla ve trithocene üretimi bu izolatlarda virülenslik faktörü olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, spesifik PCR yöntemi ile her iki izolatta da hastalık durumunun karşılaştırılmasının yapılması mümkün olmuştur.

Doohan ve ark. (1998), farklı *Fusarium* izolatları ve *Microdochium nivale* varyetelerinin tespit etmek amacıyla PCR analizleri yapmışlardır. Denemelerde *F. culmorum*, *F.poe*, *F.avenaceum*, *F. graminearum*, *M. nivale* var. *nivale*, var. *majus* için spesifik-spesifik PCR analizleri yöntemi uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre bölgede en fazla *F. culmorum* izolatına rastlanmıştır. Bazı bölgelerde ise *F.poe*, *F.avenaceum*, *M. nivale* var. *majus*, var. *nivale* birçok buğday tanelerinde, çiçeklerinde ve rachis dokularında yoğun olarak tespit edilmiştir. *F.poe* daha çok başağın çiçek kısmında gözlenirken, rachis dokusunda ise *M. nivale* var *majus* ve var. *nivale*'nin yoğun olarak gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bölgede görülen *M.nivale*'nin %36'sını var. *nivale*, %46'sını ise var. *majus* oluşturmuştur.

Doohan ve ark. (1999), *F. culmorum* ve *F.poe*'nin teşhisi için görsel hastalık teşhis yöntemi (VDA) ve PCR analizi yöntemini kullanmışlardır. Ayrıca hastalığın kontrolü için bazı fungusitleri denemişlerdir. VDA ile her iki hastalığında çok iyi bir şekilde teşhis edilebileceği belirlenmiştir. Enfekteli dokulardan PCR analizleri, *F.poe*'nin teşhisinde *F. culmorum*'a göre daha az etkin olmuştur. Sonuçlara göre, demetibes, prochloroz ve tebucanoloze *F. culmorum* ve *F.poe*'yi engellemiştir. Aniline pyrimidine fungusiti olan pyrimethonil ise *F. culmorum*'a karşı etkili bir sonuç vermemiştir.

Carter ve ark., (2000) Nepal'de buğday, çeltik, ve mısırdaki hastalığa neden olan II grup içerisinde yer alan 67 *F. graminearum* izolatlarının morfolojik ve moleküler düzeyde teşhisini yapmışlardır. RAPD-PCR, IGS-RFLP analiz yöntemleri uygulanarak *F. graminearum* izolatları arasındaki varyasyon tespit edilmiştir. RAPD-PCR sonucunda *F. graminearum* izolatları A ve B olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. A grubundaki izolatlar dört farklı PCR polimorfik markır

oluşturmuşlardır, fakat B grubundaki bütün izolatlar tek bir polimorfik markır oluşturmuşlardır. Buğday ve çeltikten elde edilen *F. graminearum* izolatları daha çok A grubu içerisinde yer alırken mısırdan elde edilen *F. graminearum* izolatları hem A hemde B grubu içerisine dahil edilmişlerdir. Sonuç olarak izolatların gruplandırılmasında patojenin izole edildiği yılın etkisi olmasına rağmen, konukçu bitkide izolatların gruplandırılmasında rol oynamış olduğu belirlenmiştir. Hastalık etmeninin coğrafik dağılımının ve uygulamalar patojenin gruplandırılmasında etkin rol oynamadığı sonucuna varılmıştır.

Simson ve ark. (2000), yulaf ve çeltikte hastalığa neden olan *Microdochium nivale* var. *macus* ve *nivale*'nin morfolojik ve moleküler düzeyde teşhisini yapmışlardır. *M. nivale* var. *macus* ve *nivale* buğday ve çeltikte şiddetli enfeksiyona neden olurken *M. nivale* var. *nivale*'nin ise sadece yulaf da çok şiddetli hastalığa neden olduğu saptanmıştır. *M. nivale* var. *nivale* var *macus* her üç konukçuda da daha fazla hastalığa neden olduğu gözlemlenmiştir. Moleküler düzeyde uygulanan spesifik PCR analiz yöntemi ile de benzer sonuçlar alındığı görülmüştür.

Walker (2001), 66 *F. graminearum* izolatını, *in vitro*'da gelişimini, 3 buğday çeşidi kullanarak DON ve Zeralone toksin üretimini ve patojenitelerini araştırmışlardır. Ayrıca izolatlar arasındaki farklılığı ortaya koymak için RAPD-PCR analizi yapmışlardır. Patojenite testi sonuçlarına göre; belirlenen hastalık oluşturma derecesi yüksek olan 5 izolat ve hastalandırma derecesi düşük olan 5 izolat kullanılarak *in vivo*'da yapılan araştırmada DON toksin üretimi bakımından farklılıklar ölçülmüş, fakat hiçbir fark bulunamamıştır. İzolatlardan 10 adedinin DON toksinini ürettiği belirlenmiştir. Testlenen izolatların bitkileri hastalandırma dereceleri %3.4-96.4, *in vivo*'da ürettikleri DON toksin miktarı 0-7176.2 ppm, zeralone toksin üretim miktarı ise 0-354.7 ppm olarak belirlenmiştir. Yapılan PCR analizleri sonucunda *F. graminearum* izolatları arasında genotipik farklılıklar tespit edilmiştir. Sonuç olarak *F. graminearum* izolatları arasında farklılıklar olduğu ve bu izolatların buğday üzerinde çok patojen olabileceği ve yüksek oranda toksin üretebileceği belirlenmiştir.

Carter ve ark. (2002), Amerika, Avrupa ve Nepal'den topladıkları 118 *F. graminearum* izolatları arasındaki genetik farklılıkları araştırmak için SCAR yöntemi

kullanmışlardır. 118 izolatın 42 tanesi RAPD analiz yöntemiyle seçilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, *F. graminearum* izolatları 3 gruba ayrılmış ve Nepal'den getirilen *F. graminearum* izolatları grup A ve B içerisinde; Avrupa ve ABD'den getirilen izolatlar ise grup C içerisinde yer almıştır. Mısır ve buğday bitkileri kullanılarak yapılan patojenite testi sonuçlarına göre C grubundaki izolatların daha patojenik oldukları tespit edilmiştir. İzolatların hepsi trithocene grubu içerisinde yer alan deoxynivalenol (DON) ve nivalenol (NIV) toksinlerini üretebilmişlerdir. A grubu içerisinde yer alan *F. graminearum* izolatları eşit miktarda DON ve/veya NIV toksini, B grubu içerisindeki izolatlar çoğunlukla NIV, C grubu içerisindeki izolatlar ise çoğunlukla DON toksini üretmişlerdir. A grubu içerisinde yer alan ve iki toksinide üretebilen *F. graminearum* izolatları buğday bitkisinde, sadece NIV toksini üreten izolatlar ise daha çok mısır bitkisinde yoğun bir şekilde hastalığa neden olmuşlardır.

Gargouri ve ark. (2003), buğday yaprak saplarından elde edilen *F. culmorum* izolatlarının genetik varyabilitesini ve populasyon yapısını araştırmak amacıyla RAPD-PCR yapmışlardır. Tunus'da yapılan surveyler sonucunda elde edilen 108 *F. culmorum* izolatları için RAPD-PCR analizleri yapılmış ve 14 adet primer kullanılmıştır. Analizde ilk döngü için 94 °C 3 dk, 35°C 1 dk, 72°C 2dk parametreleri, diğer 43 döngü için 94 °C 1 dk, 35°C 1dk, 72°C 1 dk parametreleri ve son olarak 72°C 5 dk uygulaması yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda amplifiye olmuş fragmentlerin varlığı ya da yokluğuna göre 25 RAPD lokasyonunun her birinde pseudo-allelic frekansı tahmin edilmiş ve 92 haplotip tespit edilmiştir. *F. culmorum* izolatları arasında genetik farklılığının 0-0,19 olduğu belirlenmiştir. Genetik mesafe kullanılarak yapılan UPGMA cluster analiz sonucuna göre Tunus'un farklı coğrafik alanlarından toplanan izolatlar arasında bir farklılık belirlenememiştir. Sonuç olarak farklı coğrafik alanlardan toplanan izolatlar arasında bir farklılığın olmadığı ve Tunus'da tek bir çeşit *F. culmorum* izolatının varlığı tespit edilmiştir.

Galio-Meagher (2003), *F. graminearum* izolatlarını gruplandırmak için RAPD-PCR analizleri yapmışlardır. Denemede operon kit seti ve UBC-8 ile UBC-28 primerleri kullanılmıştır. UBC-8 primeri *Fusarium* izolatlarını ayırt etmek için, UBC

28 primeri ise *F. graminearum* izolatlarını ayırt etmek için kullanılmıştır. RAPD analiz sonuçlarına göre iki farklı *F. graminearum* grubu tespit edilmiştir.

Waalwijk ve ark. (2003), Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan *Fusarium* spp.'i belirlemek amacıyla PCR metodunu kullanmışlardır. *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. poe*, *F. proliferatum*, *Microdochium nivale* var *macus*, *M. nivale* var. *nivale* izolatlarını belirlemek amacıyla 7 primer çifti kullanılmıştır. Her primer çifti sadece *Fusarium* spp ile ilişkili bütün PCR fragmentleri farklı moleküler büyüklüğe sahip PCR ürünleri ürettiği belirlenmiştir. PCR bütün primerlerin karışımı olan bir karışım kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada 2000 yılına ait 209 *Fusarium* izolatı ile 2001 yılına ait 145 izolat kullanılmıştır. Multipleks PCR sonucunda her iki yılda da Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na en fazla *F. graminearum*'un neden olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık 1980 ve 1990 yıllarında yapılan bir araştırmada ise Buğday Başak Yanıklık Hastalığı'na neden olan etmenin *F. culmorum* olduğu rapor edilmiştir. Tri-7 ve Tri-13 genlerinden elde edilen primerler deoxynivaleno ve nivalenol toksin üretimi arasındaki farkı ortaya koymak için kullanılmıştır. 2001 yılında elde edilen *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarında NIV üretiminde az da olsa bir artış olduğu gözlenmiştir.

2.7.Buğdayın Moleküler Analizleri ile İlgili Çalışmalar

Bitkiler ile ilgili taksonomik ve filogenetik çalışmalarda morfolojik, sitogenetik analizler yapılmaktadır. Özellikle ıslah çalışmalarında bitkilerin genetik yapısının ve genetik farklılığının bilinmesi çok önemlidir. Moleküler markırlar kullanılarak bitki çeşitleri arasında genetik farklılıkların ortaya konulmasında RAPD analiz yöntemi başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Dhar ve ark., 1997; Cao ve ark., 2000).

Weining ve Langridge (1991), tahıllarda genetik polimorfizimi belirlemek amacıyla PCR analizleri yapmışlardır. Yapılan çalışmada, α -amilaz geni taşıyan primerler kullanılmıştır. Örnekler 45 döngüde 95 °C'de 1,5 dakika, 55 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Örnekler son olarak 72 °C'de 5

dakika inkübe edilmiştir. Araştırmada kullanılan buğday çeşitlerinin genetik haritası çıkartılarak PCR polimorfik ürünler tespit edilmiştir.

Devos ve Gale (1992), buğdayın genetik yapısını sistemini araştırmak amacıyla RAPD-PCR analiz yöntemini kullanmışlardır. Alınan sonuçlara göre polimorfizm homozigot tek kromozomlu rekombinant hatlarda ve selekte edilmiş yabancı genomik DNA'larda tespit edilmiştir. RAPD-PCR'da Mg^{+2} , DNA konsantrasyonu, polimeraz konsantrasyonu ve denaturasyon sıcaklığı sonuçlar üzerine etkili faktörler olarak bulunmuştur. Buğdayda, homolog olmayan dominant RAPD- PCR ürünleri genetik haritalamada sınırlı kalmasına rağmen değişikliğe uğramış tek kromozom veya kromozom segmentleri genotipik analizlerin uygulamasında kullanılabilmektedir.

Bryan ve ark. (1998), hexaploid buğday çeşitlerindeki değişimi tespit etmek amacıyla PCR yöntemi uygulayarak moleküler düzeyde analizler yapmışlardır. Örnekler 43 döngü de 94 °C'de 3 dakika, 35 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Örnekler son olarak 72 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, PCR yöntemi oldukça hızlı ve uygulama olanağı olan bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

Cao ve ark. (1998), kılçıklı ve kılçıksız buğday çeşitleri arasındaki genetik farklılığı araştırmak amacıyla RAPD analiz yöntemini kullanmışlardır. RAPD analiz uygulamasında 69 kılçıklı, 32 kılçıksız buğday çeşidi kullanılmış ve kılçıksız buğday çeşitlerinin germplazmasının kılçıklı buğday çeşitlerine göre daha farklı olduğu belirlenmiştir. Kılçıklı buğdayın dendrogramında 4 buğday çeşidinin hatları kılçıksız buğday çeşidi gibi grup halinde bulunmakta olup diğer kılçıklı buğday çeşidinin hatları ise ayrı şekilde görüntülenmiştir. Benzer sonuç RAPD analizinde de tespit edilmiştir. Bunun nedeninin bu hatların dublike olmasından kaynaklanabileceği tahmin edilmiştir.

Bildanova ve ark. (2002), alloplazmik buğday hatlarını RAPD ve RAMPO (random amplified microsatellite polymorphism) metotlarıyla analiz yapmışlardır. L-16(1) ve L-17(2) hatları 3 geri melezleme ile, L-79(10) hattı arpa-buğday melezinin *Hordeum vulgare* (2n=14) (varyete: Nepolegayushchii)X*Triticum aestivum* (2n=42) (varyete: Saratovskaya 29) dört kez geri melezlemesi ile elde edilmiştir. Bu hatların

euploid olduğu kanıtlanmıştır ($2n=42$). Aneuploid bir hat olan L-9 hattı hibrit *H. geniculatum* All. ($2n=28$)XT. *aestivum* ($2n=42$) (Pyrotrix 28)'in iki kez geri melezlenmesiyle oluşturulmuştur. RAPD analiz sonuçlarına göre L-16(1) ve L-17(1) hatları akraba buğday çeşitlerinin örneklerinde olduğu gibi ilk başta fragmentler oluşturmaktadır fakat daha sonra bu fragmentler kaybolmuş, ancak L-16(1) hattından bu fragment klonlanmıştır. Primer yapıların analizi L-16(1) hatları ile bu hatta akraba olan buğday genotipleri arasında farklılıklar primerlerin bağlandığı yerde alleloplazmik hatların geliştiği esnada oluşan mutasyonla ilişkili olabileceği görülmüştür. RAPD analiz yöntemiyle tespit edilen polimorfizm RAMPO metoduyla daha belirgin bir şekilde tespit edilmiştir.

Sun ve ark. (2003), 35 kışlık buğday çeşidinin genetik farklılıkları ve buğdayda başak yanıklığına neden olan *F. graminearum*'a karşı dayanıklılık seviyesini belirlemek amacıyla RAPD analizi uygulamışlardır. Çalışmada hastalığa karşı dayanıklı ve duyarlı buğday çeşitleri arasındaki farklılığı ortaya koymak için 160 primer kullanılmış ve polimorfik bantlar elde edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre RAPD analizi ile buğday çeşitleri arasında birbirine benzer, farklı buğday hatları ile *Fusarium*'a dayanıklı buğday hatları belirlenmiş ve uygulanan 160 primerden 17 primerin polimorfik bantlar oluşturduğu gözlenmiştir. RAPD analiz sonuçlarına göre buğday çeşitleri arasındaki genetik benzerliğin 0,64-0,69 arasında olduğu belirlenmiştir. UPGMA kullanılarak oluşturulan dendrogram sonucuna göre 35 genotip 2 gruba ayrılmış ve buğday genotiplerinden H19₁₀₀₀, F2₅₀₀ ve B1₂₄₀₀ hatlarının *Fusarium* Başak Yanıklığı'na karşı dayanıklı hatlar olduğu belirlenmiştir.

Khan ve ark. (2005), 1993-2002 yılları arasında Pakistan'da yetiştirilen 20 buğday çeşiti arasındaki genetik farklılığı ve akrabalık derecelerini araştırmak için RAPD analizini kullanmışlardır. RAPD analizinde 42 adet primer kullanılmış ve her çeşit için 184 bant oluştuğu belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına, göre çeşitlerin çoğunun birbirleriyle ilişkili olduğu, çeşitlerden sadece 6'sında genetik farklılığın olduğu tespit edilmiştir. Çeşitler arasında RAPD varyasyonun çok düşük oranda olduğu gözlenmiştir. Buğday çeşitlerinin 20'sinde gözlenen bantların %40,7'sinin polimorfik olduğu görülmüş ve bu polimorfik bantların %26,1' nın çok daha sık görüldüğü gözlenmiştir. Buğday çeşitlerinden elde edilen polimorfik bantlar, Yecora

çeşidi için 0.67; C-250 çeşidi için 0.84 olarak tespit edilmiştir. Yaklaşık RAPD analizindeki %1,4 değişim 69 yıllık buğday ıslah çalışmalarında sabitlenmiş olabilir, fakat bu tespitin istatistiki olarak farklı olmadığı belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOD**3.1. Materyal**

Çalışma 2002-2005 yılları arasında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Çalışmada Adana ili ve çevresinde yetiştirilen, 10 farklı buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidi (Adana 99, Amanos 97, Ceyhan 99, Çukurova 86, Genç 99, Panda, Seyhan 99, Sham 1, Seri 82, Yüreğir 89) araştırma ile ilgili denemelerde, bu çeşitlere ait olgunlaşmamış embriyolardan elde edilen kalluslar *in vitro* seleksiyonda bitki materyali olarak kullanılmıştır. Ayrıca Adana ili ve çevresindeki buğday tarlalarından izole edilen *Fusarium gramineum* ve *Fusarium culmorum*'a ait izolatlar ile bunlara ait toksinler çalışmada biyolojik materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Metod**3.2.1. Hastalıklı Bitki Örneklerin Toplanması, *F. gramineum* ve *F. culmorum* İzolatlarının İzolasyonu**

Çalışmada fungal materyal olarak kullanılan, Buğday Başak Yanıklığı'na neden olan *Fusarium* türlerini izole etmek amacıyla Nisan-Mayıs 2002 döneminde Adana ili ve çevresinde buğday yetiştiriciliği yapılan bölgelerde, hastalıkla bulaşık olduğu düşünülen tarlalardan bitki kök boğazı ve başaktan örnekler alınıp polietilen torbalar içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen bitki materyallerinden laboratuvar koşullarında genel mikolojik yöntemlere göre fungusların izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, hastalıklı olduğu düşünülen buğday bitki doku parçaları %0,05 Tween-20 içeren %1'lik sodyum hipoklorid (NaOCl) solüsyonu içerisinde 1 dakika, buğday taneleri ise yine aynı solüsyon içerisinde 10 dakika tutulmuş ve ardından 3 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra bitki materyalleri steril petri kutuları içerisine yerleştirilmiş steril kurutma kağıtları üzerinde bir süre tutulmak suretiyle kurutularak yüzeysel sterilizasyona tabii

tutulmuştur. Kurutulan taneler ve bitki doku parçaları daha önceden hazırlanıp petri kutularına dökülmüş 100 mg/L streptomisin içeren Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır (Ek 1) Kùltürler daha sonra 26±1 °C sıcaklıktaki inkübatörde karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Ortam üzerinde gelişen *Fusarium* izolatları saflaştırılarak PDA ortamı üzerinde tek spor izolasyonu ile kültüre alınmıştır. Survey çalışması sonucunda farklı alanlardan alınan her tarlaya bir numara, aynı alandan alınan her bir bitki örneğine de ayrı bir numara verilmiştir.

3.2.2.İzole Edilen Fungusların Teşhis Edilmesi

Saf kùltürleri elde edilen funguslardan preperatlar hazırlanarak ışık mikroskobu (Olympus BX51T-32P01) altında incelenmiş, fungusların spor şekilleri, konidiofor yapıları gibi taksonomik özellikleri gözden geçirilmiş Booth (1977); Gerlach ve Nirenberg (1982) ve Nelson ve ark., (1983)'e göre teşhisleri yapılmıştır. Ayrıca izolatların teşhisinde bu konuda çalışmış olan Doç.Dr. Berna Tunalı'nın bilgilerinden de yararlanılmıştır.

3.2.3. Tek Spor İzolasyonu ve Fungusların Muhafazası

Saf kùltürü elde edilen *Fusarium* izolatlarının tek spor kùltürleri Booth (1977) ve Nelson ve ark., (1983) 'e göre yapılmıştır. Bu amaçla steril bir lam üzerine dört damla steril saf su damlatılmıştır. Saf kùltürden öze ile bir parça misel alınarak lam üzerindeki ilk su damlası içerisinde iyice ezilmiştir. Daha sonra öze yardımı ile alınan bir miktar su buradan alınarak ikinci su damlasına batırılarak karıştırılmıştır. Aynı işlem diğer su damlalarında da tekrarlanmıştır. Dördüncü su damlasına batırılan öze daha sonra 5 cm çapındaki petri kutusu içerisinde bulunan %1 su-agar üzerine zikzaklar halinde çizilmiştir. Petriler 26±1 °C sıcaklıktaki iklim odasında karanlık koşullarda 12-24 saat süre ile inkübe edilmiştir.

Bu süre sonunda petriler ışık mikroskobu altında incelenmiş ve tek başına bulunan çimlenmiş sporlar cam kalem ile işaretlenmiştir. Daha sonra bu sporlar steril bir iğne yardımıyla alınmış ve PDA ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Buradan gelişen miseller izolatlarla ait tek spor kültürünü oluşturmuştur.

İzolasyon sonucu elde edilen izolatlar isimlendirilmiş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak amacıyla iki farklı şekilde muhafaza edilmiştir. İlk olarak, izolatlarla ait tek spor kültürleri 15X120 mm boyutlarındaki cam deney tüpleri içerisinde bulunan eğik PDA ortamı üzerine inokule edilerek geliştirilmiş ve +4 °C’de saklanmıştır. İkinci saklama şeklinde ise petri kutularına (9 cm çapında) dökülen PDA ortamı katılaştıktan sonra ortam üzerine yaklaşık 1-1,5 cm² büyüklüğündeki steril filtre kağıtları yerleştirilmiş ve bu petri kutularının merkezine tek spor kültüründen mantar delici ile alınan disk parçaları konulmuştur. Petri kutuları iklim odalarında 25-26 °C’de karanlık koşullarda fungusların yerleştirilen filtre kağıtlarının üzerini tamamen kaplayıncaya kadar inkübe edilmişlerdir. Bu süre sonunda petri kutuları steril bir ortamda açılarak fungus miselleriyle kaplanmış filtre kağıtları bir pens yardımı ile alınıp steril bir petri kutusuna konularak bir süre kurutulmuştur. Bunu takiben filtre kağıt parçaları ependorf tüpleri içerisine konularak üzerleri etiketlenmiş ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.4. *F. graminearum* ve *F. culmorum*’un Farklı Ortam ve Sıcaklıklardaki Koloni Gelişiminin Belirlenmesi

F. graminearum ve *F. culmorum*’un en iyi geliştiği sıcaklık ve ortamı belirlemek amacıyla yapılan arazi çıkışları ile laboratuvara getirilen bitki materyallerinden izole edilen ve *F. graminearum* A-13 ve *F. culmorum* B-4 nolu izolatlarının Patates Dekstrozu Agar (PDA), Malt Ekstrakt Agar (MEA), Czapeck-Dox Agar, Sabouraud Agar ve Sentetik Nutrient Agar (SNA) olmak üzere beş farklı katı ortam üzerinde ve 20, 25, 30 °C olmak üzere üç farklı sıcaklıktaki koloni gelişimleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.1’de içerikleri verilen ortamların her birinden 80 ml hazırlanarak 250 ml’lik erlenler içerisine konulmuş ve 121⁰C’de 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklav edilmiş ve daha sonra 9 cm çaplı petri kutularına yaklaşık 20 ml olacak şekilde dökülmüştür. Daha önce PDA ortamı üzerinde kültüre alınarak geliştirilen funguslardan 0.6 cm çapındaki mantar delici ile diskler alınmış ve bu diskler hazırlanan ortamların merkezine gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Deneme her petri kutusu bir tekerrür olacak şekilde 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Petri kutuları 20, 25 ve 30 ⁰C sıcaklıktaki inkübatörlerde karanlık koşullarda inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun 1., 3., 5. ve 7. günlerinde fungusun koloni çapı ölçülerek kaydedilmiştir. Sonuçlara varyans analizi uygulanmış ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir.

3.2.5. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı’na Neden Olan *F. graminearum* ve *F. culmorum* İzolatlarının Patojenitelerinin Belirlenmesi

3.2.5.1. Konukçu Bitkinin Yetiştirilmesi

F. graminearum ve *F. culmorum*’a ait izolatların patojenitelerinin belirlenmesi için bitki materyali olarak Seri 82 buğday çeşidi kullanılmıştır. Seri 82 buğday çeşidi tohumları her saksıya 5 tohum gelecek şekilde 10X15 cm boyutlarındaki saksılara doldurulmuş metil bromid ile steril edilmiş 1:1:1 kum: toprak: ürgüp taşı karışımına ekilmiştir. Bitkiler 25±1⁰C sıcaklıkta 16 saat aydınlatmalı (10.000 lüx) iklim odasında geliştirilmiştir.

3.2.5.2. *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması

Teşhisi yapılan *F. graminearum* ve *F. culmorum*'a ait izolatlar önce petri kutuları içerisinde bulunan katı PDA ortamı üzerinde $24\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 gün süre ile geliştirilmişlerdir. Bu sürenin sonunda üzerinde fungus gelişmiş olan her bir petri kutusu üzerine 10 ml steril destile su ilave edilerek bir spatula yardımı ile miseller kazınarak fungus spor süspansiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra bu süspansiyon bir tülbentten geçirilmiş ve 2000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Pellet %0,05 Tween-20 içeren Patates Dekstroz (PD) ortamı ile sulandırılarak izolatlara ait spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Spor süspansiyonlarından alınan örneklerde Thoma Camı kullanılarak sayımlar yapılmış ve süspansiyon istenilen spor konsantrasyonuna ayarlanmıştır.

3.2.5.3 Patojenite Testi

F. graminearum' a ait 16 adet ve *F. culmorum*'a ait 10 adet izolatın $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta patojenitelerinin belirlenmesi için Seri 82 buğday bitkisi kullanılmıştır. Her bir izolat için 3.2.5.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan 15 ml spor süspansiyonu (1×10^5 spor/ml) 12 günlük buğday bitkilerinin köklerine dökülerek bitkiler inokule edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan bitkilere ise sadece çeşme suyu uygulanmıştır. Uygulamadan sonra bitkiler su ile nemlendirilmiş polietilen torbalar içerisine konularak ağızları kapatılmış ve $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, $\%70\pm5$ nem, günlük 16 saat aydınlık/8 saat karanlık koşullara ayarlanmış iklim odasında 60-72 saat kapalı bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda torbalar bitkiler üzerinden uzaklaştırılmış ve aynı iklim odasında muhafaza edilmiştir (Carter ve ark., 2002). Deneme her bir bitki bir tekerrür olacak şekilde 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. İnokulasyondan 17 gün sonra hastalık şiddeti ve patojenite değeri Simson ve ark., (2000)'e göre belirlenmiştir. Sonuçlara varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

3.2.5.4. Bazı Buğday Çeşitlerinin *F. graminearum* ve *F. culmorum*'a Karşı Sera ve Saksı Koşullarındaki Reaksiyonlarının Belirlenmesi

3.2.5.3 'de belirtildiği şekilde yapılan patojenite denemesi sonucunda en iyi sonucu veren *F. graminearum*'un A-13 ve *F. culmorum*'un B-4 izolatları sera ve saksı koşullarında yetiştirilmiş buğday bitkilerine uygulanmışlardır. *In vitro* seleksiyonda kullanılan buğday çeşidini belirlemek amacıyla 10 buğday çeşidi (Adana 99, Ceyhan 99, Çukurova 86, Seyhan 95, Panda, Genç 99, Seri 82, Yüreğir 89, Amanos 97, Sham1) ile tarla ve saksı denemeleri kurulmuştur.



Şekil 3.1: Bazı buğday çeşitlerinin Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı reaksiyonlarının testlenmesi için kurulan sera denemesinden genel bir görünüm: Uygulamada kullanılan buğday bitkileri için hazırlanmış parsel alanı



Şekil 3.2: Bazı buğday çeşitlerinin Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı reaksiyonlarının belirlenmesi için sera koşullarında (a) ve torbalarda yetiştirilmiş buğday bitkileri (b)

Denemede kullanılan 10 buğday çeşidinin tohumları Ekim 2002'de 450 tane/m² gelecek şekilde plastik torbalara ve serada toprağa ekilmiştir. Buğday tohumları serada 30cmX60cm boyutlarındaki parsellere ekilmiştir (Şekil 3.1). Plastik torbalarda toprak olarak metil bromid ile steril edilmiş 1:1:1 kum: toprak: ürgüp taşı karışımı kullanılmıştır. Sera ve saksılarda oluşan bu bitkilere normal bakım işlemleri uygulanmış, gerektiğinde sulama, gübreleme ve diğer bakım işlemleri yapılmıştır (Şekil 3.2).

Buğday bitkileri başak oluşturma aşamasında çiçeklenmenin tam olduğu zaman *F. graminearum* A-13 ve *F. culmorum* B-4 izolatlarından hazırlanan spor süspansiyonu 1×10^5 spor/ml olarak ayarlanarak sera ve saksı içerisinde yetiştirilen bitkilerin başaklarına sabahın erken saatinde uygulanmıştır. A-13 ve B-4 izolatlarından hazırlanan spor süspansiyonu bir komprosör yardımıyla bitkinin her tarafı ıslanacak şekilde püskürtülmüştür. Kontrol bitkilere %0.05 Tween-20 içeren su püskürtülmüştür. Başaklar 48 saat nemli plastik torba içerisinde tutulmuştur. Bu sürenin sonunda torbalar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Deneme 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve her bir örnekte 10 tane başak kullanılmıştır (Şekil 3.3). Uygulamadan sonra 10, 14, 18, 22 ve 26 gün sonra bitkilerde hastalık şiddeti saptanmıştır. Bunun için 1-9 skalası kullanılmıştır (Miedaner ve ark., 2001).

1: başaklarda simptom yok, 2: başakların $\leq 5\%$ 'i infekteli, 3: başakların %6-15'infekteli, 4: başakların %16-25'i infekteli, 5: başakların % 26-45'i infekteli, 6: başakların % 46-65'i infekteli, 7: başakların % 66-85'i infekteli, 8: başakların % 86-95'i infekteli, 9: başakların $> 96\%$ 'sı infekteli.

Her saksıdaki infekteli ve infekteli olmayan başaklar alınmış, taneler ayrılmış ve bin tane ağırlıkları ve bin tane ağırlığında azalma oranı hesaplanmıştır. Hasat sonrası elde edilen hastalıklı ve sağlıklı buğday taneleri 4 kez 100'er adet sayılarak hassas terazide tartılmış ve ortalaması 10 ile çarpılarak 1000 tane ağırlığı hesaplanmıştır. Bin tane ağırlığındaki azalma oranı ise;

$$= \frac{(\text{Kontrolde 1000 TA}) - (\text{Hastalık uygulanmış 1000 TA})}{\text{Kontrolde 1000 tane ağırlığı}} \times 1000$$

(TA: tane ağırlığı)

Sonuçlara varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

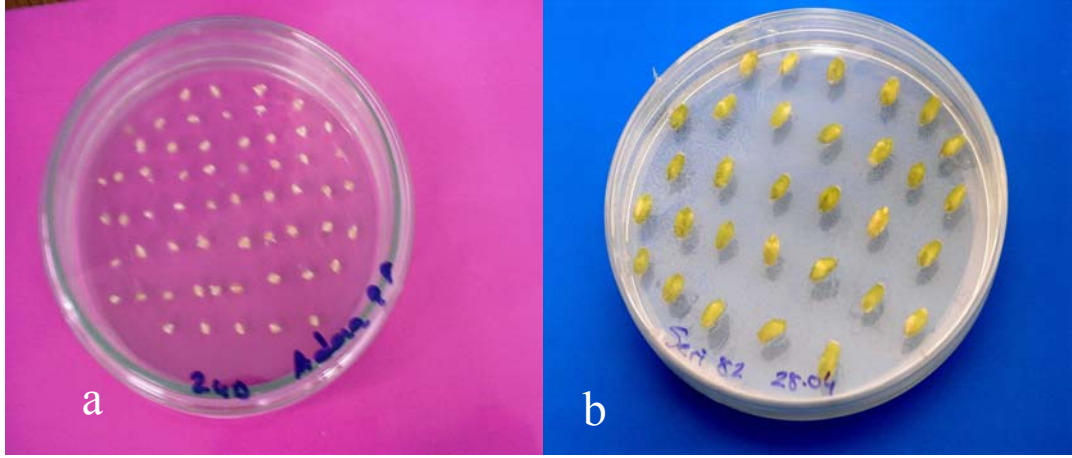
3.2.6. *In vitro* Seleksiyon**3.2.6.1. *In vitro* Seleksiyonda Kullanılan Bitki Materyalinin Elde Edilmesi****3.2.6.1.1.Olgunlaşmamış Buğday Taneleri ve Embriyolarının Kültürü ve Embriyogenik Kallusların Elde edilmesi**

3.2.5.4'de *in vitro* seleksiyonunda kullanılacak buğday çeşitlerini belirlemek amacıyla yapılan sera ve saksı denemelerinde kullanılan buğday çeşitlerinin A-13 ve B-4 *Fusarium* izolatlarına karşı göstermiş oldukları tepkilere göre, Adana 99, Genç 99 ve Seri 82 buğday çeşitleri belirlenmiştir. Tozlanmadan 14, 16 ve 18 gün sonra Adana 99, Genç 99 ve Seri 82 buğday çeşitlerinin başaklarından olgunlaşmamış buğday taneleri alınarak %70'lik alkol içerisinde 1 dakika bekletildikten sonra %0.1'lik Tween-20 (polyoxethylene sorbitan monolaurate), %10'luk ticari sodyum hipoklorid (NaOCl) çözeltisi içerisinde 20 dakika çalkalanmış ve bunu takiben tohumlar 3 kez steril destile su ile yıkanarak yüzeysel sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Bu şekilde steril edilen olgunlaşmamış buğday taneleri steril kabin içerisinde filtre kağıtları üzerinde 15-20 dakika bekletilerek buğday taneleri üzerindeki fazla suyun alınması sağlanmıştır. Kuruyan tanelerin bir kısmının embriyoları steril koşullarda bir pens ve bistüri yardımıyla çıkarılarak her petri kutusuna 30 olgunlaşmamış embriyo olacak şekilde %3 sakkaroz; %0.2 fitojel ve 2 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L Absisik asit+100 mg/L kazein hidrolizat+500 mg/L glutamin içeren pH 5.8 olacak şekilde ayarlanmış katı MS (Murashige ve Skoog, 1962) (Ek 2) ortamı üzerinde karanlık koşullarda 26 ± 1 °C'ye ayarlanmış bir inkübatör içerisinde kültüre alınmıştır (Şekil 3.4 a).



Şekil 3.3: *F. graminearum* A-13 ve *F. culmorum* B-4 izolatları ile inokule edilmiş sera koşullarında (a) ve torbalarda yetiştirilmiş buğday başakları (b).

Denemede kullanılacak buğday çeşitlerinden embriyogenik kallus elde etmek için olgunlaşmamış buğday taneleri her petri kutusuna 30 adet buğday tanesi olmak üzere, tanelerin karın çizgileri ortam yüzeyi ile temas edecek şekilde aynı ortam üzerinde kültüre alınmıştır (Şekil 3.4 b). Kültüre alındıktan 4 hafta sonra olgunlaşmamış buğday taneleri ve olgunlaşmamış embriyoların % kallus oluşurma oranı belirlenmiştir. Olgunlaşmamış buğday embriyolarından % kallus oluşum oranı her petri kutusundaki kallus oluşturan tanelerin petri kutusundaki toplam tane sayısına oranlanıp 100 ile çarpılmasıyla elde edilmiştir. Buğday tane ve embriyoları üzerinde gelişen embriyogenik kalluslar bir pens yardımıyla tanelerden ayrılarak aynı ortamlar üzerinde alt kültüre alınmıştır. Kalluslar karanlık koşullarda 26 ± 1 °C sıcaklıkta dört haftada bir aynı ortamlar üzerinde altkültüre alınarak muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.4: Adana 99 buğday çeşidinden alınan olgunlaşmamış embriyo (a) ve buğday tanelerinin (b) 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındıktan sonraki görünümü.

3.2.6.1.2. Olgunlaşmış Buğday Embriyolarının Kültürü ve Embriyogenik Kallusların Elde Edilmesi

In vitro seleksiyonda kullanılan buğday çeşitlerini belirlemek amacıyla yapılan sera ve saksı denemelerinde A-13 ve B-4 Fusarium izolatlarına karşı göstermiş oldukları tepkilere göre seçilen Adana 99, Genç 99 ve Seri 82 buğday çeşitlerinin olgunlaşmış buğday taneleri %70'lik etil alkolde içerisinde 2 dakika süreyle bekletildikten sonra %0.1'lik Tween-20, %15'lik ticari sodyum hipoklorid (NaOCl) çözeltisi içerisinde 20 dakika çalkalanarak yüzeysel sterilizasyona tabii tutulmuş ve daha sonra 3 kez steril destile su ile yıkanmıştır. Bu şekilde yüzeysel sterilizasyona tabii tutulmuş ve buğday taneleri steril su içerisinde oda sıcaklığında 10 saat süreyle şişirmeye bırakılmıştır. Şişirilmiş taneler, steril kabin içerisinde petri kutuları içerisindeki steril filtre kağıdı üzerinde 15-20 dakika bekletilerek buğday tanelerinin üzerindeki fazla suyun alınması sağlanmıştır. Kuruyan tanelerin embriyoları steril koşullarda bir pens ve bistüri yardımıyla çıkarılarak her petri kutusuna 30 adet olgunlaşmış embriyo olacak şekilde %3 sakkaroz; %0, fitojel ve 2 mg/L 2.4-D+0,1 mg/L Absisik asit+100 mg/L kazein hidrolizat+500 mg/L glutamin

içeren pH 5.8 olarak ayarlanmış katı MS ortamı üzerinde karanlık koşullarda 26 ± 1 °C sıcaklıkta kültüre alınmıştır (Şekil 3.5). Kültüre alındıktan 4 hafta sonra olgunlaşmış buğday tanelerinin embriyolarından % kallus oluşum oranı 3.2.6.1.1.'de anlatıldığı gibi hesaplanarak elde edilmiştir. Buğday embriyoları üzerinde gelişen embriyogenik kalluslar bir pens yardımıyla tanelerden ayrılarak aynı ortamlar üzerinde altkültüre alınmıştır. Kalluslar karanlık koşullarda 26 ± 1 °C sıcaklıkta dört haftada bir aynı ortamlar üzerinde altkültüre alınarak muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.5: Seri 82 buğday çeşidinden alınan olgunlaşmış embriyoların 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alındıktan sonraki görünümü.

3.2.6.1.3. Embriyogenik Buğday Kalluslarından Bitki Regenerasyonu

Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı, somaklonal varyasyondan yararlanarak *in vitro* seleksiyonla buğday kalluslarından dayanıklı hatların seçilmesi için, kalluslardan bitki regenerasyonu için değişik hormonlar içeren ortamlar denenmiştir. Bu amaçla, Genç 99 buğday çeşidinin embriyogenik kallusları bitki regenerasyonu için MS+ 0.1 mg/L indol asetik asit (IAA)+ 1 mg/L Benzil amino purin (BAP)+ 1 mg/L kinetin+ %3 sakkaroz, MS+ 1 mg/L IAA+ 1 mg/L zeatin+%3 sakkaroz ve MS+0.5 mg/L IAA+1 mg/L BAP+ %2 sakkaroz içeren katı ortamlar üzerinde kültüre alınmıştır. Her petri kutusuna yaklaşık 6 kallus parçası konulmuş ve

inkübasyon süresi sonucunda bu kallus parçaları üzerinde oluşan bitkicikler sayılarak bitki regenerasyon oranı Gonzales ve ark.,(2001)'na göre hesaplanmıştır.

Buna göre;

$$= \frac{5X(1-5 K)+10X (6-10 K)+15X(K>10)}{\Sigma KM}$$

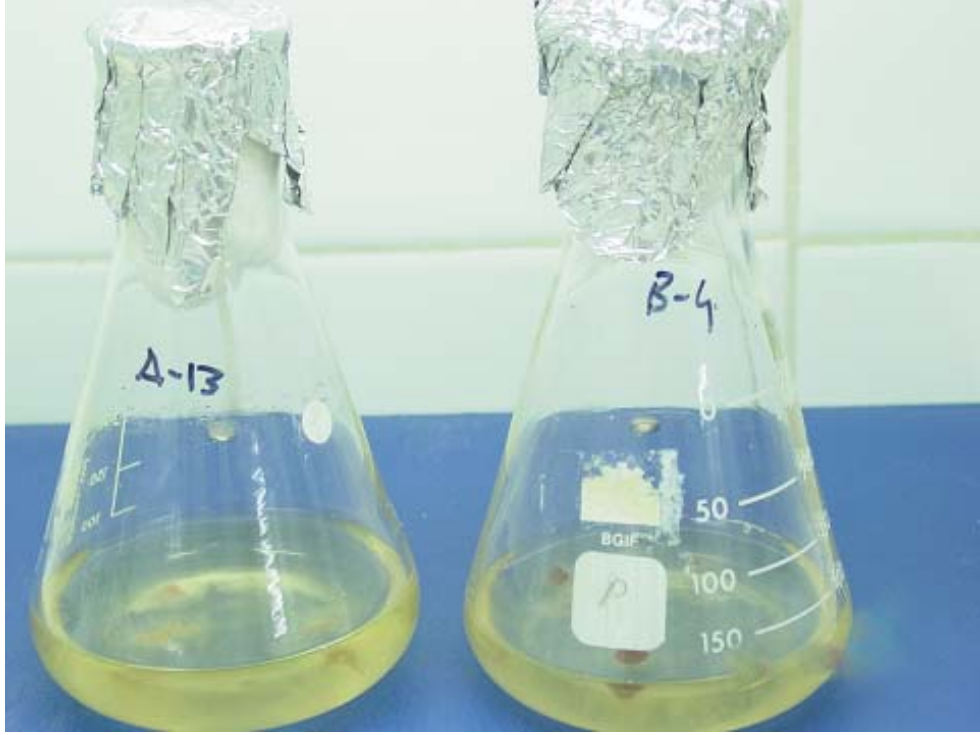
(K: sürgün veren kallus sayısı; KM: Toplam kallus sayısı)

Regenere olan bitkiler daha sonra ½ MS+1mg/L NAA+ %2 sakkaroz içeren ortamlar üzerinde köklendirilmiştir. Kök oluşumunu tamamlayan bitkiler daha sonra toprak:kum:çiftlik gübresi karışımını içeren saksılara aktarılmıştır. Evapotranspirasyonu önlemek için bitkiler polietilen plastik torbalar ile kapatılarak altında 7-10 gün süre ile 22±2 °C'de bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda torbalar açılarak bitkinin doğal koşullara adaptasyonu sağlanmıştır.

3.2.6.2. *F. graminarum* ve *F. culmorum* Kültür Filtratlarının Elde Edilmesi ve Fusarik Asitin Hazırlanması

3.2.1., 3.2.2 ve. 3.2.5.3' de belirtildiği şekilde izole edilen ve patojenite testi denemelerinde en iyi sonucu veren *F. graminearum*'un A-13 ve *F. culmorum*'un B-4 nolu izolatlarından kültür filtratı elde edilmiştir. Bunun için erlenmayerler (250 ml) içerisinde 75 ml sıvı PDA ortamı hazırlanmış, 121 C⁰'de 1.2 atm basınç altında 20 dakika otoklav edilip oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra Fusarium izolatlarının petri kutuları içerisindeki kültürlerinden 3 adet 8 mm çapında fungus diskleri ile inokule edilmiştir (Şekil 3.6). Erlenmayerler karanlık koşullarda 25±1 C⁰ sıcaklıktaki inkübatör içerisinde 21 gün süre ile inkübe edilmiştir. Bu şekilde elde edilen fungus süspansiyonu bir tülbentten geçirilmiş ve daha sonrada fungus misel ve sporlarını uzaklaştırmak için kağıt filtreden (Whatmann 3MM) geçirilmiştir. Elde edilen kültür filtratı pH 5.8' e ayarlandıktan sonra steril koşullarda milipor filtreden geçirilerek (0.22 µM) soğuk sterilizasyona tabii tutulmuş ve +4 C⁰'de saklanmıştır (Badea ve ark., 1997). Bu şekilde elde edilen kültür filtratı *in vitro* seleksiyonda kullanılmıştır.

Fusarik asit (Sigma) ise methanol içerisinde çözüldükten sonra üzerine saf su ilave edilerek 0.22 µM por genişliğine sahip filtreden geçirilerek soğuk sterilizasyona tabii tutulmuş ve kullanılıncaya kadar +4 C⁰'de saklanmıştır.



Şekil 3.6: *F. culmorum* (B-4) ve *F. graminearum*'dan (A-13) kültür filtratı elde etmek için hazırlanan fungal sıvı kültür

3.2.6.2.1. *In vitro* Seleksiyonda Kullanılan Kültür Filtratı Konsantrasyonunun Saptanması

F. graminearum A-13 ile *F. culmorum* B-4 izolatlarından elde edilen ve *in vitro* seleksiyonda kullanılan kültür filtratı konsantrasyonunun saptanmasında bitki materyali olarak 10-15 günlük domates fideleri (*Lycopersicum esculantum* L.), 10-12 günlük buğday fideleri (*Triticum aestivum* cv. Seri 82) ve 6-10 yapraklı Samsun NN (*Nicotiana tabaccum* var. Samsun NN) tütün yaprakları kullanılmıştır.

İzolatlardan elde edilen kültür filtratı 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/90, 1/100 oranlarında 1.5 ml'lik eppendorf tüpleri içerisinde sulandırılarak içerisine buğday bitkileri ve domates fideleri yerleştirilmiştir. Nem çemberinde. 25 ± 1 C⁰'de inkübe edilen domates fideleri 15-20 saat sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Buna göre fidelerin gözle görülür solgunluk belirtileri, 0-8 skalasına göre değerlendirilmiştir (Nadel ve Spiegel-Roy, 1987). Daha sonra kültür filtratının skala değerlerinden hastalık şiddeti (indeks değeri) ve hastalık yüzdesi hesaplanıp LD₅₀ (lethal doz) değerleri hesaplanarak standardize edilmiştir. Sonuçlara varyans analizi uygulanmış ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak su kullanılmıştır.

10-12 günlük buğday fideleri yukarıda açıklandığı gibi kültür filtratı içeren 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine konulduktan 3 gün sonra gözle görülür solgunluk 0-9 arasında hazırlanan bir skalaya göre değerlendirilmiş (Lijuan ve ark., 1991) ve yukarıda belirtildiği gibi LD₅₀ değerleri saptanmıştır.

Kültür filtratının 1/10, 1/20, 1/30, 1/40 oranlarda sulandırılmış solüsyonları Samsun NN tütününün gelişmiş yapraklarının parankima dokusuna bir şırınga ile enjekte edilmiştir. İnkübe edilmiş bitkiler bir hafta sonra göstermiş oldukları reaksiyonlara göre değerlendirilmiştir.

3.2.6.2.2. *In vitro* Seleksiyonda Kullanılan Optimum Kültür Filtratı ve Fusarium Asit Konsantrasyonlarının Kalluslar Kullanılarak Saptanması

3.2.6.2.1.'de ifade edildiği gibi bitkilerde oluşan solgunluk belirtilerine göre sonuçlar değerlendirilip lethal doz belirlendikten sonra kültür filtratının %10, %20, %30, %40 ve % 50 sulandırma oranları ile alınarak kallus seleksiyonu için uygun olan toksinin lethal dozları belirlenmiştir (Lijuan ve ark., 1991). Seleksiyon sürecinde Genç 99 buğday çeşidinden elde edilen kalluslar kullanılmıştır. Fusarium kültür filtratı otoklav edilmiş 45 °C' ye kadar soğutulup kallus ortamı içerisine belirli konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. 3.2.6.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan kültür filtratının %10, %20, %30, %40 ve % 50 oranlarında sulandırılarak hazırlanmış

konsantrasyonları, otoklav edilmiş %3 sakkaroz; %0.8 agar ve 2 mg/L 2.4-D içeren pH 5.8 olarak ayarlanmış 40-50 °C sıcaklıktaki katı MS ortamı içerisine ilave edilmiştir. Kontrol olarak %3 sakkaroz; %0.8 agar ve 2 mg/L 2.4-D içeren pH 5.8 olarak ayarlanmış katı MS ortamı kullanılmıştır. Bu ortam üzerine kalluslar küçük parçacıklar halinde (15-20 mg) yerleştirilmiş ve karanlık koşullarda 26±1 °C’de kültüre alınmıştır. Kültüre alınan kalluslar kültüre alınmalarından yaklaşık 4 hafta sonra gelişme durumlarına göre değerlendirilmiştir.

Fusarik asit ise, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 mM oranlarında otoklav edilmiş ve 45 °C’ ye kadar soğutulmuş kallus ortamı içerisine ilave edilmiştir. Kontrol olarak, %3 sakkaroz; %0.8 agar ve 2 mg/L 2.4-D içeren pH 5.8 olarak ayarlanmış katı MS ortamı kullanılmıştır. Bu ortam üzerine kalluslar küçük parçacıklar halinde (15-20 mg) yerleştirilmiş ve karanlık koşullarda 26±1 °C’de kültüre alınmıştır. Kontrol olarak %3 sakkaroz; %0.8 agar ve 2 mg/L 2.4-D içeren pH 5.8 olarak ayarlanmış katı MS ortamı kullanılmıştır. Kültüre alınma işleminden dört hafta sonra kallusların gelişimine göre değerlendirme yapılmıştır.

Değerlendirme hazırlanan skalaya göre yapılmıştır. 1: kahverengileşme yok, 2: kallus yüzeyi hafif kahverengileşmiş, 3: kallus kısmen kahverengileşmiş, 4: kallus kahverengileşmiş ve kallus gelişimi sınırlı, 5: kallus tamamıyla kahverengi ve gelişme yok. Denemeler tesadüf parselleri deneme deseninde 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Daha sonra kültür filtratı skala değerlerinden hastalık şiddeti ve hastalıklı kallus yüzdesi hesaplanıp LD₅₀ değerleri hesaplanarak standardize edilmiştir. Sonuçlara varyans analizi uygulanmış ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir.

3.2.7. *In vitro* Seleksiyon Süreci

3.2.7.1. *In vitro* Seleksiyonda Kallusların Kullanımı

Lethal dozları belirlendikten sonra Fusarium izolatları A-13, B-4’den elde edilen kültür filtratı ve fusarik asit lethal dozları esas alınarak 3.2.6.2.2’ de anlatıldığı şekilde kallus ortamı içerisine ilave edilmiştir. Bu şekilde elde edilen kültür filtratı ve

fusarik asit içeren ortamlar petri kutularına (9 cm çapında) 20 ml olacak şekilde dökülüp ortam katılaşmaya kadar bekletilmiştir. Her petri kutusuna her biri yaklaşık 15-20 mg olacak şekilde 20-30 adet kallus parçası yerleştirilmiştir. Bunlar 4-5 hafta süre ile karanlık koşullarda 26 ± 1 °C sıcaklıktaki iklim odalarında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra başlangıç ağırlıkları ile son ağırlıkları arasındaki farktan büyüme miktarları hesaplanmış, kallusların gelişimine göre değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirme 0-5 skalası kullanılarak 5 kategoride yapılmış, kültür filtratı ve fusarik asite rağmen gelişme gösteren kallus parçacıkları seçilerek sürekli olarak aynı kültür filtratı ve fusarik asit konsantrasyonuna sahip ortamda dört haftada bir toplam dört kez alt kültüre alınmıştır. Kontrol olarak kültür filtratı ve fusarik asit içermeyen kallus ortamı kullanılmıştır (Badea ve ark.,1997) Denemeler tesadüf parselleri deneme deseninde 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Sonuçlara varyans analizi uygulanmış ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir.

Canlı kalan kalluslar bitki regenerasyonu için MS+0.5mg/L IAA+1mg/L BAP+ %2 sakkaroz içeren katı MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Regenere olan bitkiler daha sonra kök oluşumunun teşviki için ½ MS+1mg/L NAA+ %2 sakkaroz içeren ortamlar üzerinde kültüre alınmışlardır. Kök oluşumunu tamamlamış bitkiler bunu takiben toprak:kum:çiftlik gübresi karışımına aktarılmış ve üzerleri bir hafta süre ile geçirgen polietilen plastik bir torba ile kapatılarak bitkiciklerin doğal koşullara adaptasyonu sağlanmıştır

3.2.8. Kültür Filtratı ve Fusarik Asit'in Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Denemede kullanılan 3 buğday çeşidinin taneleri %70'lik alkol içerisinde 1 dakika bekletildikten sonra %0.1 Tween-20 (polyoxethylene sorbitan monolaurate) içeren % 5'lik ticari sodyum hipoklorid (NaOCl) solüsyonu içerisinde 10 dakika bekletilmiş ve bunu takiben tohumlar 3 kez steril destile su ile yıkanmıştır. Yüzeysel sterilizasyona tabii tutulmuş buğday taneleri steril koşullarda steril kurutma kağıdı üzerinde bir süre bekletilerek üzerindeki fazla su alınmıştır. Kuruyan taneler %30 oranında sulandırılmış *F. graminearum*, *F. culmorum* kültür filtratı ve 0.3mM Fusarik asit %1 su-agar ortamı içerisine ilave edildikten sonra hazırlanan MS ortamı

üzerinde her petriye 25 buğday tohumu olacak şekilde kültüre alınarak 16 ± 1 °C’de inkübe edilmiştir (Şekil 3.7). İnkübasyondan 48 saat sonra kontroldeki tanelerin % 80’i çimleninceye kadar hergün çimlenen tane sayısı sayılmıştır. Kontrol olarak buğday taneleri sadece %1 su-agar ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Deneme sonucunda sonuçlara varyans analizi uygulanmış ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.7: Kültür filtratı ve fusarik asitin tohum çimlenmesi üzerine etkisinin araştırıldığı denemeden bir görünüm

3.2.9. *F. graminearum* ve *F. culmorum*’a ait İzolatların Moleküler Analizlerinin Yapılması

3.2.9.1. DNA İzolasyonu

Adana ili ve çevresinden buğday tarlalarından toplanan hastalıklı bitki örneklerinden elde edilen 10 adet *F. graminierum* ve 10 adet *F. culmorum*’a ait izolatlar arasındaki genetik farklılıkları belirlemek için RAPD analizi (Randomly Amplified Polimorphic DNA) yapılmıştır (Walker, 2001). Analiz yapabilmek için önce fungus misellerinden DNA İzolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her bir izolat önce petri kutuları içerisinde bulunan PDA ortamı üzerinde kültüre alınarak

geliştirilmiştir. Daha sonra bu kültürlerden mantar delici (korkbohrer) yardımı ile alınan 0,6 cm çapındaki misliyal 5 disk, 250 ml'lik erlenmayerler içerisinde hazırlanmış 75 ml steril sıvı PD ortamının inokule edilmesinde kullanılmıştır. Ortamlar daha sonra 26 ± 1 °C sıcaklıktaki iklim odasında dakikada 120 dk/devir çalışan bir çalkalayıcı (Edmund Büchler) üzerinde karanlık koşullarda 4 gün süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda erlenmayerler içerisindeki fungus süspansiyonları 70 mm çapındaki kağıt filtreden (Schleicher&Schuell) geçirilmesiyle filtre üzerinde kalan miseller, DNA İzolasyonunda kullanılmıştır. DNA İzolasyonları Peever ve ark. (1999)'na göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

1. DNA İzolasyonunda, fungus miselinden yaklaşık 200 mg alınarak 1.5 ml lik ependorf tüpler içerisine konulmuş ve üzerine sıvı azot eklenerek plastik çubuklar yardımıyla toz haline getirilmiştir.

2. Her tüpe 400µl lysis buffer (Ek 3) ilave edilmiş toz halindeki fungal materyal solusyon içerisinde çözülmüştür. Daha sonra tekrar 400 µl lysis buffer tüpler içerisine ilave edilmiştir. Tüpler elde 5-10 saniye karıştırıldıktan sonra 65 °C sıcaklıkta su banyosu içerisinde 45 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 4°C'de çalışan soğutmalı santrifüjde (Sigma 522) 10.000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvının 625 µl'si yeni tüplere aktarılmıştır.

3. Her tüp içerisine 200 µl 8 M potasyum asetat ilave edilmiştir. Vorteksle kısa süre karıştırıldıktan sonra -20 °C'de 5-10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 10.000 devir/dakika hızda 20 dakika santrifüj edilmiştir.

4. Süpernatantın 600 µl'si temiz mikrosantrifüj tüplere aktarılmış ve 800 µl fenol:kloroform:isoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek 5-10 saniye elde karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 10.000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir.

5. Süpernatantın 600 µl'si yeni tüplere aktarılmış 800 µl fenol:kloroform:isoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek 5-10 saniye elde karıştırılmıştır. Daha sonra karışım 10.000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir.

6. Üst sıvıdan 600 µl alınarak yeni tüplere aktarılmış ve üzerine 800 µl kloroform:isoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek karıştırılmış ve aynı devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra şeffaf üst sıvıdan dikkatlice 350 µl alınarak yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.

7. Tüplere 1/10 hacim 5 M NaCl ve 2 hacim %100 EtOH (EtOH) ilave edilerek yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler -20°C 'de 1 saat bekletilmiş ve bunu takiben 10.000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir.

8. Santrifüjden sonra tüpün dip kısmında oluşan pelletlerin üzerlerine 500 µl steril destile su ilave edilmiş ve pelletler çözülünceye kadar elde karıştırılmıştır. Aynı tüplere 350 µl polietilen glikol (PEG) solusyonu (Ek 4) ilave edildikten sonra bir süre karıştırılmış ve 4°C 'de 1 gece bekletilmiştir.

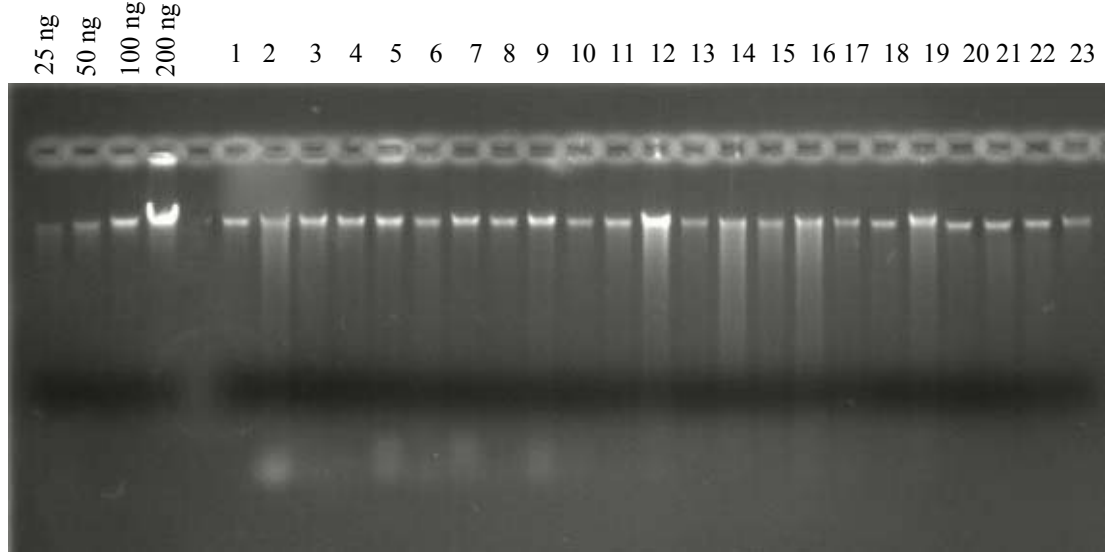
9. Bu sürenin sonunda örnekler 10.000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir.

10. Oluşan pelletler 50 µl TE solüsyonu (Ek 5) ilave edilerek çözülmüştür. Bunu takiben son konsantrasyonu 20 µg/ml olacak şekilde RNase ilave edilmiş ve 37°C 'de 1-2 saat süreyle inkübatörde inkübe edilmiştir.

11. Daha sonra örnekler üzerine 250 µl steril su, 30 µl 5 M NaCl (1/10 hacim) ve 600 µl EtOH ilave edilmiş -20°C 'de 1 saat bekletilmiştir. Bunu takiben örnekler 10.000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir.

12. Son olarak üst sıvı dökülmüş ve tüpler 0,5 ml %70 EtOH ile yıkanarak steril kabinde bir süre kurutulduktan sonra 40 µl TE buffer ilave edilerek pellet çözülmüştür.

İzole edilen DNA'ların kalitesi ve konsantrasyonunu belirlemek için 10µl'lik DNA örnekleri %0,8'lik agaroz jelde 100 V'da 45 dk yürütülmüştür. Kontrol olarak, konsantrasyonları bilinen λ DNA'sı (25 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng) kullanılmıştır. Jel ethidium bromid ile boyanmış (Ek 6) ve UV transilatör üzerinde incelenmiş ve poloroid fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3.8). DNA izolasyonu sonucunda izolatlara ait 50-200 ng DNA izole edilmiştir. DNA örnekleri analizler yapıncaya kadar -20°C 'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.8. Fusarium izolatları ve λ DNA'nın %0.8'lik agaroz jeldeki görüntüsü

3.2.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD Analizi)

DNA amplifikasyonu 10 μ M oligonükleotid primer (Iontek) dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Promega)'nın her birinden 2 mM, 1 ünite Taq DNA polimeraz (Promega)IX reaksiyon buffer (10 mM Tris HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, %0,1 Triton X-100), 15 mM $MgCl_2$, ve 20-30 ng DNA içerecek şekilde 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde toplam 25 μ l hacimde hazırlanmış mineral yağsız çalışan thermocycler (Techne, Genius)'a yerleştirilmiştir. Örnekler ilk önce 94 $^{\circ}C$ 'de 1 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonraki 45 döngü ise 94 $^{\circ}C$ 'de 1 dakika, 36 $^{\circ}C$ 'de 1 dakika, 72 $^{\circ}C$ 'de 2 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Örnekler son olarak 72 $^{\circ}C$ 'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Tüm döngüler tamamlandıktan sonra örnekler elektroforez yapılmaya kadar 4 $^{\circ}C$ 'de muhafaza edilmiştir. PCR ürünleri TAE buffer ile (Ek 5) hazırlanmış %1.5 agaroz jelde elektroforez yapılmış ve ethidium bromid (Ek 6) ile boyandıktan sonra görülebilir DNA bantlarının UV transilator altında fotoğrafları çekilmiştir.

RAPD analizinde OPT-01, OPT-04, OPT-06, OPT-16, OPT-18, OPU-13, OPU-15, OPU-19, OPU-17, ve UBC-85 olmak üzere 10 bazlık 10 farklı oligonükleotid kullanılmıştır (Ek 7). DNA bant uzunluklarını ölçmek amacıyla 100bp'lik DNA standartı (Fermantas) kullanılmıştır.

RAPD analizi sonucunda elde edilen bantların desenlerine bakılarak bantların olup olmamasına göre “1” veya “0” şeklinde değerlendirilmiş ve benzerlik indeksleri oluşturulmuştur. Çeşitler arasındaki genetik benzerliklere dayalı dendrogram verileri ise. Swofford (1993) tarafından geliştirilen PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Vers. 3.1.1.) programı kullanılarak “NJ cluster” analizi ile belirlenmiştir.

3.2.10 *In vitro* Seleksiyon ile Regenere Edilen Bitkilerin Moleküler Analizi

3.2.10.1. DNA İzolasyonu

Saksıda geliştirilmiş olan bitkiler belli bir büyüklüğe gelince yapraklardan DNA İzolasyonu yapılmıştır. DNA İzolasyonu bazı değişikliklerle Sharp ve ark. (1988)'nin yöntemine göre gerçekleştirilmiştir.

1. DNA İzolasyonunda, bitki yapraklarından yaklaşık 100 mg doku parçası alınarak 1.5 ml lik ependorf tüpler içerisine konulmuş ve üzerine sıvı azot eklenerek plastik çubuklar yardımıyla toz haline getirilmiştir.

2. Toz haline getirilmiş yaprak parçalarını ekstrakte etmek amacıyla üzerine 500 µl ekstraksiyon bafırı (Ek 8) ilave edilmiş ve plastik çubuk ile karıştırılmıştır.

3. Hazırlanan doku süspansiyonu 65 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 15-20 dakika inkübe edilmiştir.

4. Daha sonra bu karışım üzerine 0,7 hacim fenol 0,3 hacim 24:1 oranında kloroform/izoamil alkol eklenmiş ve elde edilen bu bitki süspansiyonu nazik bir şekilde karıştırıldıktan sonra +4 °C de 14.000 rpm de 10 dakika santrifuj edilmiştir.

5. Santrifujden sonra ependorf tüpte 2 farklı faz oluşmuştur. Nükleik asitler üstteki sıvı kısımda olduğundan bu kısım yeni bir ependorf tüpe aktarılmış ve kirli görünümde olan süspansiyonlar için bir önceki aşama tekrar edilmiştir.

6. İkinci kez üstteki kısım alındıktan sonra 1 hacim 24:1 oranında kloroform/izoamil alkol ilave edilerek tekrar +4 °C de 14.000 rpm de 10 dakika santrifuj edilmiştir.

7. Aynı şekilde üstteki sıvı kısım tekrar yeni bir ependorfa alınarak üzerine 50 µg/ml RNase (Sigma) ilave edilerek 37 °C’ de 30 dakika inkübatörde inkübe edilmiştir.

8. Bu şekilde elde edilen DNA solüsyonunda RNA’ların yapısı RNase uygulaması ile bozulmuş olsa da ortamda protein ve polisakkaritler mevcut olduğundan bunları parçalamak amacı ile 50 µg/ml proteinaz K (sigma) solüsyona ilave edilmiş ve bir önceki basamakta olduğu gibi 37 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.

9. Bu şekilde kısmen saflaştırılmış olan DNA’yı pellet halinde çöktürmek amacıyla solüsyonun üzerine 0.6 hacim soğuk izopropanol ve 0.3 M sodyum asetat ilave edilmiştir.

10. Solüsyon + 4 °C de 10 dakika 14.000 rpm de santrifuj edilerek DNA’nın tüpün dip kısmında pellet halinde toplanması sağlanmıştır.

11. Pellet halindeki DNA önce % 100’ lük sonra % 70’ lik etanol ile yıkandıktan sonra eppendorf tüp içerisinde 10 dakika filtre kağıdı üzerinde normal hava koşullarında kurutulmuştur.

12. Bu şekilde suyu uzaklaştırılmış pellet halindeki DNA’yı çözmek ve solüsyon halinde saklamak amacı ile herbir eppendorf tüpe 20 µl TAE (Ek 9) bafırı konulmuştur.

Hazırlanan DNA örneklerinin kalitesi ve konsantrasyonu 3.2.9.1.’de anlatıldığı gibi belirlenmiştir. DNA örnekleri analizler yapılıncaya kadar –20 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.10.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD Analizi)

DNA amplifikasyonu reaksiyonu için 10 µM oligonükleotid primer (Iontek) dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Promega)'nın her birinden 2 mM, 1 ünite Taq DNA polimeraz (Promega)1X reaksiyon buffer (10 mM Tris HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, %0,1 Triton X-100), 15 mM MgCl₂, ve 20-30 ng DNA içerecek şekilde 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde toplam 25 µl hacimde hazırlanmış mineral yağsız çalışan thermocycler (Techne, Genius)'a yerleştirilmiştir. Örnekler ilk önce 94 °C'de 1 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonraki 40 döngü ise 94 °C'de 1 dakika, 36 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Örnekler son olarak 72 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Tüm döngüler tamamlandıktan sonra örnekler elektroforez yapılcaya kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir. PCR ürünleri TAE buffer ile (Ek 8) hazırlanmış %1.5 agaroz jelde elektroforezi yapılmış ve ethidium bromid ile boyandıktan sonra görülebilir DNA bantlarının UV transilator altında fotoğrafları çekilmiştir.

RAPD analizinde OPA-04, OPA-05, OPD-05, OPE-05, OPH-04, OPN-15 olmak üzere 6 farklı oligonükleotid kullanılmıştır (Ek 10). DNA bant uzunluklarını ölçmek amacıyla 100 bp'lik DNA ladder (Fermantas) kullanılmıştır. OPA-04. OPA-05. OPD-05. OPE-05. OPH-04. OPN-15 olmak üzere 10 bazlık 10 farklı oligonükleotid kullanılarak yapılan RAPD analizi sonucunda elde edilen bantların desenlerine bakılarak bantların olup olmasına göre "1" veya "0" şeklinde değerlendirilmiş ve benzerlik indeksleri oluşturulmuştur. Çeşitler arasındaki genetik benzerliklere dayalı dendrogram verileri ise. Swofford (1993) tarafından geliştirilen PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Vers. 3.1.1.) programı kullanılarak "NJ cluster" analizi ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**4.1. *F. graminearum* ve *F. culmorum* İzolatlarının Toplanması**

Yapılan bu çalışmada Çukurova Bölgesi'nde bölgemizde yetiştirilen buğday çeşitlerinde *Fusarium* spp.'nin neden olduğu Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı tespit edilmiştir.

Hastalık etmenleri buğday başakları dışında bitkinin kök boğazında da enfeksiyona neden olmuştur. Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalarda, Trakya bölgesinde, Konya, Karaman, Niğde ve Aksaray yörelerinde buğday tarlalarında *Fusarium* spp. yaygın olduğu belirlenmiştir (Gümüştekin ve Akın, 1998). Carter ve ark. (2002), Avrupa, USA ve Nepal' de buğday ve mısır tarlalarında zarara neden olan *F. graminearum* izolatını tespit etmişlerdir. Derviş (1999), Ohio eyaletinin çeşitli bölgelerinden elde edilen *F. graminearum* izolatlarının patojeniteleri arasındaki farklılıkları araştırmıştır. Bu izolatlardan en virulent olanı seçilerek bazı dayanıklı X dayanıklı kışlık buğday varyetelerinin *Fusarium* Başak Yanıklığı'na karşı dayanıklılıklarını değerlendirmek için yapılan segregasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca, Gilbert ve ark. (2001), çeltik ortamı üzerinde vejetatif uyum grubu (VCG) özelliği çok yüksek olan, ergestrol ve toksin üretiminde farklılık gösteren 15 adet *F. graminearum* izolatının buğday başaklarını hastalandırma derecesini ve patojenlerin şiddetini belirlemek için bir araştırma yürütmüşlerdir.

Tek spor izolasyonu sonucunda gelişen izolatlar yeniden PDA ortamı üzerinde kültüre alınmıştır (Şekil 4.1). Booth (1977), tek spor izolasyonunda gelişen izolatların uniform geliştiğini ve türe ait özellikleri gösterdiğini, böylece tek spor izolasyonu ile elde edilen saf izolatlardan teşhisin yanılığa düşülmeden yapılabileceğini belirtmiştir. Ayrıca, Nelson ve ark. (1983), *Fusarium* ırklarının kültür ortamları üzerinde mutantlar meydana getirebileceğini, bu nedenle araştırmalarda tek spor izolasyonlarının kullanılması gerektiğini ifade etmişlerdir.

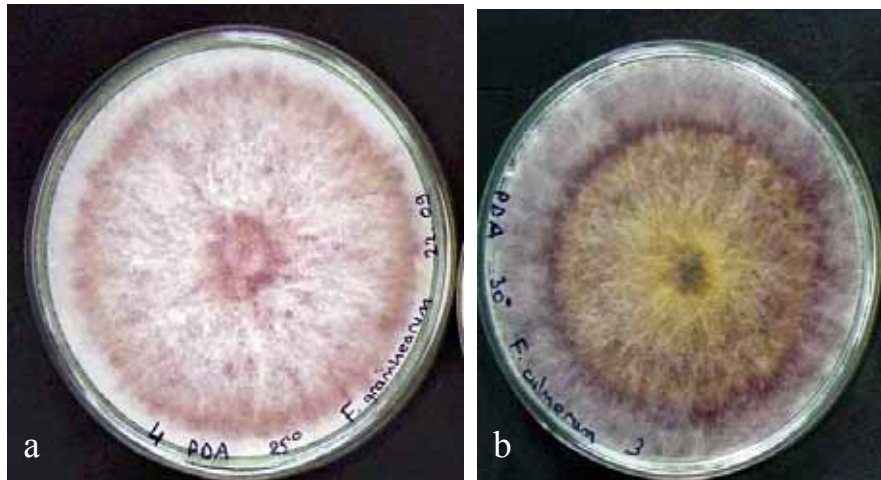
Çizelge 4.1: 2002 yılı Nisan-Mayıs aylarında Adana ve çevresinde Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı ile ilgili yapılan arazi çıkışları sonucunda elde edilen gözlem sonuçları

Zaman 2002	Örnek Alınan Bitki Materyali	Çeşitler	Gözlem Sonuçları
Tigem Arazisi	Başak, kök boğazı	Golia, Adana 99, Ceyhan 99, Doğankent, Özdemir 97, Panda, Seri 82, Nagev, Golia, Galile	Hastalık Seri 82, Nagev ve Galile, Doğankent ve Özdemir 97 de çok fazla, Panda ve Golia ve diğer çeşitlerde de var.
Yeniköy	Başak	Sageteria, Golia	Hastalık her iki çeşitte az var.
Kadirli	Kökboğazı, başak	Adana 99	Hastalık var.
Ceyhan	Başak	Adana 99, Panda	Hastalık var.
Ceyhan	Kökboğazı, başak	Sageteria	Hastalık var.
Doğankent Arazisi	Kökboğazı, Başak	Panda, Adana 99, Dogankent	Hastalık Panda ve Doğankent’de çok fazla, Adana 99’ da da var.
Yüreğir	Kökboğazı, başak	Adana 99	Başak Yanıklığı var.
Karaisalı	Kökboğazı, başak	Adana, Panda, Sageteria	Hastalık Sageteri’da az var, diğer çeşitlerde var.
Misis	Başak	Adana 99, Panda	Hastalık var.
Karataş	Kök boğazı, başak	Adana 99	Hastalık var.
Ç.Ü.Tarla B.B.Arazisi	Başak	Nagev, Genç 99	Hastalık var Nagev’de çok fazla, Genç 99’da hastalık var.
Abdioğlu	Başak	Ceyhan 99, Adana 99	Hastalık var.
İmamoğlu	Başak	Adana 99, Panda	Hastalık var.
İmamoğlu	Başak	Panda, Adana 99	Hastalık var.



Şekil 4.1. Bazı *Fusarium* spp. izolatlarının PDA ortamı üzerindeki gelişimi.

Tek spor izolasyonu sonucunda elde edilen izolatlar önce makroskobik olarak incelenmiştir. Bu inceleme sonunda *F. graminearum*' un PDA ortamı üzerinde pembeden kahverengiye doğru değişen koyu kırmızımsı bir misel oluşturduğu, (Şekil 4.2 a), *F. culmorum*'un ise aynı ortam üzerinde karmen kırmızısı renginde gelişme gösterdiği gözlemlenmiştir. Her iki izolat havai misel gelişimi göstermişlerdir (Şekil 4.2 b). Booth (1977); Gerlach ve Nirenberg (1982); Nelson ve ark. (1983)'nın yapmış oldukları çalışmalarda her iki *Fusarium* türünün makroskobik olarak benzer özellikler gösterdiği belirlenmiş olup, bu bakımdan bu çalışmada alınan sonuçlar ile adı geçen araştırmacıların aldığı sonuçlar birbirleriyle örtüşmektedir.



Şekil 4.2. *F. graminearum* (a) ve *F. culmorum*'un (b) PDA ortamı üzerindeki gelişimi

Makroskobik incelemeden sonra tek spor izolasyonlarına ait kültürlerden preperatlar hazırlanmış ve ışık mikroskobu kullanarak (Olympus BX51T-32P01) incelenmiş ve yapılan survey çalışmaları sonunda elde edilen fungusların spor şekilleri, konidiofor yapıları gibi taksonomik özellikleri baz alınarak *F. graminearum*'a ait 16, *F. culmorum*'a ait 10 izolatın varlığı belirlenmiştir. Adana ili ve çevresinde yapılan survey çalışmaları sonucunda bölgede *F.graminearum* izolatının buğday ekim alanlarında daha yoğun olduğu gözlenmiştir

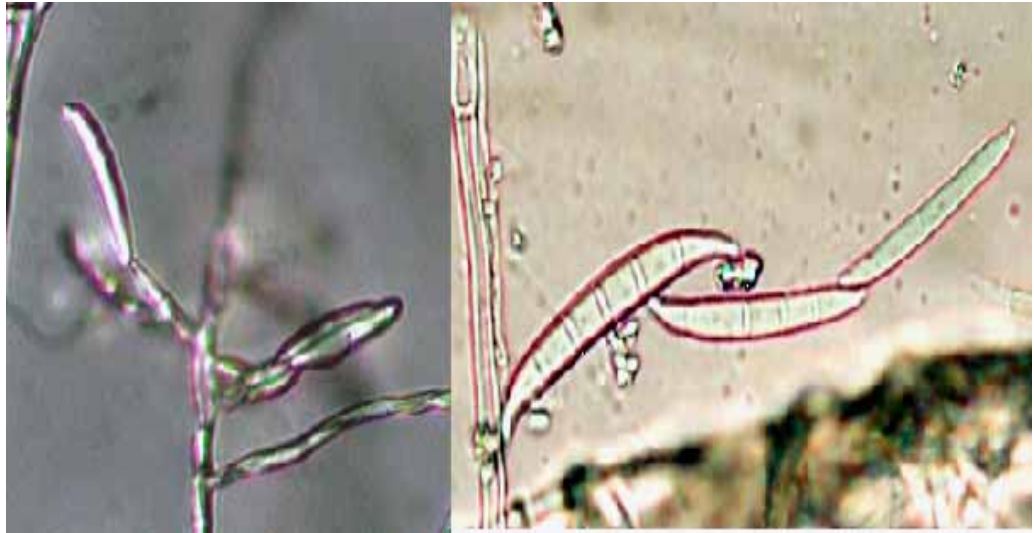
F. culmorum'un monofialidler ve makrokonidiler oluşturduğu ve genellikle 5 septalı olduğu gözlenmiştir. Nelson ve ark. (1983), *F. culmorum*'un sadece makrokonidiler oluşturduğunu, konidilerin kalın duvarlı kısa ventral ve dorsal yüzeyde kıvrımlara sahip olduğunu ve genellikle 5 septalı olup 5-7.5X31-50µ uzunluğunda olduğunu, makrokonidilerin ayak hücrelerine sahip olduğunu bildirmiştir. Klamidosporların genel olarak yaygın olmadığı, genellikle hiflerin ortasında bulunup oval şekilde, tek tek veya zincir şeklinde bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

F. graminearum'un kısa lateral fialid oluşturdukları ve PDA ortamı üzerinde fialidlerin sprodochia oluşturdukları gözlenmiştir. Araştırma sonucunda *F. graminearum*'un makrokonidiler oluşturduğu, bunların kano şeklinde ve 3-5 septalı olduğu belirlenmiştir. *F. graminearum* makrokonidilerinin *F. culmorum*'un konidilerinde olduğu gibi ayak hücrelerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Klamidosporların ise hif uçlarında veya ortasında olduğu ve balon şeklinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).

Bu bulgular Booth (1977) ve Nelson ve ark (1983)'ın sonuçları ile paralellik göstermektedir. Booth (1977); *F. graminearum* fialidlerinin 3.5-4.5µX10-14µ uzunluğunda olduğunu, 3-5 septalı olduğunu bildirmiştir.



Şekil 4.3. *F. culmorum*' a ait makrokonidiler (X40)

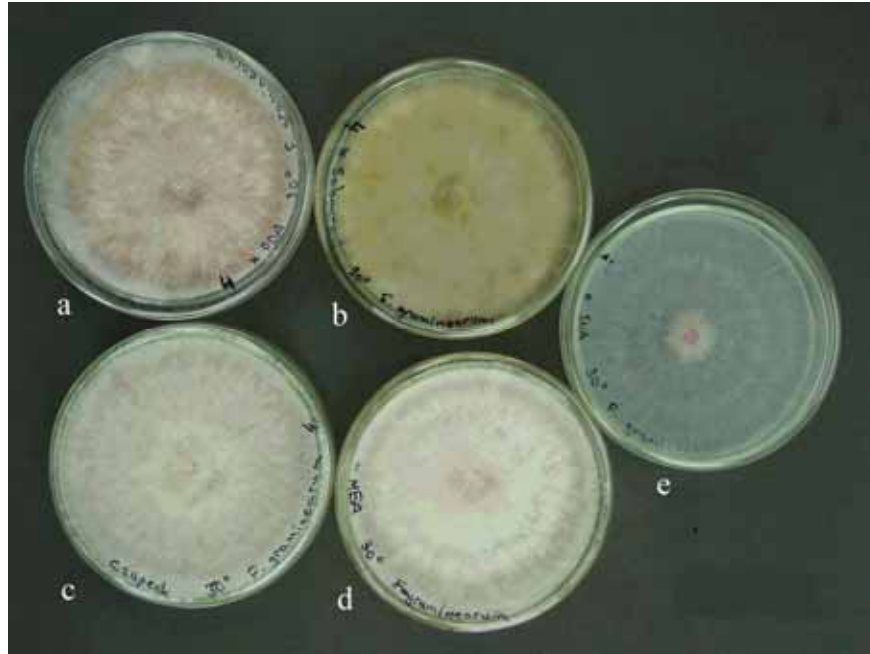


Şekil 4.4. *F. graminearum*'un fialid (a) ve makrokonidileri (b) (X40)

4.2. *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un Farklı Ortam ve Sıcaklıklardaki Koloni Gelişimi

F. graminearum ve *F. culmorum*'un optimum gelişme gösterdiği ortam ve sıcaklıkların belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda alınan sonuçlar Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir.

F. graminearum 'un A-13 nolu izolatu ortamlar üzerinde kültüre alındığında ortama bağlı olarak farklı misel gelişimi göstermiştir. Fungus SNA ortamı üzerinde çok ince, şeffaf bir misel tabakası halinde yavaş bir gelişim göstermiştir. MEA, PDA ve CA ortamları üzerinde önce ince bir tabaka halinde gelişmiş, daha sonra havai misel oluşturmuştur (Şekil 4.5). Fungus PDA ortamı üzerinde pembeden kahverengiye doğru değişen kırmızımsı bir misel gelişimi göstermiştir. CA ve MEA ortamı üzerinde de PDA ortamı üzerindeki misel gelişimine benzer pembe bir gelişim göstermiştir. Sabourad ortamı üzerinde sarımsı kahverengi renkte düzensiz bir misel gelişimi gözlenmiştir. Kültüre petri kutusunun tersinden bakıldığında kültürün kızıl kahverengi renkte olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.5. *F. graminearum*'un A-13 izolatının 30⁰C PDA (a), Sabourad (b), Malt Ekstrakt Agar (c), Czapek-Dox Agar (d), Sentetik Nutrient Agar (e) ortamları üzerindeki gelişimi.

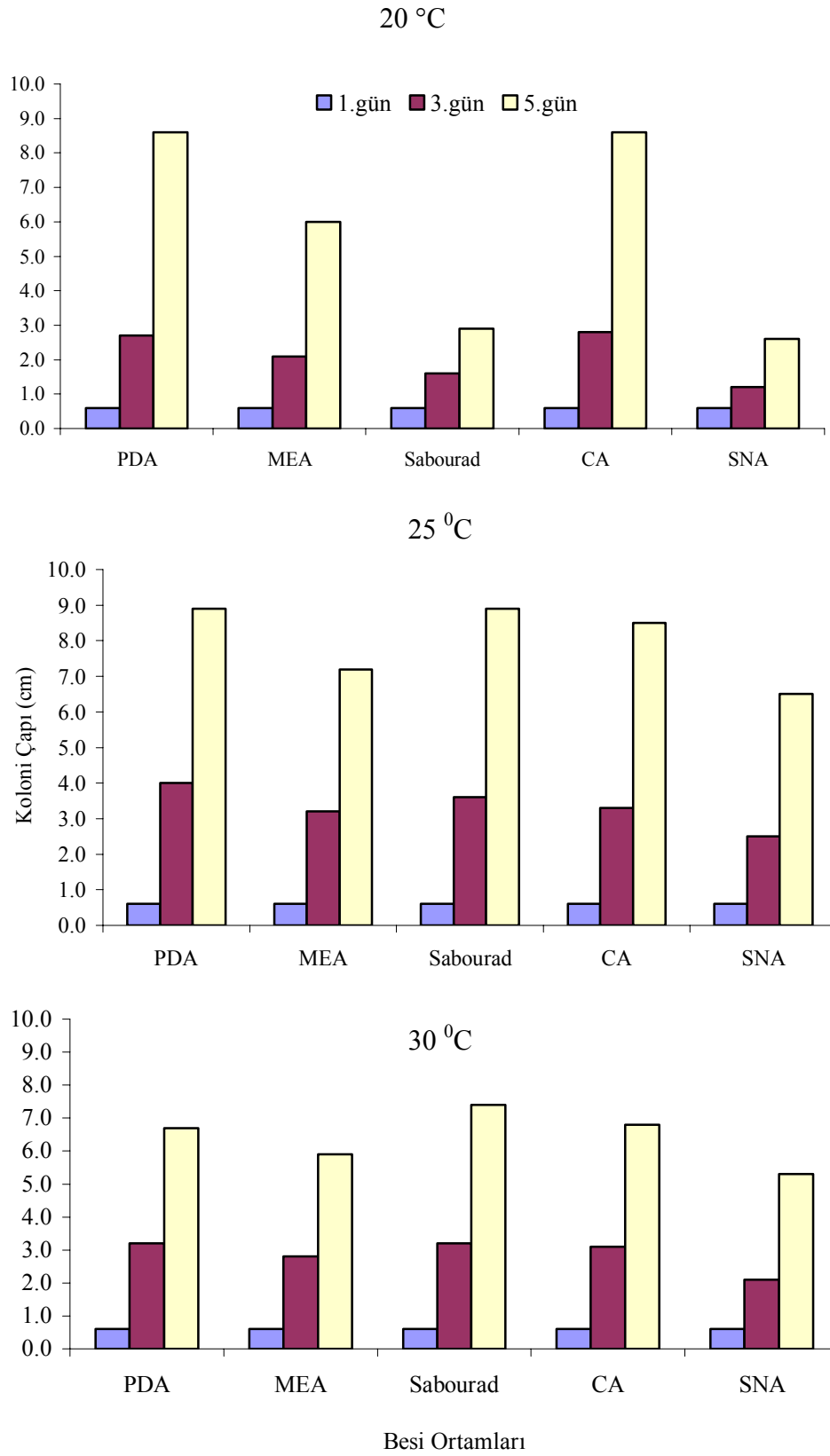
Nelson ve ark. (1983); Booth (1977); Gerlach ve Nirenberg (1982) *F. graminearum* izolatlarının koloni morfolojisi ve gelişme oranları ile ilgili yapmış oldukları çalışmalarda da benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Araştırma sonucunda Buğdayda Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan başlıca etmenlerden olan *F. graminearum* 'un laboratuvar koşullarında PDA ortamı üzerinde pembeden kahverengiye değişen koyu kırmızımsı bir misel tabakası oluşturduklarını ve en iyi 24-26 °C sıcaklıkta gelişim gösterdiklerini belirlemişlerdir. Bai (1996) PDA ortamı üzerinde gelişen *F. graminearum* 'un 25 °C sıcaklıkta 1 hafta içerisinde petri kutusunu tamamen misel ile kapladığını, petri kutusunun alt kısmının açık kırmızımsı bir renkte olduğunu bildirmiştir.

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6'da bu konuda değerlendirilmeye alınan iki izolattan *F. graminearum* 'un A-13 izolatı optimum gelişmeyi 20 °C'de CA ve PDA ortamları üzerinde göstermiş, bunu sırasıyla, SNA ve MEA ortamları üzerindeki gelişme takip etmiştir. Fungus 25°C'de ise en iyi sırasıyla PDA, MEA, CA ve Sabourad ortamları üzerinde gelişmiştir. 30°C sıcaklıkta ise fungus sırasıyla PDA, CA, Sabourad ve MEA ortamları üzerinde gelişme göstermiştir. SNA ortamı üzerinde denemeye alınan 25 ve 30°C sıcaklıkta genel olarak fungusun çok yavaş geliştiği ortam olmuş ve istatistiksel olarak diğer ortamlar üzerindeki gelişmesinden farklılıklar göstermiş, buna rağmen çok fazla sayıda makrokonidi oluşturmuştur. Fungus 20°C'de en yavaş Sabourad ortamı üzerinde gelişme göstermiştir. Araştırmada kullanılan beş değişik ortam üzerinde gelişen *F. graminearum* 'un A-13 izolatının 25 ve 30°C'deki misel gelişimleri açısından çok önemli bir farkın olmadığı ve en iyi misel gelişiminin 25 C⁰ de sırasıyla PDA, CA, MEA ve Sabourad ortamları üzerinde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Gerlach ve Nirenberg (1982), PDA ortamı üzerinde 25°C sıcaklıkta *F. graminearum* 'koloni gelişiminin 5. gün sonunda 7.8-8.0 cm çapına ulaştığını belirtmişlerdir. Bu bakımdan alınan sonuçlar literatür bilgileri ile örtüşmektedir.

Çizelge 4.2. *F. graminearum*'un A-13 nolu izolatının 20, 25, 30°C sıcaklıklarda ve beş farklı ortam üzerindeki koloni gelişimi (Ortalama±Standart hata)*.

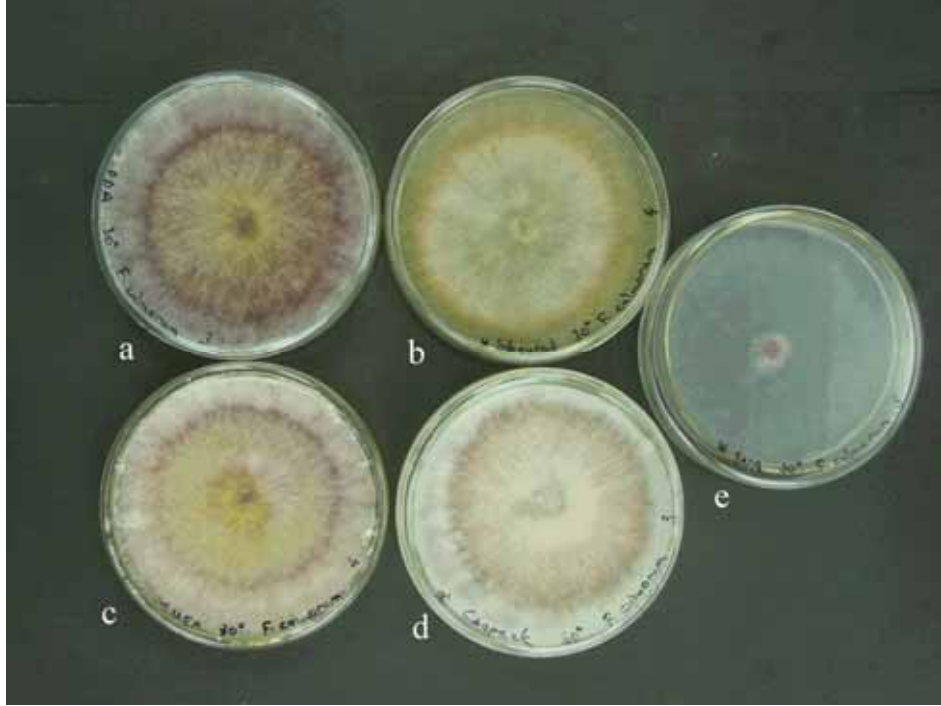
Sıcaklık (°C)	Ortam Adı	Koloni Çapı (cm)		
		1.Gün	3.Gün	5.Gün
20	PDA	0.6±0.0 a	2.7±0.2 a	8.6±0.1 a
	MEA	0.6±0.0 a	2.1±0.1 b	6.0±0.2 b
	Sabourad	0.6±0.0 a	1.6±0.0 c	2.9±0.2 c
	CA	0.6±0.0 a	2.8±0.1 a	8.6±0.1 a
	SNA	0.6±0.0 a	1.2±0.1 d	2.6±0.2 c
	Ortalama	0.6	2.08	5.74
25	PDA	0.6±0.0 a	4.0±0.1 a	8.9±0.1 a
	MEA	0.6±0.0 a	3.2±0.1 c	7.2±0.2 b
	Sabourad	0.6±0.0 a	3.6±0.1 b	8.9±0.5 a
	CA	0.6±0.0 a	3.5±0.1 d	8.5±0.1 a
	SNA	0.6±0.0 a	2.5±0.1 d	6.5±0.1 c
	Ortalama	0.6	3.32	8.0
30	PDA	0.6±0.0 a	3.2±0.1 a	6.7±0.2 b
	MEA	0.6±0.0 a	2.8±0.2 b	5.9±0.2 c
	Sabourad	0.6±0.0 a	3.0±0.1 a	7.4±0.1 a
	CA	0.6±0.0 a	3.1±0.1 a	6.8±0.1 b
	SNA	0.6±0.0 a	2.1±0.1 c	5.3±0.2 c
	Ortalama	0.6	2.88	6.42

* Her bir sıcaklık için aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



Şekil 4.6. *F. graminearum*'un A-13 izolatının 20, 25 ve 30 °C sıcaklıklarda ve beş farklı ortam üzerinde zamana bağlı koloni gelişimi

F. culmorum'un B-4 izolatu kültüre alındığı SNA ortamı dışında PDA, CA, Sabourad ve MEA ortamları üzerinde 7. günün sonunda petri kutusunu tamamen kaplamış ve miseller çok yoğun bir gelişme göstermiştir. *F. culmorum* PDA ortamı üzerinde merkezi kahverengi dışa doğru kısmen kırmızı pembemsi renkte olan bir misel gelişimi göstermiştir. Fungus MEA ve CA ortamı üzerinde de PDA ortamı üzerindeki misel gelişimine benzer bir gelişme göstermiştir. Sabourad ortamı üzerinde ise fungus sarımsı kahverengi renkte bir gelişme göstermiştir. *F. culmorum* SNA ortamı üzerinde ise çok ince şeffaf su renginde bir misel tabakası oluşturmuştur. SNA ortamı üzerinde fungusun 9. günün sonunda petriyi hala tamamen kaplamamış olduğu gözlenmiştir. Fungus MEA, PDA ve CA ortamları üzerinde önce ince bir tabaka halinde gelişmiş daha sonra havai misel oluşturmuştur. *F. graminearum* ve *F. culmorum* Sabourad ortamı üzerinde ise düzensiz bir misel gelişimi gösterirken, SNA ortamı üzerinde çok zayıf ve yavaş gelişmiştir (şekil 4.7).



şekil 4.7. *F. culmorum*'un B-4 izolatının 30⁰C PDA (a), Sabourad (b), Malt Ekstrakt Agar (c), Czapek-Dox Agar(d), Sentetik Nutrient Agar (e) ortamları üzerindeki gelişimi.

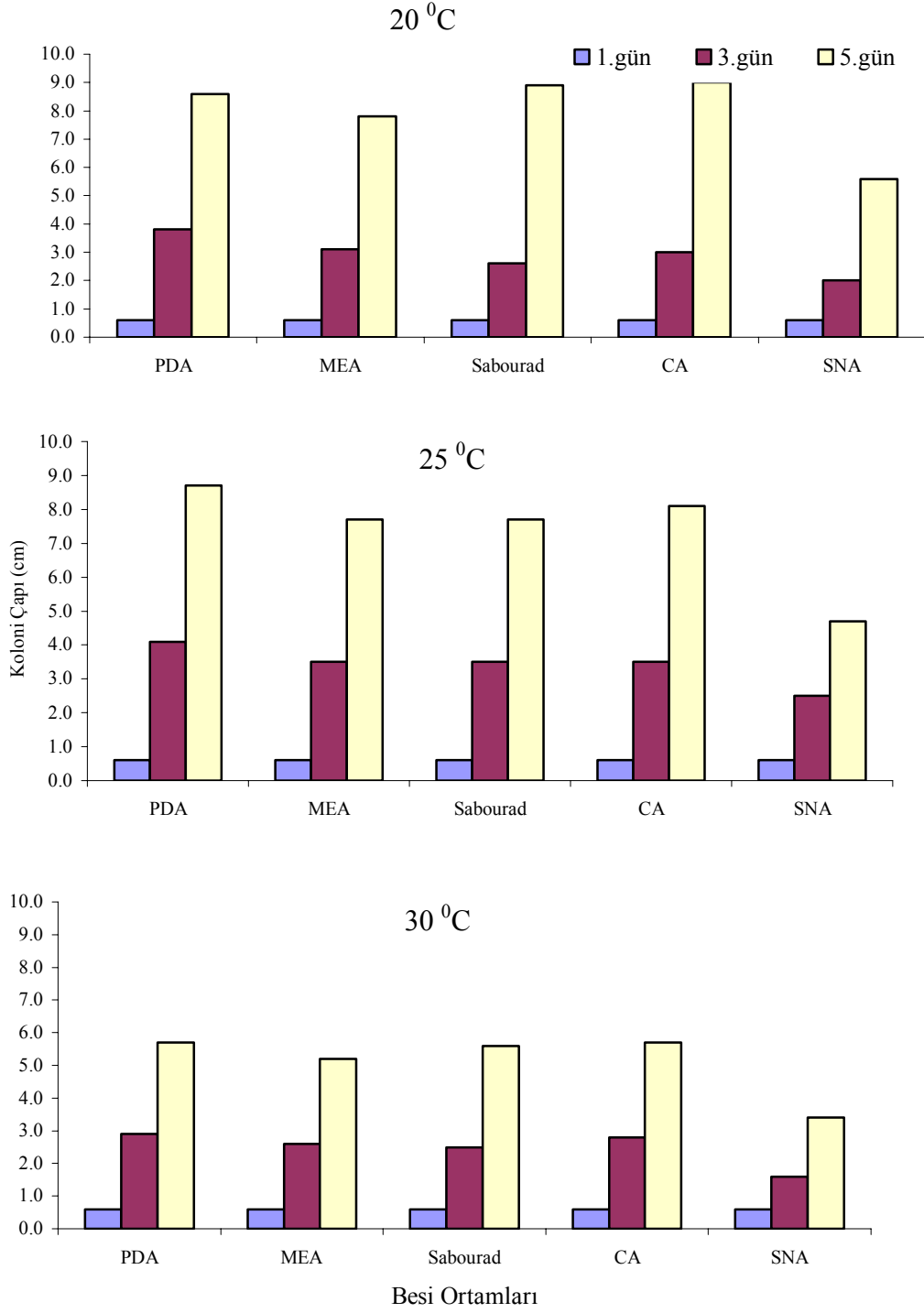
Nelson ve ark. (1983); Booth (1977), *F. culmorum* izolatlarını koloni morfolojisi ve gelişme oranları ile ilgili yapmış oldukları çalışmalarda benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan etmenlerden *F. culmorum* laboratuvar koşullarında 25 °C sıcaklıkta PDA ortamı üzerinde karmen kırmızısı bir misel tabakası oluşturduğu araştırmalar sonucunda tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi en iyi gelişmeyi *F. culmorum*'un B-14 izolatının 20 ve 25°C sıcaklıkta misel gelişimleri açısından çok önemli bir farkın olmadığı gözlenmiştir. Fungus 20 ve 25°C sıcaklıkta CA, Sabourad, PDA ve MEA ortamları üzerinde çok iyi bir gelişme göstermiştir. 30°C sıcaklıkta ise fungus en iyi CA, Sabourad ve PDA ortamları üzerinde gelişme göstermiş, ve bunu MEA ortamı üzerindeki gelişme takip etmiştir. SNA ortamı her üç sıcaklıkta fungusun en yavaş gelişme gösterdiği ortam olmuş ve istatistiksel olarak farklı bir grup içerisinde yer almıştır. *F. culmorum* izolatının ise 20°C ve 25°C deki misel gelişimleri açısından çok önemli bir farkın olmadığı ve en iyi misel gelişiminin 25 °C de PDA, CA, MEA ve Sabourad ortamları üzerinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4. 8'). Fungus 20 °C'de 5. gün sonunda PDA ortamı üzerinde 8,6 cm, MEA ortamı üzerinde 7.8 cm, Sabourad ortamı üzerinde 8.9 cm ve CA ortamı üzerinde 9.0 cm çapına ulaşarak bu üç ortamda koloni gelişimi bakımından istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. SNA ortamı üzerinde ise 5.6 cm çapına ulaşmıştır. SNA ortamı 20 °C'de fungusun en yavaş geliştiği ortam olmuş ve istatistiksel olarak farklı bir grup içerisinde yer almıştır. Fungus 25 °C'de 5. günün sonunda PDA, CA, MEA, Sabourad ortamları üzerinde 7.5-8 cm arasında gelişme göstermiş, 30 °C'de ise Sabourad, CA, PDA, MEA ortamlarında sırasıyla 5.6 cm, 5.7 cm, 5.7 cm ve 5.2 cm gelişmiştir (Çizelge 4.3). Gerlach ve Nirenberg (1982), *F. culmorum*'un PDA ortamı üzerinde 25°C sıcaklıkta çok hızlı geliştiğini ve 5. gün sonunda 7.8-8.5 cm çapına ulaştığını belirtmişlerdir.

Çizelge 4.3. *F. culmorum*'un B-4 nolu izolatının 20, 25, 30°C sıcaklıklarda ve beş farklı ortam üzerindeki koloni gelişimi.

Sıcaklık (°C)	Ortam Adı	Koloni Çapı (cm)		
		1.Gün	3.Gün	5.Gün
20	PDA	0.6±0.0 a	3.8±0.1 a	8.6±0.2 a
	MEA	0.6±0.0 a	3.1±0.1 b	7.8±0.3 b
	Sabourad	0.6±0.0 a	2.6±0.1 c	8.9±0.1 a
	CA	0.6±0.0 a	3.0±0.0 bc	9.0±0.0 a
	SNA	0.6±0.0 a	2.0±0.1 d	5.6±0.1 c
	Ortalama	0.6	2.9	7.98
25	PDA	0.6±0.0 a	4.1±0.1 a	8.5±0.1 a
	MEA	0.6±0.0 a	3.5±0.1 a	7.7±0.2 a
	Sabourad	0.6±0.0 a	3.5±0.2 a	7.7±0.2 a
	CA	0.6±0.0 a	3.5±0.1 a	8.1±0.2 a
	SNA	0.6±0.0 a	2.5±0.4 b	4.7±0.8 b
	Ortalama	0.6	3.42	7.38
30	PDA	0.6±0.0 a	2.9±0.1 a	5.7±0.1 a
	MEA	0.6±0.0 a	2.6±0.1 b	5.2±0.1 a
	Sabourad	0.6±0.0 a	2.5±0.2 bc	5.6±0.2 a
	CA	0.6±0.0 a	2.8±0.1 b	5.7±0.1 a
	SNA	0.6±0.0 a	1.6±0.1 c	3.4±0.2 b
	Ortalama	0.6	2.48	5.12

* Her bir sıcaklık için aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



Şekil 4.8. *F. culmorum*'un B-4 izolatının 20, 25 ve 30 °C sıcaklıklarda ve beş farklı ortam üzerinde zamana bağlı koloni gelişimi.

F. graminearum ve *F. culmorum*'un gelişmesinde sıcaklık, ortam ve sıcaklık-ortam interaksiyonunun etkili olduğu, ancak sıcaklığın etkisinin 3.günden sonra ortaya çıktığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmada *F. graminearum* ve *F.culmorum*'un en iyi 25⁰C'de PDA ve CA ortamı üzerinde geliştiği gözlenmiştir. Gerlach ve Nirenberg (1982); Nelson ve ark. (1983); Booth (1977) ve Gerlach ve Nirenberg (1982), yapmış oldukları çalışmalarda *F. gaminearum* ve *F. culmorum*'un PDA ortamı üzerinde 25⁰C'de en iyi geliştiğini bildirmişlerdir.

4.3. *F. graminearum* ve *F. culmorum* İzolatlarının Patojenitelerinin Belirlenmesi

Laboratuvar koşullarında yapılan bu çalışmada *Fusarium* spp.'ye ait 26 izolatın patojenitesi, bu izolatlara ait spor süspansiyonlarının saksılarda yetiştirilen 12 günlük Seri 82 buğday bitkilerine uygulanması ile belirlenmiştir. Şekil 4.9' da da görüldüğü gibi patojen tarafından inokule edilen bitkinin dokularında klorofil kaybı sonucunda kısa zaman sonra sararmalar ve pörsümeler tespit edilmiştir. Kök boğazında siyahlaşma ve çürümeler görülmüştür.



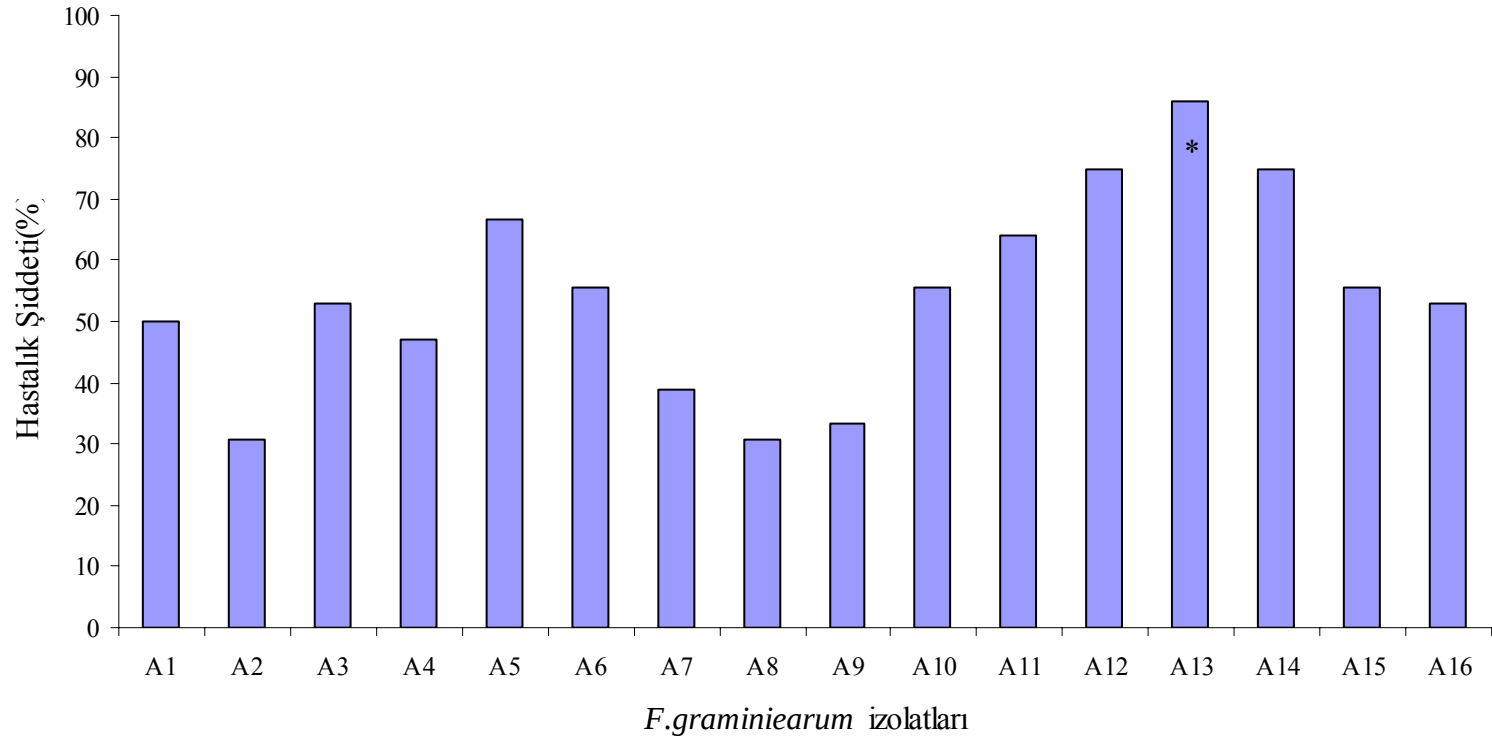
Şekil 4.9. *Fusarium* izolatlarının patojenitelerinin belirlenmesi: *F. graminearum* ile inokule edilmiş Seri 82 buğday bitkisi (sağ), Kontrol (sol) .

Patojenite ile ilgili olarak yapılan denemede aynı bölgeden alınan izolatlar arasında farklılıklar gözlenmiştir. *F. graminearum* izolatlarının 1×10^5 spor/ml konsantrasyonları ile yapılan uygulamada bitkilerde en şiddetli ölüm sırasıyla A-13, A-12, A-14, A-5 ve A-6 izolatlarında %86.1, %75.0 %75.0, %66.7 ve %55.6 hastalık şiddeti oranlarında olmuştur (Çizelge 4.4). *F. graminearum* izolatları Seri 82 buğday bitkisini %55-86.1 oranında hastalandırmıştır. Buğday bitkisinde en fazla hastalık oluşturan *F. graminearum* A-13 izolatı olmuştur (Şekil 4.10).

Çizelge 4.4. *F. graminearum* izolatlarının Seri 82 buğday bitkisini hastalandırma derecesi

İzolatlar	Hastalık Şiddeti (%)	İzolatlar	Hastalık Şiddeti (%)
A-1	50±0.57 def	A-9	33.3±0.81 gh
A-2	30.6±0.50 h	A-10	55.6±0.81 cde
A-3	52.8.50 cdef	A-11	63.9±0.97 bcd
A-4	47.2±1.25 efg	A-12	75.0±0.95 ab
A-5	66.7±1.41 bc	A-13	86.1±0.50 a
A-6	55.6±1.41 cde	A-14	67.7±0.50 ab
A-7	38.9±0.57 fgh	A-15	55.6±0.81 cde
A-8	30.6±0.95 h	A-16	52.8±0.97 cdef

*Benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



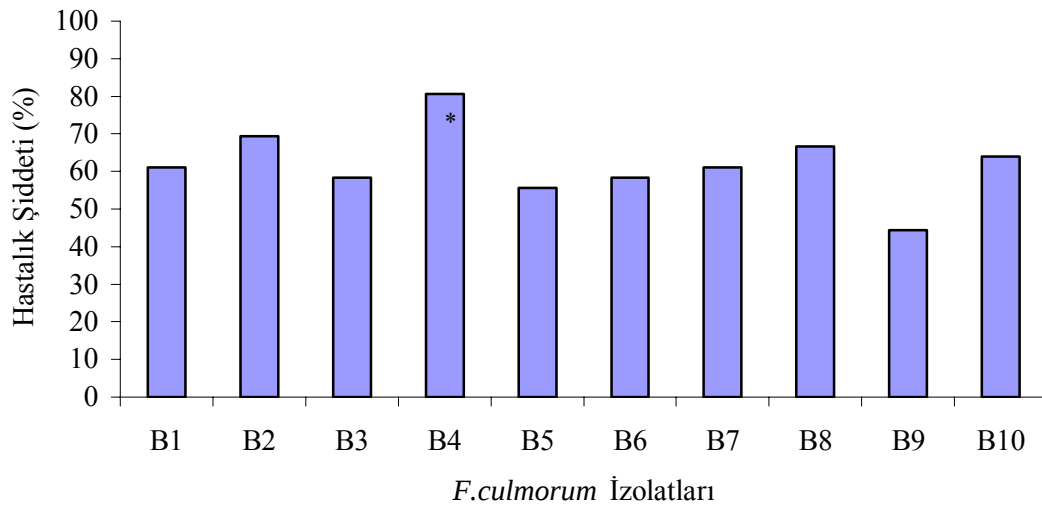
Şekil 4.10. *F. graminearum* izolatlarının Seri 82 buğday bitkisini hastalandırma şiddeti.

F. culmorum izolatları ise buğday bitkisini %63.9-80.6 oranında hastalandırmıştır (Şekil 4.11). *F. culmorum* izolatları arasında buğday bitkisinde en yüksek oranda hastalığa neden olan izolatın B-4 izolatı olduğu saptanmıştır. Adı geçen *F. culmorum* B-4 izolatı patojenite testinde bitki materyali olarak seçilen Seri 82 buğday çeşidinde %80.6 oranında hastalığa neden olmuştur. Bunu sırasıyla B-2, B-8 ve B-10 izolatlarının neden olduğu %69.4, %66.7 ve %63.9 hastalık şiddeti oranları izlemiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. *F. culmorum* izolatlarının Seri 82 buğday bitkisini hastalandırma derecesi

İzolatlar	Hastalık Şiddeti (%)	İzolatlar	Hastalık Şiddeti (%)
B-1	61.1±0.57 b	B-6	58.3±0.50 bc
B-2	69.4±1.50 ab	B-7	61.1±1.29 b
B-3	58.3±0.95 bc	B-8	66.7±0.81 ab
B-4	80.6±0.50 a	B-9	64.4±0.81 b
B-5	55.6±0.81 c	B-10	63.9±0.95 b

*Benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



Şekil 4.11. *F. culmorum* izolatlarının Seri 82 buğday bitkisini hastalandırma şiddeti

F. graminearum'a ait 16 ve *F. culmorum*'a ait 10 izolat $24\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 1×10^5 spor/ml yoğunluğunda buğday bitkisini hastalandırma dereceleri belirlenerek en iyi sonucu veren *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatları spor süspansiyonu şeklinde tarla ve sera koşullarında yetiştirilmiş buğday bitkilerine uygulanmıştır.

Carter ve ark. (2002), Avrupa, ABD ve Nepal'den toplamış oldukları 188 *F. graminearum* izolatları için patojenite testi yapmışlar ve patojenite testi sonucunda izolatların patojenitelerinin farklı olduğunu tespit ederek izolatları gruplandırmışlardır. Bu durum sonucunda, fungusun doğada çok sayıda ırklarının bulunduğunu, her ırkın bitkiyi hastalandırma derecesinin farklı olduğunu ve ırklar arasında genetik varyasyonun patojeniteyi etkilediği düşünülmektedir.

Gargouri ve ark. (2003), Tunus'da buğdayda Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan *F. culmorum*'un farklı patojeniteye sahip olduğunu belirlemişler, patojen popülasyonunda ve patojenitenin genetik varyasyonla bir ilişkisi olduğunu tespit edememişlerdir. Miedenar (2001), bazı ırkların bitkileri daha az hastalandırmalarının nedeninin konukçu ile ilişkili olduğunu ifade etmiştir. Bai (1996), yapmış olduğu bir çalışma sonucunda izolatlar arasında patojenitenin farklı olmasının nedenini, patojenin konukçu bitkide kolonize olma yeteneklerinin farklılığından kaynaklandığını belirtmiştir.

4.4. Bazı Buğday Çeşitlerinin *F. graminearum* ve *F. culmorum*'a Karşı Sera ve Saksı Koşullarındaki Reaksiyonları

4.3' de belirtildiği gibi yapılan patojenite denemesi sonucunda en iyi sonucu veren *F. graminearum*'un A-13 ve *F. culmorum*'un B-4 izolatlarına ait spor süspansiyonları 1×10^5 spor/ml olarak ayarlanarak sera ve saksı uygulamasında buğday başakları sabahın erken saatinde inokule edilmiştir. Uygulamadan 10. 14. 18. 22 ve 26 gün sonra bitkilerde hastalık şiddeti saptanmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda ele alınan tüm buğday çeşitlerinde hastalık simptomunun olduğu gözlemlenmiştir.

Şekil 4.12 ‘de görüldüğü gibi Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı’na neden olan etmen. buğday başağının çiçeklenme zamanında giriş yaparak inokulasyondan 7-12 gün sonra başaklarda simptomlar oluşturarak buğday başağında klorofil kaybına neden olmuş ve başaklarda beyazlaşma gözlenmiştir. İnokulasyondan 12-16 gün sonra buğday başakları tamamen beyazlaşmıştır. Buğday çeşitlerinde başaklar üzerinde pembemsi renkte misel gelişimi gözlenmiş, nem oranı yüksek koşullarda bu misel siyahımsı bir renk almıştır. Hastalık etmeni ile inokule edilmiş buğday başağından. inokule edilmemiş başaklara doğru yayıldığı belirlenmiştir. Hastalık ile enfekteli başaklarda teşekkül eden tanelerin küçük ve deforme olduğu bu nedenle de verim kayıplarının ortaya çıktığı belirlenmiştir.



Şekil 4.12. Buğday Başak Yanıklığı etmeni ile inokule edilmiş buğday başakları üzerinde oluşan hastalık simptomları.

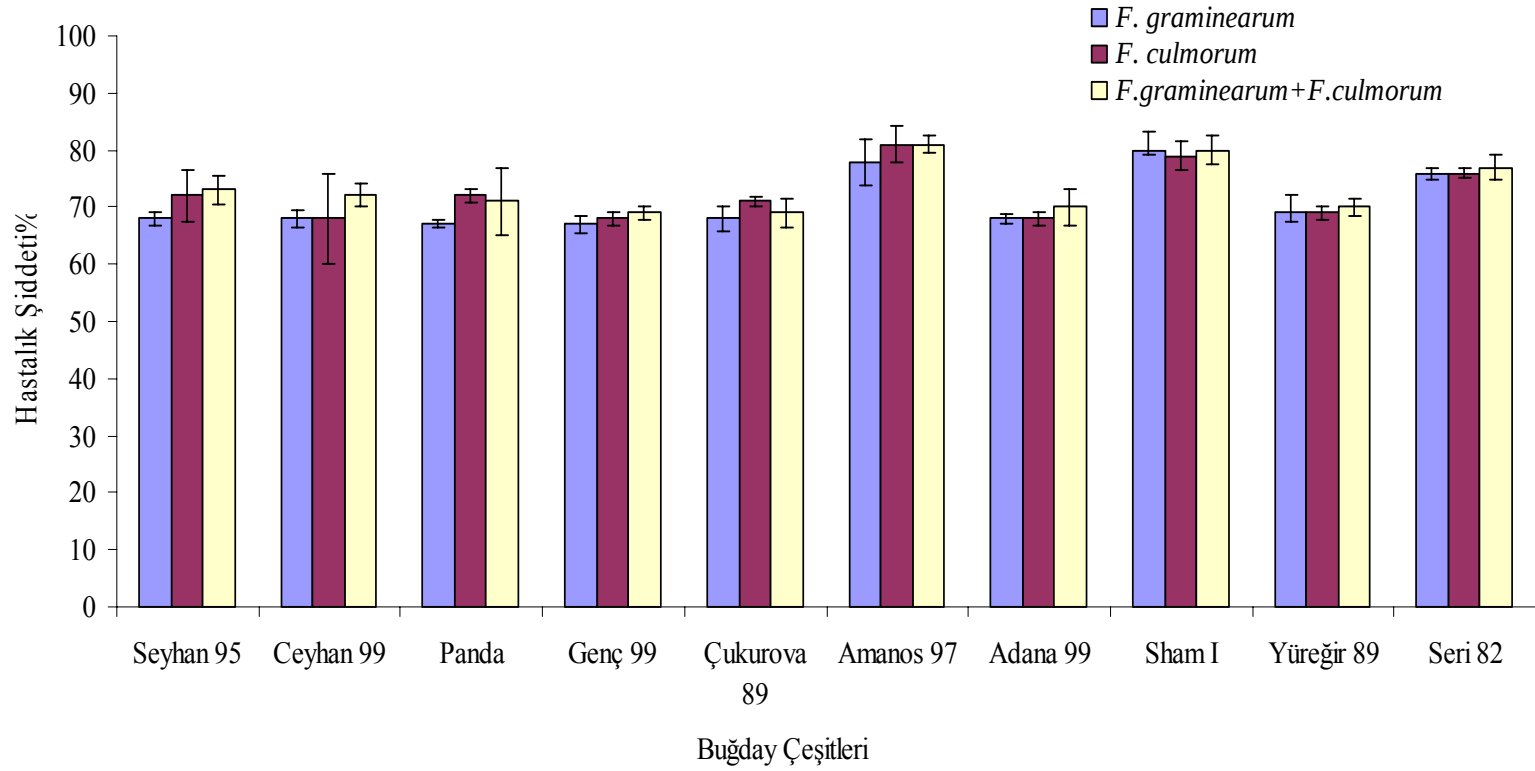
Bai, (1996); Mesterhazy ve ark. (1999)'nın yapmış oldukları çalışmalarda Buğday Başak Yanıklığı etmeni ile inokule edilmiş duyarlı buğday çeşitlerinde inokulasyona uğramamış buğday başaklarında inokulasyondan 4-12 gün sonra hastalık belirtilerinin gözlemlendiği ve bütün başaklarda renk açılması olduğu ifade edilmiştir. Dayanıklı çeşitlerde simptomların inokule edilmeyen başaklarda 12 gün sonra gözlenirken duyarlı çeşitlerde 7-8 gün sonra ortaya çıktığı belirtilmiştir. Duyarlı çeşitlerde başakların infeksiyondan 12 gün sonra tamamen beyazlaştığı bu sürecin çok hızlı bir şekilde geliştiği ifade edilmiştir. Hastalık etmeni ile inokulasyona uğratılmış başaktan inokule edilmemiş başaklara doğru yayılımın çok hızlı, buna karşılık hastalığa dayanıklı buğday çeşitlerinde hastalığın yayılmasının çok yavaş olduğunu bildirmişlerdir. Duyarlı buğday çeşitlerinde başaklar üzerinde pembemsi renkte misel gelişimi gözlenmiş, nem oranı yüksek koşullarda bu misel siyahımsı renk aldığı bildirilmiştir. Dayanıklı buğday çeşitlerinde ise nem oranı yüksek koşullarda başaklar üzerinde misel gelişimi gözlenmediği rapor edilmiştir. Bunun başlıca nedeninin dayanıklı buğday çeşitlerinde misel gelişimini engelleyen bazı metabolitlerin varlığının söz konusu olabileceği ve bu metabolitlerinde fungus gelişimini engelleyeceği düşünülmektedir.

Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın buğday bitkilerini hastalandırma derecesi 0-9 skala yöntemi kullanılarak yapılmış ve hastalık oranı (%) hesaplanmıştır. Çizelge 4.6'da da görüldüğü gibi sera koşullarında yapılan deneme sonuçlarına göre; *F. graminearum*'un A-13 izolatına karşı buğday çeşitleri farklı reaksiyonlar göstermiştir. A-13 izolatına karşı en duyarlı buğday çeşidinin Sham 1 (%80) olduğu, bunu sırasıyla Amanos 97 (%78) ve Seri 82 (%76) buğday çeşitlerinin izlediği gözlemlenmiştir. *F. culmorum*'un B-4 izolatına karşı en duyarlı buğday çeşitlerinin ise sırasıyla Amanos 97 (%81), Sham 1 (%79) ve Seri 82 (%76) olduğu belirlenmiştir. Diğer buğday çeşitlerinin her iki izolata karşı duyarlılıkları arasında büyük farklılıklar tespit edilememiştir. Her üç uygulama sonuçları arasında büyük farklılıklar görülmemiştir (Şekil 4.13).

Çizelge 4.6. Sera koşullarında yetiştirilen buğday çeşitlerinin Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı duyarlılıkları (%)

Buğday Çeşitleri	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i> + <i>F. culmorum</i>	Ortalama
Seyhan 95	68±1.3 c	72±4.53 bc	73±2.65 bc	71.0 C
Ceyhan 99	68±1.44 c	68±8 c	72±2.01 bc	69.3 C
Panda	67±0.79 c	72±1.3 bc	71±5.9 c	70.0 C
Genç 99	67±1.44 c	68±1.3 c	69±1.3 c	68.0 C
Çukurova 86	68±2.2 c	71±0.8 bc	69±2.51 c	69.3 C
Amanos 97	78±4.08 ab	81±3.15 a	81±1.44 a	80.0 A
Adana 99	68±0.75 c	68±1.3 c	70±3.10 c	68.7 C
Sham I	80±0.69 a	79±2.50 a	80±2.4 a	79.7 A
Yüregir 89	69±1.44 c	69±1.3 c	70±1.44c	69.3 C
Seri 82	76±1.25 b	76±0.75 ab	77±2.11 ab	76.3 B
Ortalama	70.9 A	72.4 B	73.2 B	

* Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



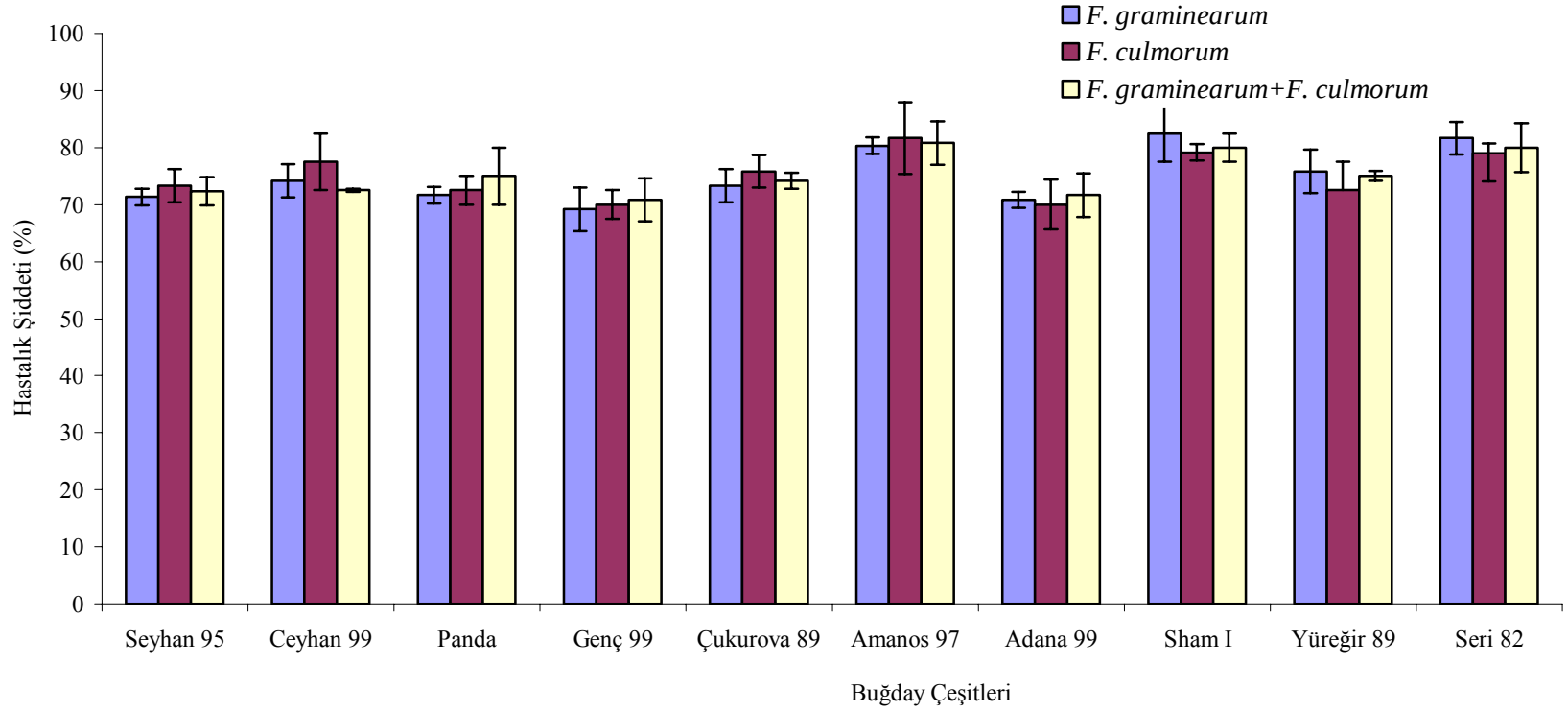
Şekil 4.13. Sera koşullarında yetiştirilen buğday çeşitlerinin Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı duyarlılıkları (%)

Çizelge 4.7’de de görüldüğü gibi saksı koşullarında *F. graminearum* ‘un A-13 izolatına karşı en duyarlı buğday çeşidinin Sham 1 (%83) olduğu, bunu sırasıyla Seri 82 (%81) ve Amantos 97 (%80) buğday çeşidinin izlediği gözlenmiştir. *F. culmorum*’un B-4 izolatına karşı en duyarlı buğday çeşitlerini ise sırasıyla Amantos 97 (%82), Sham 1 (%79) ve Seri 82 (%79) olmuştur. Diğer buğday çeşitlerinin her iki izolata karşı duyarlılıkları arasında çok büyük farklar tespit edilememiş ve uygulamalar arasında da önemli farklar görülmemiştir (Şekil 4.14).

Çizelge 4.7. Saksı koşullarında yetiştirilen buğday çeşitlerinin Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı’na karşı duyarlılıkları (%)

Buğday Çeşitleri	<i>F.graminarum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i> + <i>F. culmorum</i>	Ortalama
Seyhan 95	71±1.15 c	73±2.88 c	72±2.51 c	72 BC
Ceyhan 99	74±2.88 bc	77±5.00 b	72±0.00 c	74 B
Panda	72±1.44 c	72±2.50 c	75±5.00 bc	73 BC
Genç 99	69±3.81 c	70 ±2.50 c	70±3.81 c	70 C
Çukurova 89	73 ±2.88 c	75±2.88 bc	74±1.44 c	74 B
Amantos 97	80±1.44 a	82±6.29 a	81±3.81 a	80 A
Adana 99	71±1.44 c	70±4.33 c	71±3.81 c	70 C
Sham I	83±5.00 a	79±1.44 ab	80±2.50 a	80 A
Yüreğir 89	75±3.81 bc	72±5.00 c	75±00 bc	74 B
Seri 82	81±2.88 a	79±1.67 ab	80±4.33 a	80 A
Ortalama	75 A	75 A	75 A	

* Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre p ≤0.05 hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



Şekil 4.14. Saksı koşullarında yetiştirilen buğday çeşitlerinde Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na duyarlılıkları (%)

Sera ve saksı denemeleri ile yapılan testlerde inokule edilen bütün buğday çeşitlerinde inokulasyondan sonra Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın belirtileri gözlenmiştir. Uygulamaya tabii tutulan tüm buğday çeşitleri başak yanıklık etmenine karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. Yapılan denemelerde, A-13 izolatının buğday çeşitlerini hastalandırması ile B-4 izolatının ve her iki izolatın kombine olarak uygulanmasının buğday çeşitlerini hastalandırması açısından çok büyük bir fark gözlenmezken kontrol bitkilerde hiçbir semptom oluşmamıştır.

Murat-Çavuşoğlu ve Hancıoğlu. (1995). Ankara ili buğday ekim alanlarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nı tespit etmişler ve bu hastalığa karşı dayanıklı buğday çeşidinin olmadığını belirtmişlerdir. Sakarya ili tahıl alanlarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın varlığı rapor edilmiş, fakat hastalığa karşı dayanıklı buğday çeşidinin olmadığı bildirilmiştir (Aktaş ve Tunalı, 1993; Anonymus, 2001). Konya ve çevresinde 1993-1998 yılları arasında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı yoğun bir şekilde saptanmış ve 2000-2001 yılında Konya'da Fusarium Başak Yanıklığı Hastalığı'ndan dolayı oluşan ürün kaybının %31 oranında olduğu bildirilmiştir (Anonymus, 2002). Adana ili ve çevresinde 2001-2002 yıllarında 282.494 hektar buğday alanındaki tüm çeşitlerde özellikle de Kadirli, Kozan ve İmamoğlu civarında buğdayda Başak Yanıklığı Hastalığı'nın varlığı saptanmış ve ticari buğday varyeteleri arasında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı çeşitler belirlenememiştir.

Yapılan bu çalışmada Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın denemede kullanılan bütün buğday çeşitlerinin tanelerinde zarara neden olduğu görülmüştür. Hastalıkla enfekteli buğday tanelerinde buğday çeşitlerine bağlı olarak tanelerde renk açılması, küçülme ve deformasyonlar tespit edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın buğday tanelerinde yapmış olduğu zarar.

Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9'de görüldüğü gibi Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'ndan dolayı buğday çeşitlerinin 100 tane ağırlığında düşüş tespit edilmiştir. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı Sham 1 (%55.40-78.96), Yüreğir 89 (%64.93-79.06), Amanos 97 (%66.13-76.8), Adana 99 (%60.9-77.8) ve Seri 82 (%54.7-78.96) buğday çeşitlerinde en fazla 1000 tane ağırlığı kaybına neden olmuştur. Çizelge 4.8'de sera koşullarında yapılan deneme sonucunda 1000 tane ağırlığı *F. graminearum* uygulamasında en fazla Amanos 97 (%76.8) ve Sham 1 (72.83) buğday çeşitlerinde gözlenmiştir. *F. culmorum* uygulamasında 1000 tane ağırlığı kaybı yine en fazla Sham 1 (%78.96 g) ve Amanos 97 (%71.43) buğday çeşitlerinde tespit edilmiştir. Her iki patojenin birlikte uygulandığı buğday çeşitlerinde en fazla 1000 tane ağırlığı kaybı ise Sham 1 (%79.43) ve Amanos 97 (73.33)'da belirlenmiş ve uygulamalar arasında çok büyük bir farkın olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.16).

Saksı koşullarında yapılan denemeler sonucunda Çizelge 4.9' da da görüldüğü gibi buğday çeşitlerinde 1000 tane ağırlığında azalma oranı *F. graminearum* uygulamasında en fazla Ceyhan 99 (%75.30) ve Seri 82 (%73.06), *F. culmorum* uygulamasında Sham 1 (%69.26) ve Amanos 97 (%68.33), her iki patojenin birlikte uygulandığında ise Yüreğir 89 (%79.06) ve Seri 82 (%78.96) buğday çeşitlerinde belirlenmiş ve uygulamalar arasında çok büyük bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Sera koşullarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın 1000 tane ağırlığına olan etkisi (%)

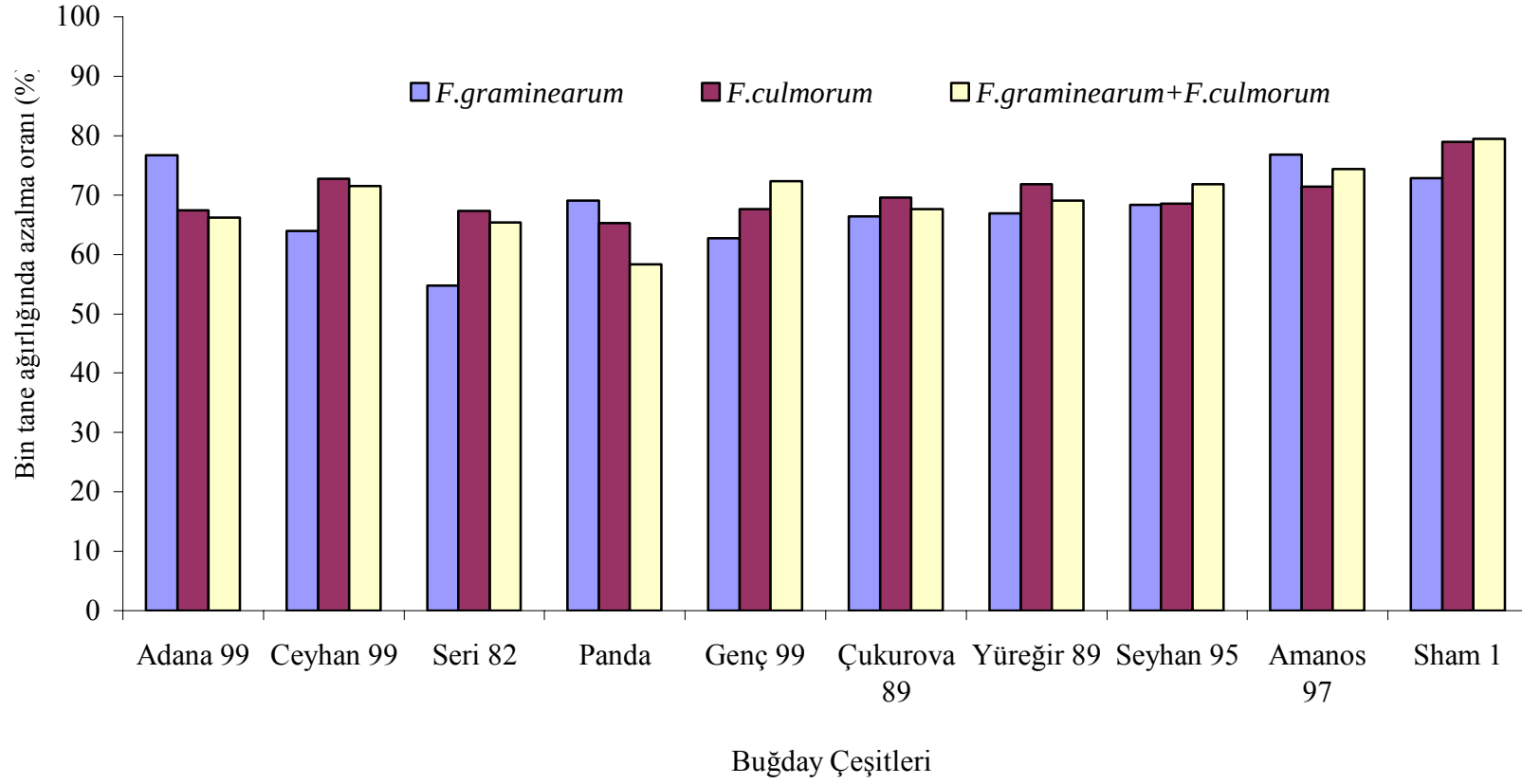
Buğday Çeşitleri	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i> + <i>F. culmorum</i>	Ortalama
Adana 99	76.7±0.76 a	67.46±1.3 bc	66.16±1.4 e	70.11 AB
Ceyhan 99	63.9±2.6 c	72.76±1.5 b	71.53±1.2 bcd	69.40 B
Seri 82	54.7±3.9 d	67.33±2.7 bc	65.36±0.87 e	62.46 C
Panda	69±1.9 bc	65.26±2.5 c	58.33±1.96 f	64.20 C
Genç 99	62.73±0.70 c	67.60±1.7 bc	72.30±1.4 bc	67.54 BC
Çukurova 89	66.36±2.2 bc	69.60±1.0 bc	67.66±1.3 de	67.87 BC
Yüreğir 89	66.86±2.7 bc	71.80±1.8 b	69.03±1.7 cde	69.23 B
Seyhan 95	68.33±0.37 bc	68.50±0.6 bc	71.80±1.1 bcd	69.54 B
Amanos 97	76.86±1.07 a	71.43±0.4 b	74.33±0.64b	74.21 AB
Sham 1	72.83±1.1 ab	78.96±0.63 a	79.43±0.88 a	77.07 A
Ortalama	67.83 B	70.07 A	69.59 A	

* Aynı sütün içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

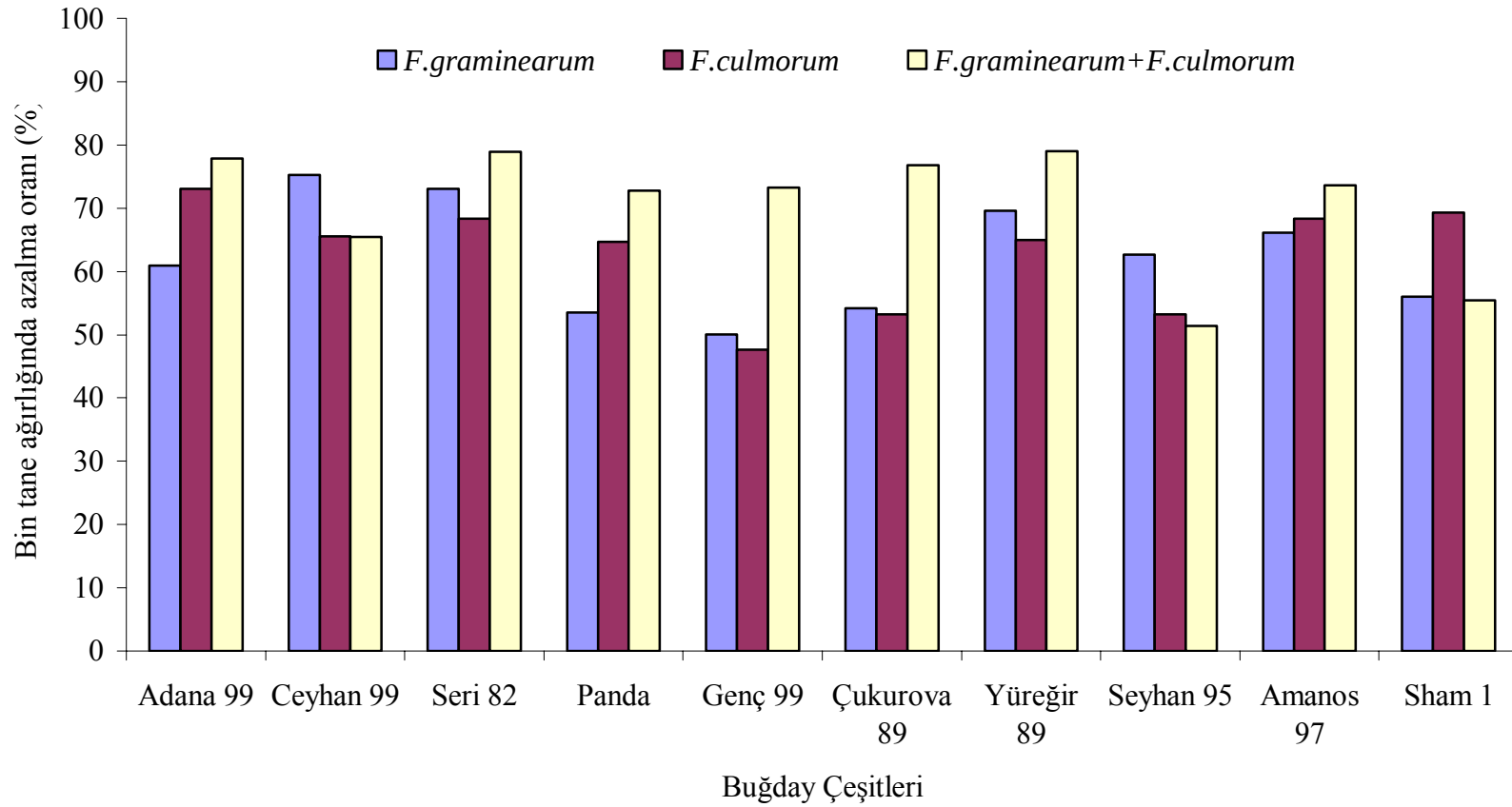
Çizelge 4.9. Saksı koşullarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın 1000 tane ağırlığına olan etkisi (%)

Buğday Çeşitleri	<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i> + <i>F. culmorum</i>	Ortalama
Adana 99	60.90±1.2 def	73.03±0.8 a	77.83±1.1 ab	70.59 A
Ceyhan 99	75.30±0.8 a	65.53±4.5 a	65.46±0.47 d	68.76 AB
Seri 82	73.06±0.8 ab	68.36±1.1 a	78.96±1.0 a	73.46 A
Panda	53.56±1.4 g	64.63±1.9 a	72.76±0.9 c	63.65 B
Genç 99	50.06±1.47 g	47.60±1.75 b	73.23±2.1 bc	56.96 C
Çukurova 89	54.23±3.4 fg	53.26±2.7 b	76.76±2.0 abc	61.42 B
Yüreğir 89	69.56±4.6 abc	64.93±1.2 a	79.06±1.0 a	71.18 A
Seyhan 95	62.66±2.6 cde	53.23±8.04 b	51.36±2.8 e	55.75 C
Amanos 97	66.13±0.78 bcd	68.33±0.99 a	73.63±0.65 bc	69.36 AB
Sham 1	56.06±1.29 efg	69.26±0.94 a	55.40±1.0 e	60.24 BC
Ortalama	62.152 B	62.816 B	70.445 A	

* Aynı sütün içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



Şekil 4. 16. Sera koşullarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın 1000 tane ağırlığına olan etkisi (%)



Şekil 4.17. Saksı koşullarında Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nın 1000 tane ağırlığına olan etkisi (%)

Yapılan istatistiki analizler sonucunda hastalıklı bitkilerden elde edilen tanelerin 1000 tane ağırlıklarında azalma oranının istatistiki olarak önemli olduğu saptanmıştır. Benzer sonuçlar, Walker (2001), ve Bai (1996) tarafından yapılan çalışmalarda da tespit edilmiştir. Mesterhazy ve ark., (1999); Miedaner ve ark., (2001), Gilbert ve ark., (2001) yapmış oldukları çalışmalarda Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na duyarlı çeşitlerde başak içerisinde çok zayıf taneler oluştuğunu ya da hiç oluşmadığını, oluşan tanelerde ise şekil bozukluklarının olduğunu belirlemişlerdir.

4.5. Olgunlaşmış ve Olgunlaşmamış Buğday Embriyolarının Kültürü ve Embriyogenik Kalluslarının Elde Edilmesi

In vitro seleksiyonda kullanılacak buğday çeşitlerini belirlemek amacıyla yapılan sera ve saksı denemelerinde buğday çeşitlerinin *F. graminearum* A-13 ve *F. culmorum* B-4 izolatına karşı göstermiş oldukları tepkilere göre Adana 99, Genç 99 ve Seri 82 buğday çeşitlerinin başaklarından tozlanmadan 14, 16, ve 18 gün sonra olgunlaşmamış tanelerden çıkarılmış embriyolar ile olgunlaşmış buğday tanelerinden alınan olgun embriyolar embriyogenik kallus elde etmek amacıyla %3 sakkaroz, 2 mg/L 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Buğday çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen kallus oluşum oranları %1 ile %92 oranında değişmiştir. Kallus oluşum oranlarıyla ilgili sonuçlar Çizelge 4.10, Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Buğday çeşitlerinin çiçeklenmeden sonra farklı zamanlarda kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolarından ve olgunlaşmamış tanelerinden % 3 sakkaroz+2 mg/L 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmasından 4 hafta sonra (Şekil 4.18, Şekil 4.19) kalluslar elde edilmiştir. Embriyogenik kallus elde etmek için kültüre alınan olgunlaşmamış buğday embriyolarının ve olgunlaşmamış buğday

tanelerinin döllenmenin gerçekleşmesinden sonra kültüre alındıkları gün embriyogenik kallus oluşumunda önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle döllenmenin gerçekleşmesinden itibaren 14., 16., 18. günlerinde alınan buğday çeşitlerinin olgunlaşmamış embriyoları ve olgunlaşmamış buğday tanelerinin 2 mg/L 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Kültüre alma işleminden 4 hafta sonra yapılan gözlemler sonucunda kallus oluşum oranları olgunlaşmamış embriyolarda % 45-92 oranında değişirken (Çizelge 4.10), olgunlaşmamış tanelerde kallus oluşumu ise % 3-20 arasında (Çizelge 4.11) değişim göstermiştir.

Kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolardan en fazla kallus oluşumu 18. günde, kültüre alınan % 92 ile Genç 99 ve % 84 ile Adana 99 çeşidinde olmuştur. Ortalama kallus oluşum oranı % 68 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). Embriyogenik kalluslar elde etmek amacıyla % 3 sakkaroz, 2 mg/L 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan olgunlaşmamış buğday tanelerinden 4 hafta sonra kalluslar elde edilmiştir. En fazla kallus oluşumu % 20 ile 18. günde kültüre alınan Seri 82 çeşidinin olgunlaşmamış tanelerinden elde edilmiştir (Çizelge 4.11).

Fennel ve ark., (1996), 3 farklı ortam üzerinde kültüre alınan 48 buğday çeşidinin olgunlaşmamış embriyolarından en fazla embriyogenik kallus oluşumu 2 mg/L 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde gözlemlemişlerdir. Kasem ve ark., (1996); Yang ve ark., (1998)'da yapmış oldukları bir çalışmada olgunlaşmamış buğday embriyolarından 2 mg/L 2.4-D içeren MS ortamı üzerinde kalluslar elde etmişlerdir.

En yüksek kallus oluşumu döllenmeden sonra 16. günde kültüre alınan Genç 99 çeşidi ile 18. günde kültüre alınan Genç 99 ve Adana 99 çeşitlerinde gözlenmiştir. Genel olarak bütün çeşitlerde en yüksek kallus oluşumu döllenmeden sonra 16. ve 18. günlerde kültüre alınan embriyolardan elde edilmiştir. Olgunlaşmamış embriyolarda embriyoların gelişim safhası embriyogenik kallus oluşumu için en önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle embriyoların uygun dönemde kültüre alınması gerektiği vurgulanmaktadır. Bozorgipour ve Snape (1997); Gonzales ve ark., (2001); Arun ve ark., (2003); Pellegrineschi ve ark., (2004). döllenmeyi takiben 14-22 günler arasında kültüre alınan olgunlaşmamış buğday embriyolarından embriyogenik kalluslar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.10. Olgunlaşmamış buğday embriyolarından kallus teşviki (gün).

Çeşit	Kallus sayısı (100 adet embriyodan)		
	14.gün	16.gün	18.gün
Adana 99	45 b	62 b	84 b
Genç 99	71 a	76 a	92 a
Seri 82	48 b	66 a	75 c

* Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farksızdır.

Çizelge 4.11. Olgunlaşmamış buğday tanelerinden kallus teşviki (günlere göre)

Çeşit	Kallus sayısı (100 buğday tanesinden)		
	14.gün	16.gün	18.gün
Adana 99	3 a	9 a	9 b
Genç 99	3 a	8 a	9 b
Seri 82	4 a	9 a	20 a

* Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farksızdır.

Çizelge 4.12. Olgunlaşmış buğday embriyolarından kallus teşviki

Çeşit	Kallus sayısı (100 adet embriyodan)
Adana 99	70 a
Genç 99	58 ab
Seri 82	62 ab

* Benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farksızdır.

Yapmış olduğumuz çalışmada da döllenmeden sonraki 16. ve 18. günlerde kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolardan ve olgunlaşmamış tanelerden kallus oluşumu bakımından iyi sonuç alınması, daha önceden verilen bulgularla uyum içerisinde olunduğunun bir göstergesidir.

Embriyogenik kallus oluşturmak amacıyla Adana 99, Genç 99 ve Seri 82 hexaploid buğday çeşitlerinin olgunlaşmış embriyolarından kallus elde etmek amacıyla embriyolar 4 mg/L 2.4-D içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınmıştır. Kültüre alınan olgunlaşmış embriyolardan kültüre alınmalarından 4 hafta sonra embriyogenik kalluslar elde edilmiştir (Şekil 4.20). Çizelge 4. 12’de de görüldüğü gibi 2.4-D içeren MS ortamlar üzerinde kültüre alınan 3 farklı buğday çeşidinin olgun embriyolarından oluşan kallusların gelişim oranı %57-70 arasında değişim göstermiştir. Kallus oluşturmeyen olgun embriyoların birçoğunun sürgün oluşturduğu görülmüştür. 2.4-D içermeyen kontrol ortamı üzerinde kültüre alınan embriyolardan ise kallus gelişimi gözlenmemiştir. Buğday çeşitlerinin olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyoları ile süt olum döneminde olan buğday taneleri kallus teşviki için kültüre alınmalarından 4 hafta sonra taneler ve embriyolar üzerinde oluşan embriyogenik kalluslar embriyo ve tanelerden ayrılarak yeniden kallus ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır. Kallus oluşturmeyen embriyolar yine aynı ortamlar üzerinde altkültüre alındıkları halde herhangi bir kallus gelişimi görülmemiş ve zamanla kahverengileşerek canlılıklarını kaybetmişlerdir.

Daha önce yapılan çalışmalarda olgun buğday embriyolarından embriyogenik kalluslar elde edilmesinde başarı ölçütleri düşük seviyede kalmıştır. Bu nedenle. bir çok araştırmacı embriyogenik kallus elde etmek için olgunlaşmamış embriyoları kullanmışlardır (Ahlowalia, 1982; Ivanov ve ark., 1998; Machii ve ark., 1998; He ve Lazzeri, 2001; Pellegrineschi ve ark., 2004). Wu ve ark. (2003), buğdayın olgun ve olgunlaşmamış embriyolarıyla, değişik gövde parçalarını kallus oluşturmak için kültüre aldıklarında genotiplere bağlı olarak en yüksek oranda embriyogenik kallusları olgunlaşmamış embriyolardan elde ettiklerini bildirmişlerdir. He ve Lazzeri (2001), buğdayda embriyogenik kallusların elde edilmesinde eksplant ve ortam içeriğinin bu kalluslardan bitki regenerasyonunda çok önemli olduğunu ifade etmişlerdir.



Şekil 4.18. Kallus ortamı üzerinde kültüre alınmış olgunlaşmamış buğday embriyolarından oluşan hızlı gelişen kırılğan ve beyaza yakın renkteki embriyogenik kalluslar



Şekil 4.19: Seri 82 buğday çeşidi olgunlaşmamış tanelerinin 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınmaları ve kallus oluşumu.



Şekil 4.20. Seri 82 buğday çeşidinin olgunlaşmış embriyolarının 2,4-D içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınması ile kallus

Bu nedenle bir çok araştırmacı kallus eldesinde eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış embriyoları kullanmışlardır (Gu ve Liang, 1997; Vasi ve ark., 1990; Nehra ve ark., 1994; Benkirane ve ark., 2000). Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre olgun embriyolardan kallus oluşumu çeşitlere göre %62-70 oranında değişim gösterirken, olgunlaşmamış embriyolardan kallus oluşum oranı %45-92 arasında olmuştur. Olgunlaşmamış embriyolardan embriyogenik kallus olgunlaşmış embriyolardan elde edilen embriyonik kalluslara oranla daha fazla olmuştur.

Olgun embriyolardan kallus oluşumunu arttırmak için ortamlara ilave edilen 2.4-D konsantrasyonu artırılmıştır. Özgen ve ark., (2001) ile Delporte ve ark., (2001)'nin yapmış oldukları çalışmalarda olgun buğday embriyolardan kallus elde etmek için daha yüksek konsantrasyonda 2.4-D kullandıklarını bildirmişlerdir.

Kültüre alınan olgunlaşmamış ve olgunlaşmış embriyolar ile olgunlaşmamış buğday tanelerinden embriyogenik ve embriyogenik olmayan iki tip kallus oluşumu gözlenmiştir. Embriyogenik kalluslar şeffaf beyazımsı renkte, çabuk dağılan, kırılgan ve hızlı gelişen bir yapıya sahip olduğu ve globular embriyolar içerdiği belirlenmiştir. Bu tür kallusların embriyogenik kapasiteye sahip olmalarının en önemli göstergesi kültüre alındıkları ortam üzerinde hızlı gelişmeleri olmuştur. Embriyogenik olmayan kalluslar ise beyaz, ıslak görünümlü ve gevrek yapıda olduğu görülmüştür (Vasi ve ark., 1990; Yang ve ark., 1998; Arun ve ark., 2004). Yapılan çalışmada farklı buğday çeşitlerinden elde edilen kalluslardan kırılgan hızlı gelişen embriyogenik kallusların seçimi bu şekilde kolaylaşmıştır.

4.6. Embriyogenik Buğday Kalluslarından Bitki Regenerasyonu

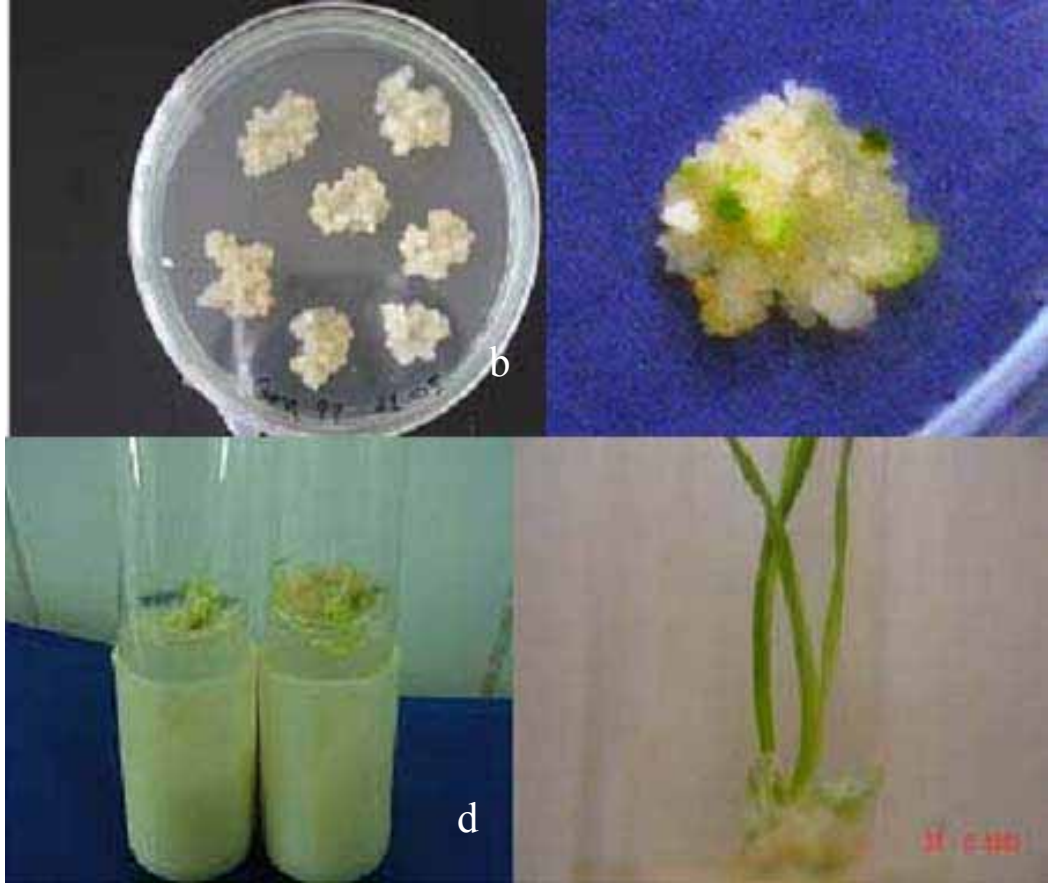
Olgunlaşmamış ve olgunlaşmış buğday embriyolarından gelişen embriyogenik kalluslardan bitki regenerasyonunu gerçekleştirmek için kalluslar farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda IAA, BAP ve zeatin içeren MS ortamları üzerinde kültüre alınmışlardır. Kalluslardan oluşan % bitki regenerasyonu ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Genç 99 buğday çeşidinin embriyogenik kalluslarının kültüre alındığı regenerasyon ortamları ve regenerasyon oranı.

Regenerasyon ortamları	Regenerasyon oranı %
MS+0.1 mg/L IAA+1 mg/L BAP+1 mg/L kinetin+%3 sakkaroz	20.5 b
MS+0.5 mg/L IAA+1 mg/L BAP+ %2 sakkaroz	32.2 a
MS+ 1 mg/L IAA+ 1 mg/L zeatin+%3 sakkaroz	26.5 ab

* Benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

Çizelge 4.13’ de görüldüğü gibi. Genç 99 buğday çeşidinden elde edilen embriyogenik kalluslar 0.5 mg/L IAA+1 mg/L BAP+ %2 sakkaroz içeren MS ortamı üzerinde bitki regenerasyonuna doğru daha fazla yönelmişlerdir. Diğer ortamlar üzerinde ise embriyogenik kalluslardan düşük oranlarda bitki regenerasyonu gözlenmiştir. En yüksek bitki regenerasyonu oranı % 32 ile MS+0.5 mg/L IAA+1 mg/L BAP+ %2 sakkaroz içeren ortam üzerinde meydana gelmiştir. Bunu sırasıyla MS+ 1 mg/L IAA+ 1 mg/L zeatin+%3 sakkaroz içeren ortam ile MS+0.1 mg/L IAA+1 mg/L BAP+1 mg/L kinetin+%3 sakkaroz içeren ortamlar izlemiştir. Bitki regenerasyonu için kültüre alınan bu kalluslardan kültüre alınmalarından yaklaşık 2-3 hafta sonra kalluslar üzerinde yeşil embriyoidler oluşmuş ve daha sonra bitkicikler meydana gelmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Genç 99 buğday çeşidi olgunlaşmamış embriyolarından elde edilen embriyogenik kallusların MS+0.5 mg/L IAA+1 mg/L BAP+ %2 sakkaroz içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınması ve bitki regenerasyonu (a. b. c. d).

Jimenes ve Bangerth (2001), buğday kalluslarından farklılaşmayı teşvik etmede kültür şartlarının (ortam içerisindeki besin maddelerinin) etkili olduğunu belirtmişler ve ortama ilave edilen oksinlerin bitki regenerasyonunu olumlu yönde etkilediğini tespit etmişlerdir.

He ve Lazeri (2001) buğday kalluslarında kullanılan eksplant ve ortam içeriğinin bitki regenerasyonunda çok önemli olduğunu ifade etmişlerdir. Bu nedenle embriyogenik kallus elde etmek için eksplant kaynağı olarak olgunlaşmamış embriyoları kullanmışlardır. Ayrıca buğday kalluslarından bitki regenerasyonunda oksinlerin çok önemli bir faktör olduğunu ve bu nedenle kallus aşamasında 2.4-D kullanıldığını ifade etmişlerdir. Bu araştırmacılar ayrıca bitki regenerasyonunda buğday genotipinin de önemli bir rolü olduğunu ifade etmişlerdir. Vasi ve ark., (1990);

Ivanov ve ark., (1998); Machii ve ark., (1998), embriyogenik buğday kalluslarından bitki regenerasyonunu gerçekleştirmek için kallusları farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda hormonlar içeren besi ortamları üzerinde kültüre almışlardır. Jimenez ve Bangerth (2001), her eksplantın farklı konsantrasyonlarda endogenik hormon içerdiklerini belirtmişler ve bu nedenle regenerasyon ortamı içerisine farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda hormonlar ilave edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Gonzales ve ark., (2001) buğday kalluslarından regenerasyonun buğday genotipine bağlı olduğunu ve bitki regenerasyonunda kullanılan ortamında regenerasyonda etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada regenerasyon ortamı içerisine düşük konsantrasyonlarda IAA, BAP, zeatin gibi hormonlar ilave edilmiş ve bu hormonlarında bitki regenerasyonunda etkili olduğu saptanmıştır.

Regenere olan bitkiler daha sonra $\frac{1}{2}$ MS+1 mg/L NAA+ %2 sakkaroz içeren ortamlar üzerinde kültüre alınarak kök oluşumu teşvik edilmiştir. Bu şekilde köklenen bitkiler daha sonra toprak:kum:çiftlik gübresi karışımı içeren saksılara aktarılmış ve bitkiler polietilen plastik bir torba ile kapatılarak 10 gün süre ile nemli koşullar altında 22 ± 2 °C’de tutulmuştur. Daha sonra torbalar açılarak bitkinin doğal koşullara adaptasyonları sağlanmıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Genç 99 buğday çeşidinin embriyogenik kalluslarından bitki regenerasyonu (a-b) ve doğal koşullara adaptasyonu (c-d).

4.7. *F. graminearum* ve *F. culmorum* Optimum Kültür Filtratı Konsantrasyonlarının Bitkiler Kullanılarak Saptanması

Homojen bir seleksiyon yapmak için *F. graminearum* A-13 ve *F. culmorum* B-4 izolatlarının belirli oranlarda sulandırılmış kültür filtratları, değişik bitkiler üzerinde denenmiş ve alınan Çizelge 4.14ve Çizelge 15’de verilmiştir.

Çizelge 4.14. Farklı oranlarda sulandırılmış kültür filtratlarının domates (*L. esculantum* L.) fidelerinde oluşturduğu hastalık şiddeti (%)

Kültür filtratı sulandırma oranı	Kültür filtratının test bitkilerini hastalandırma yüzdesi	
	<i>F. culmorum</i> (B-4)	<i>F. graminearum</i> (A-13)
1/10	82.5±0.54 a	73.3±0.54 a
1/20	82.5±0.54 a	66.7±0.0 b
1/30	70±0.54 b	60.0±0.54 c
1/40	62.5±0.0 b	57.8±0.44 c
1/50	57.5±0.54 c	46.7±0.44 d
1/60	42.5±0.54 c	26.7±0.54 e
1/70	27.5±0.44 d	24.4±0.44 ef
1/80	20±0.44 e	20.0 ±0.44 f
1/90	12.5±0.0 f	11.1±0.0 g
1/100	12.5±0.0 f	11.1±0.0 j
Kontrol	0±0.0 g	0.0±0.0 k

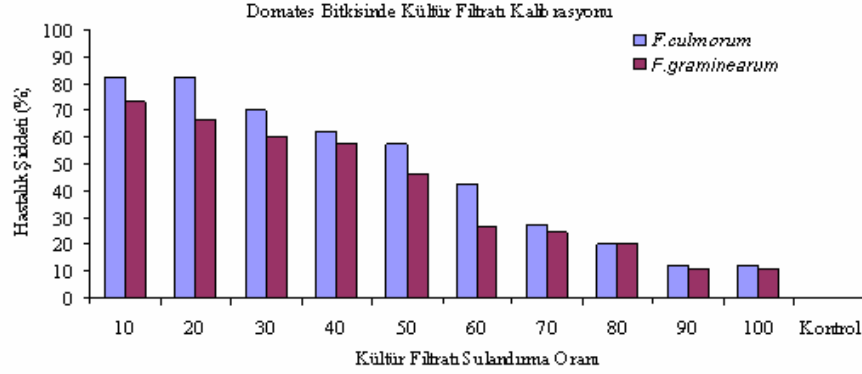
* Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

Kullanılan domates fidelerinde farklı oranlarda sulandırılan kültür filtratının bitkileri hastalandırma derecelerinde farklılıklar gözlenmiştir. Kültür filtratının 1/10. 1/20. 1/30 sulandırmaları bitkiler üzerinde şiddetli öldürücü etkiye sahip olmuştur (Çizelge 4.14). Domates fideleri 1/50 ve 1/60 sulandırmalarda hafif ve orta derecelerde yan yatarak solma ve pörsüme şeklinde reaksiyon göstermişlerdir. Kültür filtratı konsantrasyonlarının domates fidelerinde oluşturduğu simptomlar Şekil 4.23’de görülmektedir.

En uygun LD₅₀ değerini belirlemek amacıyla domatesin bitki materyali olarak kullanıldığı araştırmada en uygun *F. graminearum* kültür filtratı konsantrasyonunun 1/50 sulandırması olduğu belirlenmiştir. *F. culmorum*’ dan elde edilen kültür filtratının 1/50. 1/60 ve 1/70 sulandırma oranlarında LD₅₀ değeri arasında farklılıklar saptanmıştır. En uygun kültür filtratı sulandırma oranının *F. graminearum*’da olduğu gibi 1/50 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



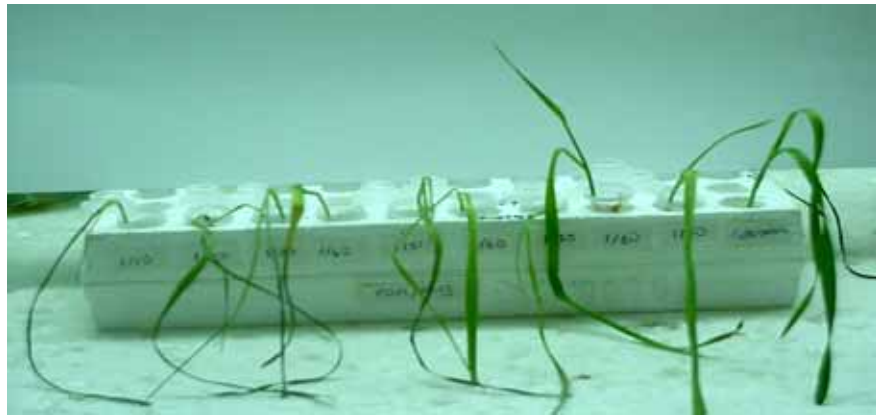
Şekil 4.23. *F. culmorum*’un 1/10. 1/20. 1/30. 1/40. 1/50. 1/60. 1/70. 1/80. 1/90. 1/100 oranlarında sulandırılmış kültür filtratının domates (*L. esculantum* L.) fideleri üzerinde oluşturduğu simptomların uygulamadan 24 saat sonraki görünüşleri.



Şekil 4.24. Farklı oranlarda sulandırılmış kültür filtratlarının domates (*L. esculantum* L.) fidelerinde oluşturduğu hastalık şiddeti.

Nachmias ve ark., (1977) fungus toksinlerinin avakado, salatalık ve domates gibi geniş bir konukçu dizisi üzerinde semptomlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Nadel ve Spiegel-Roy (1997) yaptıkları çalışmada fungus toksinin LD₅₀ değerini ortaya koymak için 10-14 günlük salatalık fidelerini kullanmışlar ve toksik etkiyi LD₇₀ olarak belirledikten sonra bu değeri direk olarak toksine dayanıklı kallusların seleksiyonu için kullandıklarını bildirmişlerdir.

Araştırmada kullanılan buğday bitkileri üzerinde de domates bitkileri üzerinde yapılan testin sonuçlarına benzer semptomlara neden olan kültür filtratının 1/10, 1/20 ve 1/30 sulandırmada buğday bitkilerinde tamamen solgunluk ve pörsümeye neden olmuştur (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. *F. culmorum*'un 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/90, 1/100 oranlarında sulandırılmış kültür filtratının buğday bitkileri (*T. aestivum* cv. Seri 82) üzerinde oluşturduğu semptomlar.

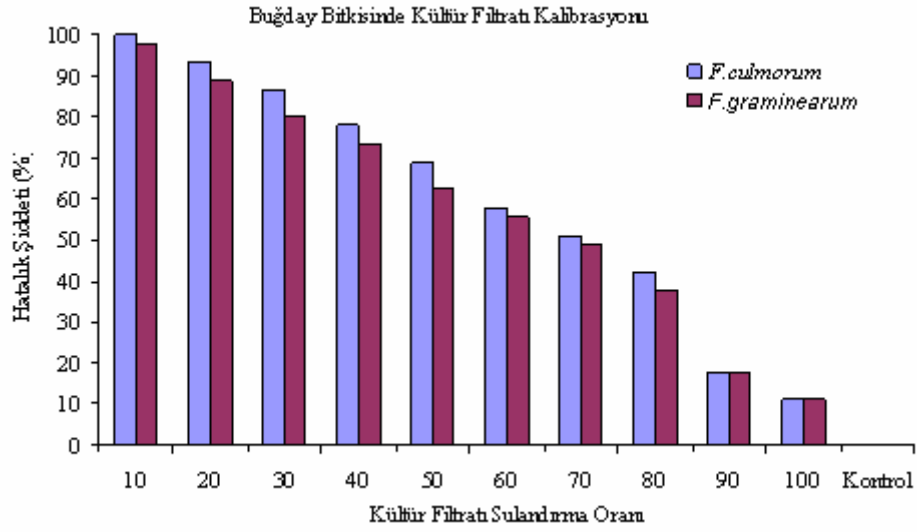
Kültür filtratının 1/50 sulandırma oranında oluşan belirtiler orta derecede solgunluk ve pörsümeye neden olsa da, bitkiler şiddetli olarak etkilenmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda LD₅₀ değerinin 1/60 sulandırma oranında olması gerektiği sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Farklı oranlarda sulandırılmış kültür filtratlarının Seri 82 buğday (*T.aestivum* L.) fidelerinde oluşturduğu hastalık şiddeti (%).

Kültür filtratı sulandırma oranı	Kültür filtratının test bitkilerini hastalandırma yüzdesi	
	<i>F. culmorum</i> (B-4)	<i>F. graminearum</i> (A-13)
1/10	100±0.0 a	97.8±0.47 a
1/20	93.3±0.54 a	88.9±0.0 b
1/30	86.7±0.44 b	80.0±0.2 c
1/40	77.8±0.0 c	73.3±0.24 d
1/50	68.9±0.44 d	62.5±0.24 e
1/60	57.8±0.44 e	55.6±0.0 f
1/70	51.1±0.54 f	48.9±0.24 g
1/80	42.2±0.44 g	37.8±0.24 h
1/90	17.8±0.54 h	17.8±0.24 i
1/100	11.1±0.0 h	11.1±0.0 j
Kontrol	0±0.0 h	0.0±0.0 k

*Aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

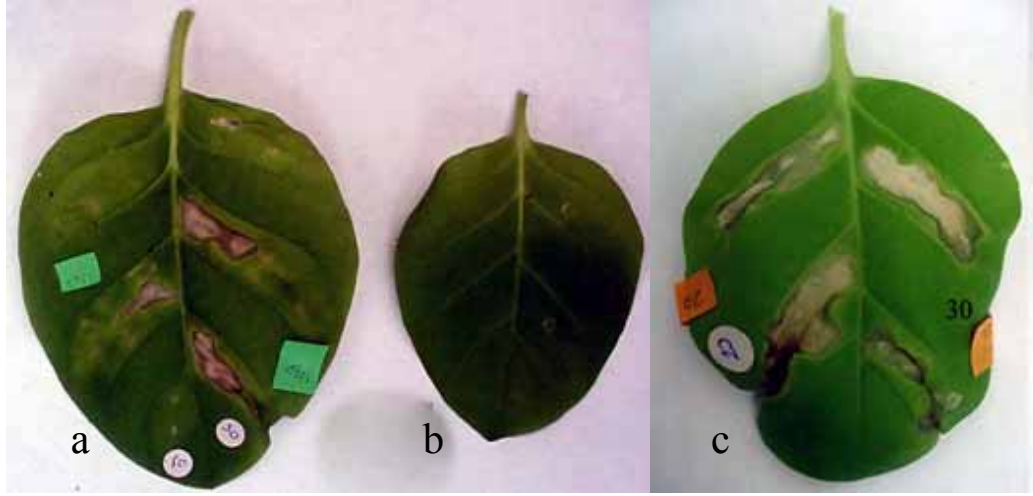
Kültür filtratının 1/60, 1/70 ve 1/80 sulandırmalarında solgunluk ve pörsüme belirtileri çok şiddetli olmamış, 1/90 ve 1/100 oranında sulandırmalarda ise buğdayda çok hafif solgunluk belirtileri görünse de bitki çok fazla bundan etkilenmemiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Farklı oranlarda sulandırılmış kültür filtratlarının buğday (*T.aestivum* L.) fidelerinde oluşturduğu % hastalık şiddeti.

Chawla ve Wenzel (1987). buğday yapraklarının 0.5 mM saf Fusarium toksinine lokal nekrozlar, solgunluklar ve yapraklarda kuruma şeklinde reaksiyonlar göstererek 60 saat içinde symptomların ortaya çıktığını gözlemlemişlerdir. Bu bulgular elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik taşımaktadır.

Araştırmada *F. graminearum* ve *F. culmorum*' dan elde edilen kültür filtratının 1/10, 1/20, 1/30 ve 1/40 oranlarda sulandırmalarına karşı tütün yaprakları farklı reaksiyonlar göstermiştir. Şekil 4.27'de de görüldüğü gibi kültür filtratı uygulamasından 7 gün sonra tütün yapraklarında nekrozlar gözlenmiştir. Bu nedenle, herhangi bir toksinin etkinliğinin araştırıldığı bir araştırmada aynı bitki türlerinde bile çok geniş değişkenlik olduğu için çok geniş bitki çeşidinde kültür filtratı denemelerinin yapılması gerektiği sonucunu ortaya çıkmaktadır.



Şekil 4.27. *F. graminearum* ve *F. culmorum*'dan elde edilen kültür filtratının tütün yaprakları üzerinde a: *F. graminearum* kültür filtratının 1/30 (yaprığın sağ ayası) ve 1/40 (yaprığın sol ayası). b: Kontrol (destile su uygulaması). c: *F. culmorum* kültür filtratının 1/20 (yaprığın sağ ayası) ve 1/30 (yaprığın sol ayası) oranındaki uygulamadan 5 gün sonra. oluşturdukları belirtiler.

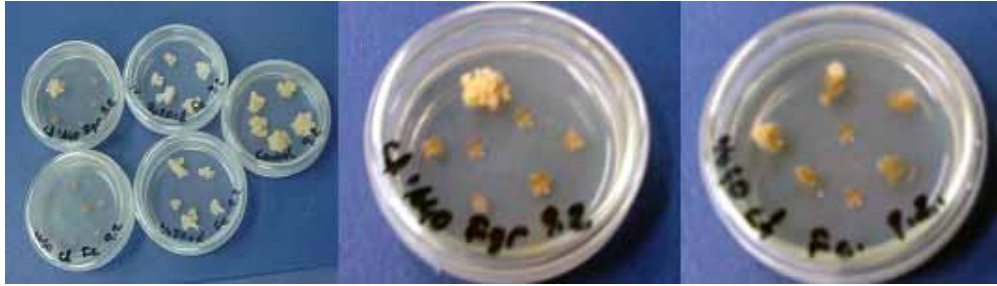
4.8. *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un Optimum Kültür Filtratı Konsantrasyonları ile Fusarik Asit Konsantrasyonunun Kalluslar Kullanılarak Saptanması

F. graminearum A-13 ve *F. culmorum* B-4 izolatlarından hazırlanan kültür filtratı %10, %20, %30, %40 ve %50 oranlarında sulandırılarak hazırlanmış konsantrasyonları kallus ortamlarına ilave edilmiş ve üzerinde gelişen kallusların büyüme oranları Çizelge 4.16'da verilmiştir. Kallusların gelişiminde kontrol ile 1/10 ve 1/20 oranlarında kültür filtratı içeren ortamlar üzerinde fazla bir farklılık tespit edilmemiştir. 1/30 ve 1/40 oranında kültür filtrat içeren ortam üzerinde gelişen kallusların büyük bir kısmında kahverengileşme ve ölüm gözlenirken bir kısmında ise gelişme tespit edilmiştir. Kültür filtratının %50 oranında olduğu ortamlar üzerinde ise kallusların tamamında kahverengileşme ve ölüm gözlenmiştir (Şekil 4.28). Bu sonuçlar doğrultusunda *in vitro* seleksiyon için en uygun kültür filtratı konsantrasyonunun %30 olması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.16. Genç 99 buğday çeşidi embriyolarından elde edilen embriyogenik kalluslarının farklı oranlarda *F. culmorum* kültür filtratını içeren MS ortamı üzerindeki gelişme oranları.

<i>F. culmorum</i> kültür filtrat konsantrasyonu	Skala değerleri (ortalama)
%50	5.0 a
%40	4.3 b
%30	2.5 c
%20	1.5 d
%10	1.0 e
Kontrol	1.0 e

* Benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



Şekil 4.28. Genç 99 buğday çeşidi embriyogenik kalluslarının MS+2mg/L 2.4-D + %2 sakkaroz + farklı oranlarda *F. culmorum* kültür filtratı içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınması ile *in vitro* seleksiyonu.

Kasem ve ark. (1991), toksin içeren ortamlar üzerinde kültüre alınan kallusların gelişimlerinin engellendiğini bildirmişlerdir. Kasem ve ark., (1996) yaptıkları bir çalışmada *F. graminearum* kültür filtratı (%30) içeren kallus ortamının buğday genotipine bağlı olarak fungusun toksik metabolitlerine dayanıklı kallusların seçimi için uygun olduğunu. %10 ve %20 konsantrasyonlarda kültür filtratı içeren kallus ortamlarında ise kallusların canlı kaldıklarını belirtmişlerdir. Jin ve ark. (1996), soya fasülyesi kalluslarını değişik konsantrasyonlarda (1:100, 1:75, 1:50 ve

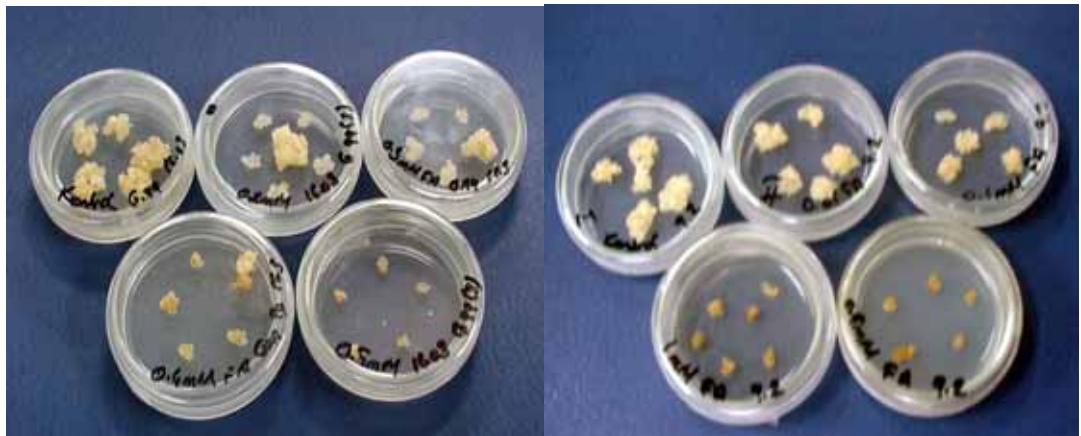
1:25) *F. solani* kültür filtratı içeren ortamlar üzerinde kültüre alarak kültür filtratı konsantrasyonlarının kallus gelişimi üzerine olan etkilerini araştırmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda en fazla kallus kahverengileşmesinin, 1:25 kültür filtratı içeren ortam üzerinde gerçekleştiği belirlenmiş ve *Fusarium* metabolitleri içeren seçici ortamlar üzerinde kallus gelişiminin engellendiğini gözlemlemişlerdir. Badea ve ark. (1997), Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan *F. graminearum*'dan elde edilen kültür filtratına karşı buğday kalluslarından hastalığa dayanıklı bitki elde etmek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Çalışmada buğday kallusları %10, %20 ve %40 oranlarında kültür filtratı ilave edilmiş kallus ortamı üzerinde kültüre alınmışlardır. Buğday kallusları %10 ve %20 kültür filtratı içeren ortamlar üzerinde kalluslarda gelişmenin olduğu, düşük konsantrasyonlarda uygulanan kültür filtratı nedeniyle buğday kalluslarında kitinaz enziminin artmasıyla embriyogenik kallus oluşumunda pozitif bir etkinin olduğu belirlenmiştir. Daha yüksek kültür filtratı konsantrasyonu (%40) içeren ortam üzerinde kallus gelişiminde daha az gelişme ve büyük oranda ölümlerin olduğu gözlemlenmiştir.

In vitro seleksiyonunda 2. selektif ajan olarak kullanılması öngörülen Fusarik asit 0, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 mM konsantrasyonlarda ortama ilave edilmiş ve bu ortamlar üzerinde gelişen kallusların büyüme oranları Çizelge 4.17'de verilmiştir. Kültüre alma işleminden 4 hafta sonra 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 ve 1 mM fusarik asit konsantrasyonlarını içeren MS katı ortamı üzerinde kalluslarda hiçbir gelişme gözlenmemiş ve kallusların kahverengileştiği gözlenmiştir. Fusarik asitin 0.01 mM konsantrasyonunu içeren ortam üzerinde gelişen kalluslar ile kontrol olarak alınan katı MS ortamı üzerinde gelişen kalluslar arasında gelişme açısından hiçbir fark saptanamamıştır. Fusarik asitin 0.1, 0.2, 0.3 mM konsantrasyonlarını içeren ortam üzerinde kültüre alınan kallusların gelişiminde ise azalma tespit edilmiştir. Fusarik asitin 0.4 mM konsantrasyonunu içeren katı MS ortamı üzerinde gelişen kallusların ise büyük bir kısmı kahverengileşirken bir kısmında ise azda olsa gelişme tespit edilmiştir (Şekil 4.29). Sonuçta *in vitro* seleksiyon için en uygun FA konsantrasyonun 0.3 mM olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.17. Genç 99 buğday çeşidi embriyogenik kalluslarının farklı konsantrasyonlarda fusarik asit içeren MS ortamları üzerinde gelişme oranları

Fusarik asit konsantrasyonu	Skala değerleri (ortalama)
1 mM	5.0 a
0.9 mM	5.0 a
0.8 mM	5.0 a
0.7 mM	5.0 a
0.6 mM	5.0a
0.5 mM	5.0 a
0.4 mM	4.6 b
0.3 mM	3.06 c
0.2 mM	2.4 d
0.1 mM	2.2 e
0.01 mM	1.0 f
Kontrol	1.0 f

* Benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.



Şekil 4.29. Genç 99 buğday çeşidi embriyogenik kalluslarının MS+ 2mg/L 2.4-D+ %2 sakkaroz+farklı konsantrasyonlarda fusarik asit içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınması.

Remotti ve ark., (1997) Gladiyol bitkisinden *F.oxyporium* fsp. *gladiolus*'a dayanıklı bitki elde etmek için iki Gladiyol çeşidinden elde ettikleri kallusları fusarik asit içeren ortamlar üzerinde kültüre alarak fusarik asit toksinine karşı duyarlılıklarını araştırmışlardır. Kalluslar 0, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4 ve 0.54 mM konsantrasyonlarda fusarik asit ilave edilmiş ortamlar üzerinde kültüre alınmış. dayanıklı kallus hücrelerinin seçimi için optimum fusarik asit konsantrasyonunun 0.35 mM olduğunu belirlemişlerdir. Curir ve ark. (2000), *in vitro* seleksiyonla dayanıklı hücre seçiminde kullanılan fusarik asit patojen etkisi göstererek, özellikle yüksek dozda kullanıldığı zaman bitkilerde polyfenol oxidase aktivitesini engellediğini bildirmişlerdir. Chawla ve Wenzel (1987), fusarik asitin arpa kalluslarına olan etkisini araştırmak için kallusları 0. 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ve 2 mM fusarik asit içeren ortamları üzerinde kültüre almış. 1.0 ve 2.0 mM konsantrasyon fusarik asit içeren ortamlar üzerinde kallusların tamamen öldüğünü, 0.8 mM fusarik asit içeren ortam üzerinde ise bu kallusların %85'nin öldüğünü tespit etmişlerdir. *In vitro* seleksiyon çalışmasında 0.8 mM fusarik asit toksin konsantrasyonunun iyi bir başlangıç olacağını belirlemiştir. Yapılan bu çalışmada optimum fusarik asit konsantrasyonunun 1.52-1.71 mmol/L olduğu saptanmıştır.

4.9. Seleksiyon Süreci

4.9.1. Seleksiyonda Kallusların Kullanımı

In vitro seleksiyonda kullanılmak üzere 4.5'de belirtildiği şekilde lethal dozlar belirlendikten sonra *F. graminearum* A-13. *F. culmorum* B-4 izolatlarından elde edilen %30 oranında kültür filtratı ve 0.3 mM fusarik asit toksinini içeren kallus ortamları üzerinde kültüre alınan kallusların aylık büyüme oranları Çizelge 4.18'de verilmiştir.

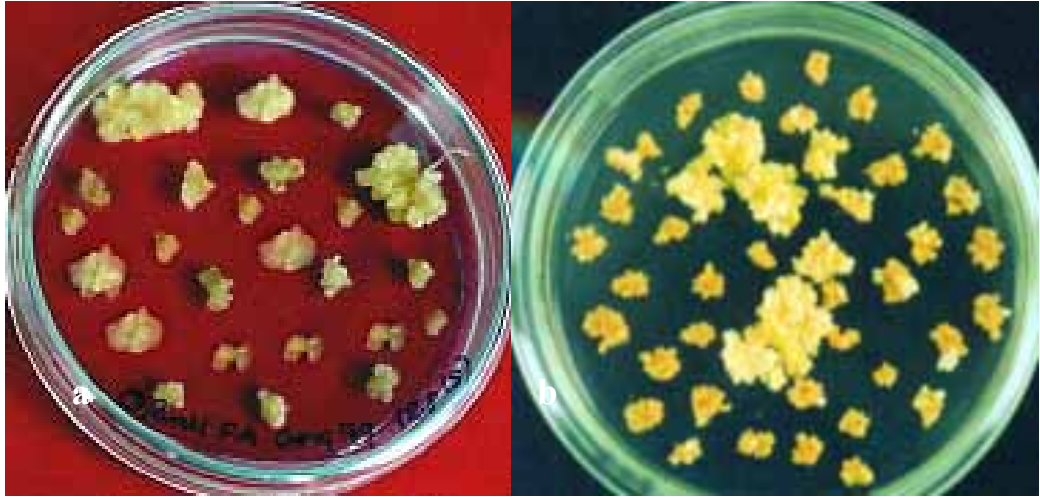
Çizelge 4.18. Kallusların kültür filtratı içeren ve içermeyen ortamlardaki aylık büyüme indeksleri (Büyüme indeksleri; kallusların ay sonu ile ay başı ağırlık farkından elde edilmiştir).

Buğday Çeşitleri	Alt Kültürler				
	Uygulamalar	1.	2.	3.	4.
Adana 99	Fusarik asit	0.68 b	0.23 c	0.70 b	0.69 b
	<i>F.culmorum</i>	0.48 c	0.50 b	0.66 b	0.83 b
	<i>F.graminearum</i>	0.55 bc	0.36 bc	0.78 b	1.13 a
	Kontrol	2.35 a	1.65 a	2.10 a	1.93 a
Genç 99	Fusarik asit	0.56 b	0.30 c	0.74 c	0.80 b
	<i>F.culmorum</i>	0.56 b	0.46 b	0.82 c	1.1 b
	<i>F.graminearum</i>	0.55 b	0.43 b	1.30 b	1.20 b
	Kontrol	2.7 a	1.65 a	2.38 a	2.16 a
Seri 82	Fusarik asit	0.66 b	0.17 b	0.56 b	0.63 b
	<i>F.culmorum</i>	0.46 b	0.35 b	0.62 b	0.69 b
	<i>F.graminearum</i>	0.47 b	0.36 b	0.68 b	0.86 b
	Kontrol	2.66 a	2.13 a	2.26 a	2.50 a

* Her bir uygulama için aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

Kallus gelişimleri kontrol olarak alınan kalluslar ile karşılaştırıldığında kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlarda düzenli olarak azalmış ve ancak bazı kalluslarda gelişmeler tespit edilmiştir. İlk alt kültürde fusarik asit ve kültür filtratı içeren ortamlar üzerindeki kallusların gelişimlerinde azalma belirlenmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında azalmanın %20-31 civarında olduğu gözlenmiştir. Birinci alt kültürde gelişme gösteren kallusların, ikinci altkültürde gelişmeleri kontrol hücreleri de dahil olmak üzere tüm kalluslarda büyüme yavaş yavaş azalmış, fakat en fazla büyüme *F. culmorum* kültürü filtratı içeren ortam üzerinde gelişen Adana 99 çeşidinde olmuştur. Fusarik asit içeren ortamlar üzerindeki bazı kallusların tamamen kahverengileşmesine rağmen bazı kalluslarda gelişmeler olduğu gözlenmiş ve bu

kalluslar üzerinde embriyo gelişimleri saptanmıştır (Şekil 4.30). Fusarik asit içeren ortamlar üzerindeki kallusların 3. altkültürde gelişiminde %36-62 arasında önceki aya oranla bir artış tespit edilmiştir. Kontrol olarak alınan hücrelerde 3. altkültürde bir önceki aya göre çeşitler arasında farklılık olmasına rağmen bu artış %64-76 arasında olmuştur. Kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlar üzerinde gelişen kallusların gelişmelerinde 3. ve 4. alt kültürlerde bir sapma göstermemiştir.



Şekil 4.30. Fusarik asit (a) ve *F. culmorum* kültür filtratı (% 30) (b) içeren kallus ortamları üzerinde gelişen kallus kolonilerinin 2. alt kültürden sonra gelişmesine devam eden ve etmeyen kallusların genel görünüşleri.

Buğday genotiplerinin Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklı olmasıyla, hücre bazında toksik metabolitlere karşı dayanıklılığı arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Wang ve Miller (1988), yaptıkları çalışmada Fusarium'a karşı duyarlı olan buğday çeşitlerinin toksinlere karşı duyarlılık gösterdiklerini bildirmişlerdir. Wolf ve Earle (1990), her toksin uygulamasından sonra sayılı oranda kallusların canlı kalmasını genotiplere bağlamaktadırlar. MS ortamı üzerinde selekte edilen kallusların regenerasyon kabiliyetleri %2-8 oranında değişmekte ve toksin içermeyen ortamlar üzerinde gelişen kalluslarla karşılaştırıldığında bu regenerasyon oranının 10 kat daha düşük olduğu ileri sürülmektedir. Bunun sebebinin ortam içerisinde bulunan fusarium toksinin metabolizmasından kaynaklandığı sanılmaktadır. Ortam içerisinde fungusun üretmiş olduğu toksinin varlığı kalluslardan bitki regenerasyonun kısmen yada tamamen yok olmasına ve canlılığın azalmasına neden

olabilmektedir (Kasem ve ark., 1996; Badea ve ark., 1998; Maier ve Oettler, 1992; Maier ve Oettler, 1996, Yang ve ark., 1998). Anter kültürü ile elde edilen kalluslar uzun süre fusarium toksini içeren ortam üzerinde kültüre alındığında bitki regenerasyon kabiliyeti kaybolduğu bildirilmiş olup *in vitro* seleksiyonla dayanıklı bitkilerin ne kadar nadir elde edildiği bu sonuçla açıklanabilir (Latunde-Dada ve Lucas, 1988).

Bütün genotiplerde dayanıklı kallusların regenerasyon kabiliyeti seleksiyona uğratılmamış kalluslara göre daha zor olmaktadır. Test edilen genotiplerde çok az sayıda bitki regenerasyonu gözlenmiştir. Tahıllarda regenerasyon kabiliyeti bitki çeşidine ve genotipe bağlı olduğu bilinmektedir. Kallus gelişiminin ve bitki regenerasyonunun fusarium toksinine karşı eşit bir şekilde duyarlılığı mevcut değildir (Kasem ve ark., 1991; Kasem ve Sagi 1993).

Canlı kalan kalluslar bitki regenerasyonu için MS+0.5 mg/L IAA+1 mg/L BAP+ %2 sakkaroz içeren katı ortam üzerinde kültüre alınmıştır (Şekil 4.31. 4.32). Regenere olan bitkiler daha sonra ½ MS+1mg/L NAA+ %2 sakkaroz içeren ortamlar üzerinde kültüre alınarak köklendirilmesi sağlanmıştır. Kök oluşumu tamamlanan bitkiler toprak:kum:çiftlik gübresi karışımında toprağa aktarılmış ve üzerleri 7-10 gün süre ile polietilen bir torba ile kapatılarak bitkiciklerin doğal koşullara adaptasyonunu sağlanmıştır.



Şekil 4.31. Fusarik asit (a) ve % 30 *F. culmorum* kültür filtratı (b) içeren ortamlar üzerinde gelişen kalluslardan elde edilen bitkicikler.



Şekil 4.32. Selekte edilmiş kalluslardan bitki regenerasyonu (a) ve başak oluşumu (b).

Kök oluşumu için kültüre alınan bitkilerden bazılarının zayıf köklenmeleri sonucunda toprağa adaptasyonlarında güçlüklerle karşılaşmaktadır. Kökleri daha iyi gelişmiş bitkilerin toprağa adaptasyonlarının daha kolay olduğu saptanmıştır.

Yapılan araştırmalarda bitki eldesinde kritik dönemlerden birisinin toprağa adaptasyon aşaması olduğu gözlenmiştir. Bu aşamada evapotranspirasyonu önlemek için bitkilerin 7-10 gün süre ile polietilen plastikler altında tutulması ya da mislemenin yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

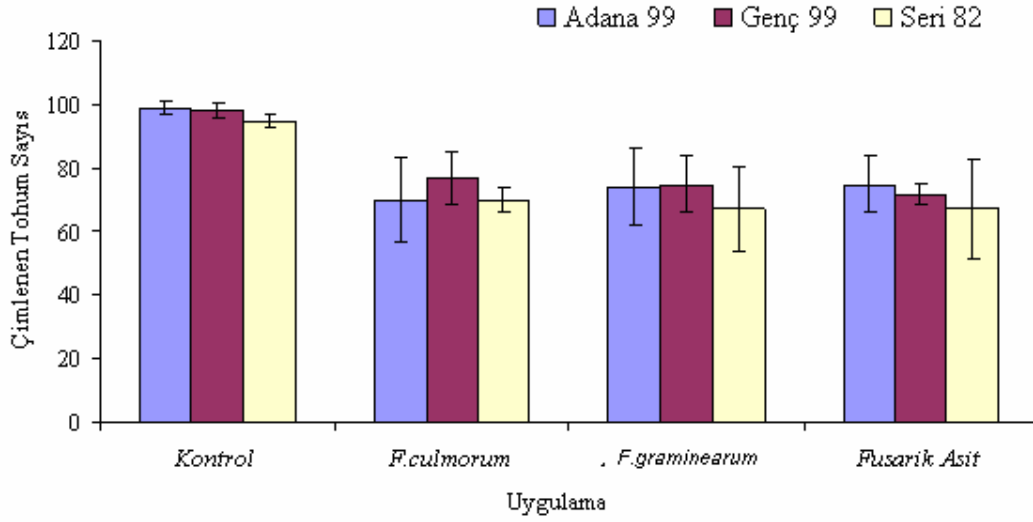
Kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlar üzerinde selekte edilen kalluslardan 19 adet bitki regene edilmiş, başak oluşturulmuş, ancak bu bitkilerden tane elde edilememiştir. Bunun başlıca nedeninin başak içerisinde buğday tanesinin oluşturulması için gerekli ışık ve sıcaklık faktörünün tam olarak sağlanmamasından ve uzun süre kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortam üzerinde alt kültüre alınan kallusların varyasyona uğramasıyla ortaya çıkan farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlar üzerinde canlı kalluslardan regene olan bitkilerin yetiştirildiği klima odaları bunun için uygun olarak dizayn edilmemiştir. Bunun yanı sıra uzun süre toksin içeren ortam üzerinde kültüre alınan kallusların bitki regenerasyon kabiliyeti kaybolduğu Latunde-Dada ve Lucas, 1988 tarafından bildirilmiştir. *In vitro* seleksiyonla dayanıklı bitkilerin ne kadar nadir elde edildiği bu sonuçlarla açıklanabilir.

4.10. Kültür Filtratı ve Fusarik Asit'in Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi

Şekil 4.34' de görüldüğü gibi Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan etmen, buğday tanelerinin çimlenmesini ve kök gelişimini engellemektedir. Yapılan çalışmada, %30 oranında *F. graminearum* A-13. *F. culmorum* B-4 izolatlarından elde edilen kültür filtratı ve 0.3mM Fusarik asitin buğday bitkisine olan etkisini belirlemek amacıyla çimlendirme denemesi sonuçlarına bakıldığında çeşitlere bağlı olarak buğday tanelerinin kontrolde çimlenme oranı %95-98 iken %30 oranında A-13 izolatından elde edilen kültür filtrat uygulamasında % 70-77. B-4 izolatından elde edilen kültür filtratı uygulamasında %67-74. 0.3 mM Fusarik asit uygulamasında ise çimlenme oranı %67-75 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.33).

Çizelge 4.19. *Fusarium* spp. kültür filtratları ile Fusarik asitin buğday tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi

	Kontrol	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	Fusarik asit	Ortalama	
Adana 99	99	70	74	75	80	A
Genç 99	98	77	75	72	81	A
Seri 82	95	70	67	67	75	A
Ortalama	97	72	72	71		
	A	B	B	B		

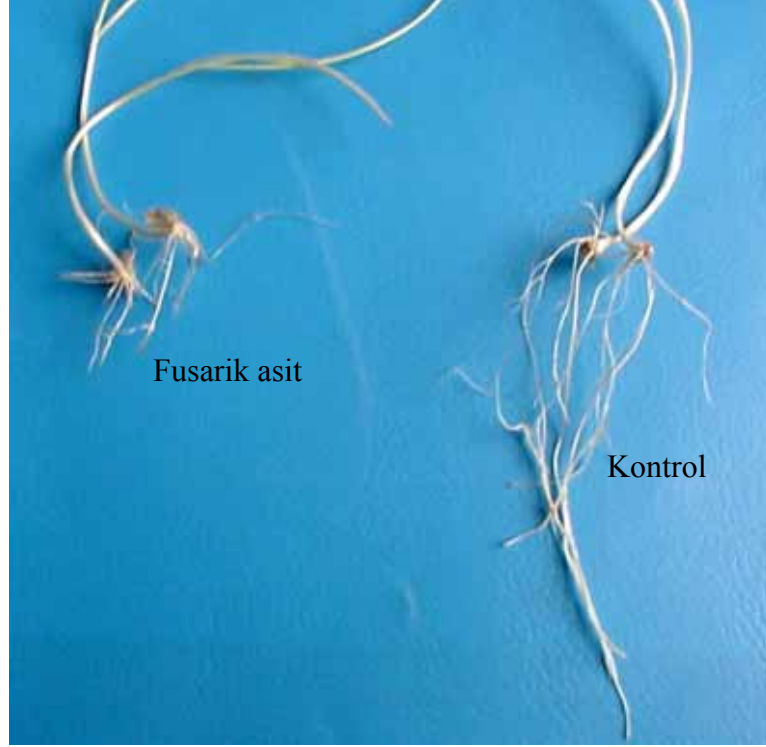


Şekil 4.33. *Fusarium* spp. kültür filtratları ile fusarik asitin buğday tohumlarının çimlenmesine etkisi

Chawla ve Wenzel (1987) buğday bitkisi yapraklarının 0.5 mM saf *Fusarium* toksinine lokal nekrozlar, solgunluklar ve yapraklarda kuruma şeklinde reaksiyonlar göstererek 60 saat içinde simptomların ortaya çıktığını gözlemlemiştir. Bu bulgular, elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik taşımaktadır.

Kültür filtratı ve fusarik asit uygulaması sonucunda, çimlenen buğday bitkilerinin köklerinin oldukça kısa ve az olduğu, kontrol bitkilerini ise çimlenen buğday tohumların normal kök uzunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.33). Kontrol bitkiler ile uygulamalara tabii tutulmuş bitkiler arasında istatistiksel açıdan fark olduğu belirlenirken uygulamalar arasında bir farkın olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.19). Sonuç olarak %30' luk kültür filtratlarının ve fusarik asit uygulamasının buğday bitkisinin tohumlarının çimlenmesinde etkili olduğu saptanmıştır. Buerstmayr ve ark. (2004), tarafından yapılan çalışmada uygulamış oldukları fusarik asitin buğday tohumlarının çimlenmesini etkilediğini ve kök gelişimini engellediğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada alınan sonuçlar, Buerstmayr ve ark., (2004)'nın yapmış oldukları çalışmadan aldıkları sonuçlarla

karşılaştırıldığında paralel sonuçlar elde edilmiş ve 0.30 mM fusarik asitin buğday tohumlarının çimlenmesini engellediği belirlenmiştir.



Şekil 4.34. 0.3 mM Fusarik asitin buğday bitkisinin köklerine etkisi

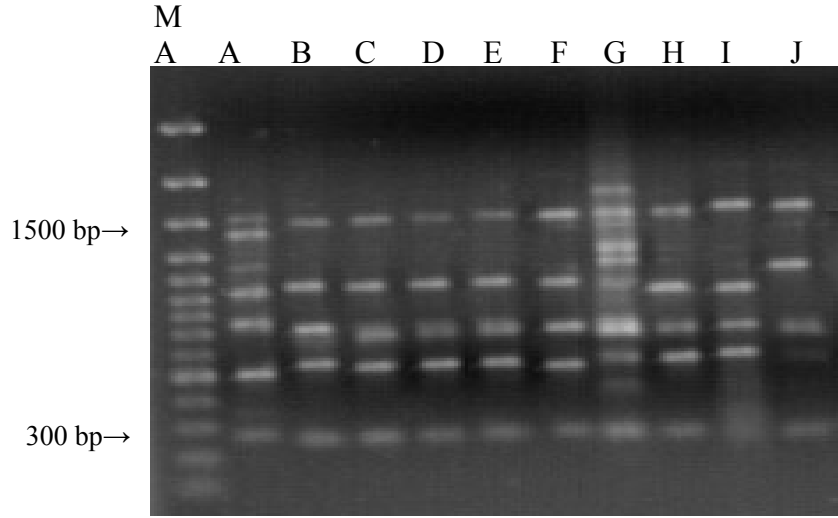
4.11. *F. graminearum* ve *F. culmorum*'a ait İzolatların Moleküler Analizi

Hastalığa karşı dayanıklı bitkilerin elde edilmesinde patojenin genetik farklılığının ve doğal yapısının bilinmesi çok önemlidir. Fitopatojen funguslarda genetik varyasyon analizinde moleküler markırlar başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bazı fitopatojen fungusların intraspesifik genetik varyasyonların araştırılması için RAPD markırları başarılı bir metod olarak kullanılmaktadır (Williams ve ark., 1990; Welsch ve McClelland, 1990; Parry ve Nicholson, 1996; Yang ve ark., 2000). RAPD analiz yöntemi buğday hastalıklarına neden olan *Fusarium* spp'nin genetik farklılıklarını tespit etmek amacıyla bazı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Nicholson ve ark., 1993; Quellet ve Seifert, 1993; Schiling ve ark., 1996; Nicholson ve ark., 1998; Carter ve ark., 2000; Gargouri ve ark., 2003;

Galio-Meagner, 2003). Bu çalışmada yapılan patojenite testi sonuçlarına göre *F. graminearum* A-13 ile *F. culmorum* B-4 izolatının diğer izolatlara göre daha agresif olarak belirlenmesi nedeniyle. izolatlar arasında genetik farklılıkların olup olmadığını tespit etmek amacıyla RAPD-PCR analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda çeşitler arasındaki genetik benzerliklere dayalı dendogram verileri Swofford (1993) tarafından geliştirilen PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Vers. 3.1.1.) programı kullanılarak “NJ cluster” analizi ile belirlenmiştir.

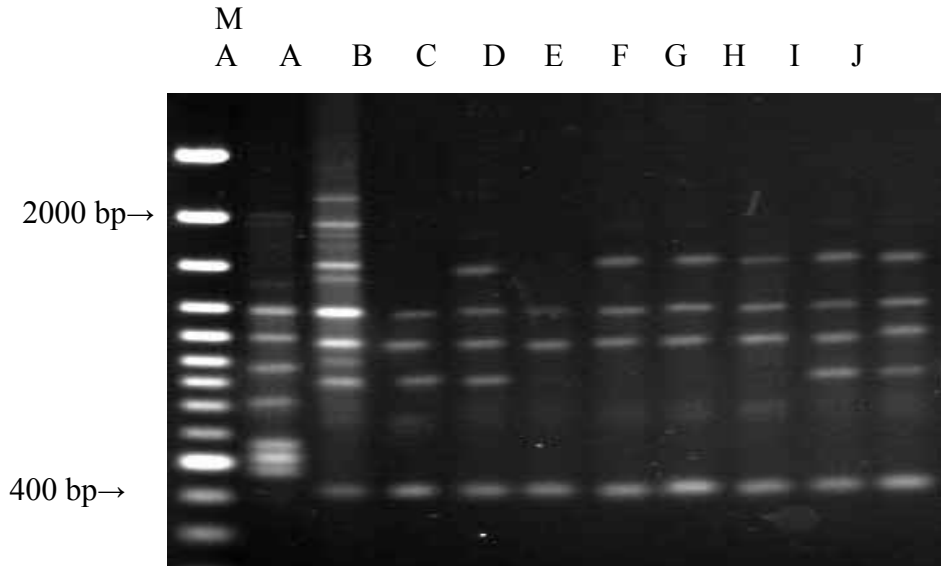
Yapılan çalışmada testlenen primerlerden OPU-17. *F. culmorum* izolatlarıyla. OPU-19 ve OPU-17 primerleri *F. graminearum* izolatlarıyla yapılan RAPD analizi sonucunda reaksiyon göstermemiştir. Çalışmada kullanılan diğer primerler her iki izolatla yapılan amplifikasyon sonucunda bandlar oluşturmuşlardır. *F. culmorum* ile primerlerin RAPD-PCR ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant pozisyonundan 27 bant da, *F. graminearum* ile primerlerin amplifikasyonu sonucunda elde edilen bant pozisyonundan 9 bant da, polimorfizm gözlenmiştir. Primerler kullanılarak yapılan RAPD analizi sonucu elde edilen bantlar aşağıda verilmiştir.

OPT-01 primeri *F. culmorum* izolatında polimorfizm oluşturmuş ve amplifikasyon sonucunda oluşan bandlar 300-1500 bp büyüklüğünde belirlenmiştir. Amplifikasyon sonucunda B-1, B-9 izolatlarının diğer izolatlardan farklı bant oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.35).



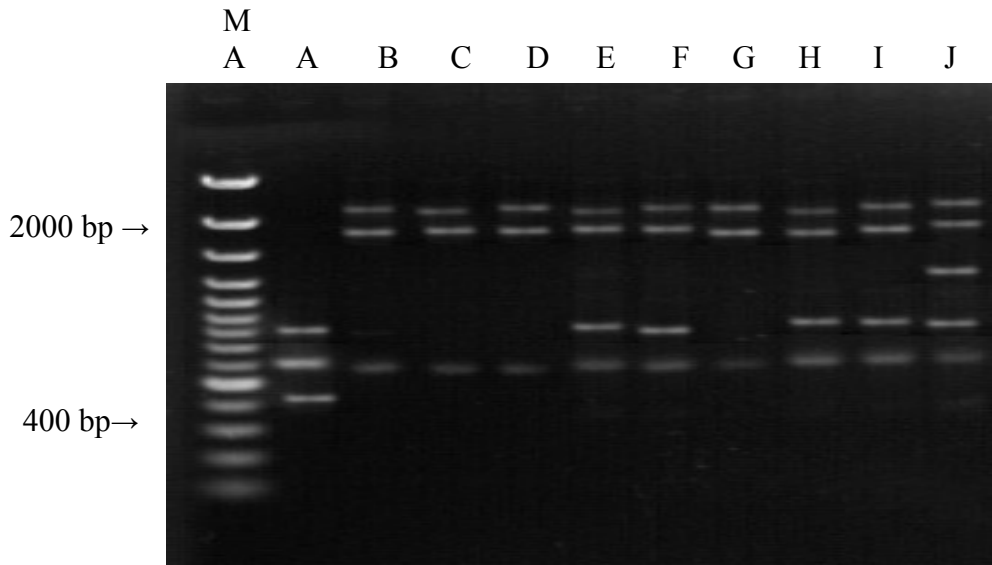
Şekil 4.35. *F. culmorum* izolatlarının OPT-01 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder. A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).

OPT-04 primeri ile yapılan amplifikasyonda *F. culmorum* izolatlarının 400-2000 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu ve polimorfizm olduğu gözlenmiştir. Amplifikasyon sonucunda özellikle B-1, B-2, B-3, B-5 izolatlarının diğerlerden farklı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.36).



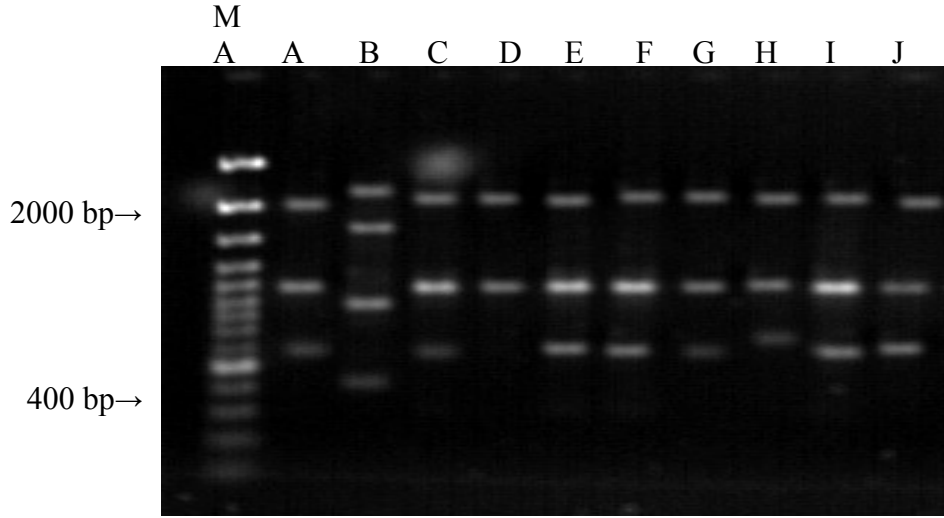
Şekil 4.36. *F. culmorum* izolatlarının OPT-04 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).

OPT-06 primeri ile yapılan amplifikasyonda *F. culmorum* izolatlarının 400-2000 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu ve polimorfizmin gerçekleştiği gözlenmiştir. Amplifikasyon sonucunda B-1 ve B-12 izolatlarının diğer izolatlardan farklı bant oluşturduğu. B-2.,B-3, B-4, B-8 izolatlarının ise birbirleriyle benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.37).



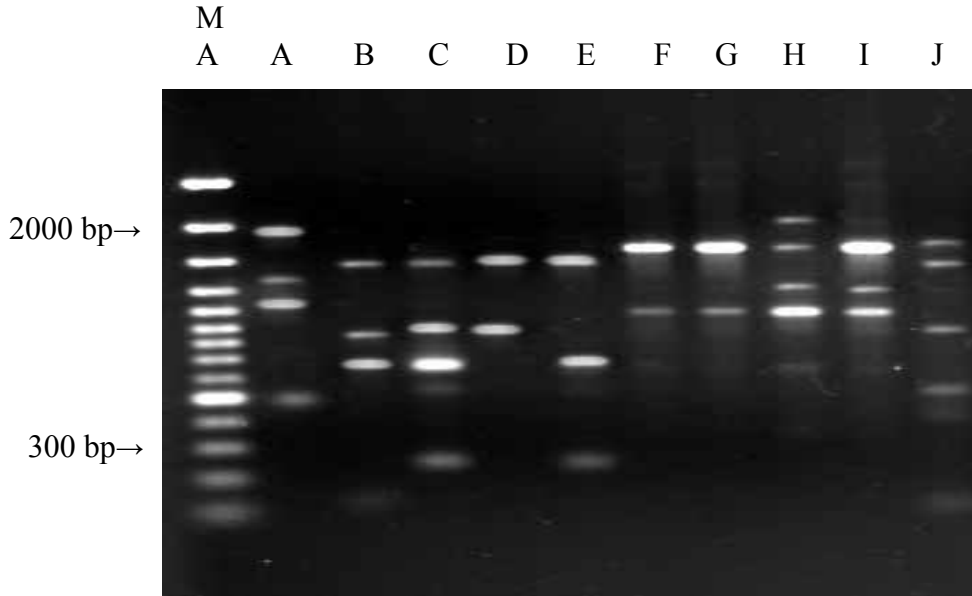
Şekil 4.37. *F. culmorum* izolatlarının OPT-06 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder. A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).

OPT-16 primeri ile yapılan amplifikasyonda *F. culmorum* izolatlarının 400-2000 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu ve polimorfizm gösterdiği saptanmıştır. Amplifikasyon sonucunda özellikle B-1, B-2 ve B-4 izolatlarının diğerlerden farklı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.38).



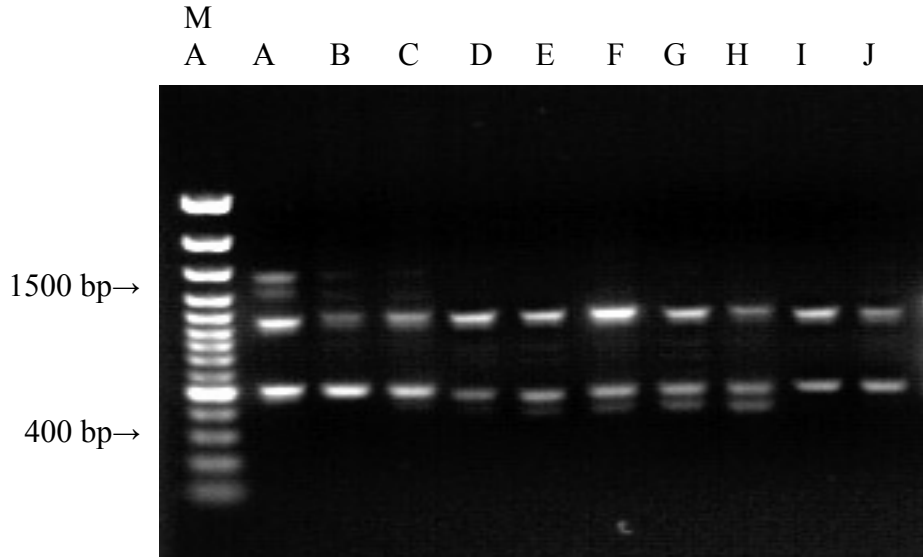
Şekil 4.38. *F. culmorum* izolatlarının OPT-16 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder. A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).

OPT-18 primeri ile *F. culmorum* izolatların amplifikasyonunda polimorfizm görülmüş ve 400-2000 bp büyüklüğünde bantlar oluşmuştur. Alınan sonuçlar izolatların birbirinden farklı bantlar oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 4.39).



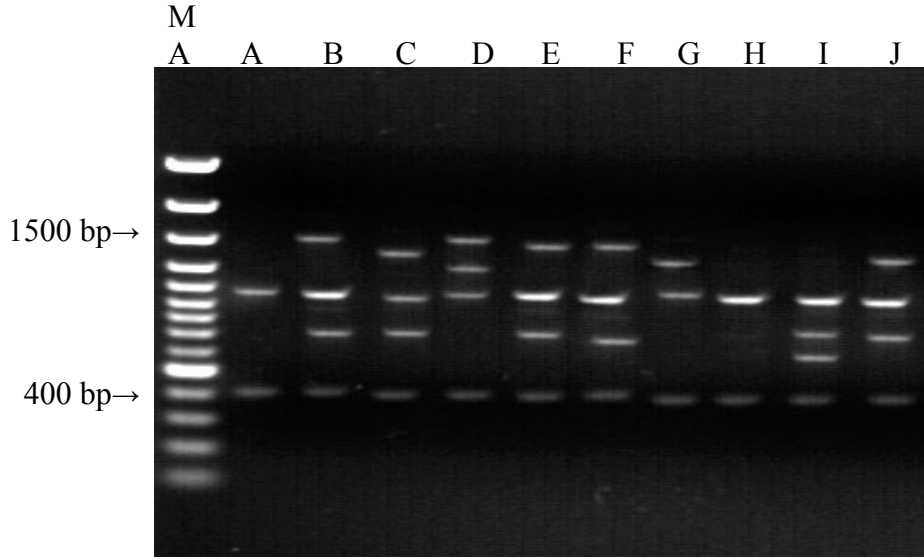
Şekil 4.39. *F. culmorum* izolatlarının OPT-18 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder. A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).

OPU-13 primeri ile yapılan amplifikasyonda *F. culmorum* izolatlarının 400-1500 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu ve özellikle B-1 izolatının diğerlerden farklı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.40).



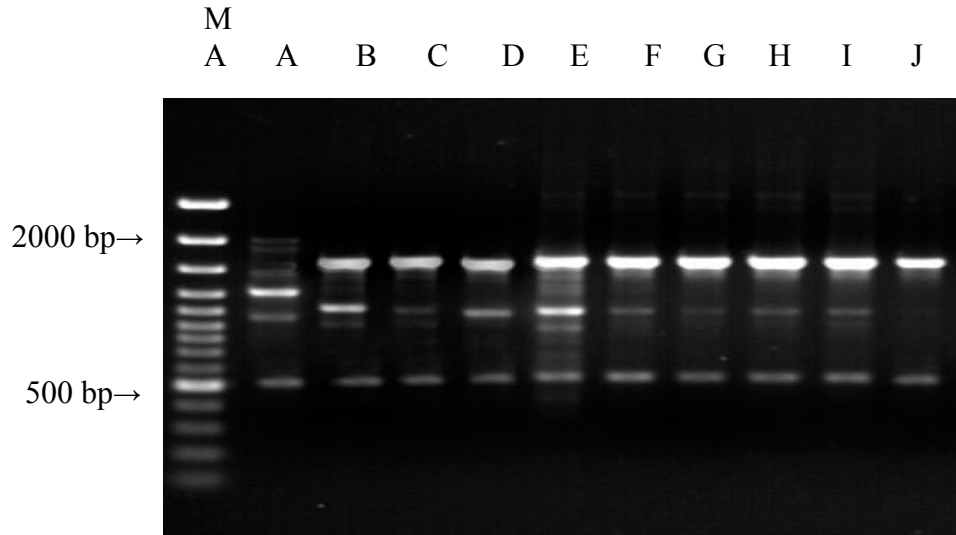
Şekil 4.40. *F. culmorum* izolatlarının OPU-13 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder. A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).

OPU-15 primeri ile *F. culmorum* izolatlarının amplifikasyonu sonucunda 400-1500 bp büyüklüğünde bantlar oluşmuş ve polimorfizm gerçekleşmiştir. Amplifikasyon sonucunda genellikle izolatların birbirinden farklı bantlar oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.41).



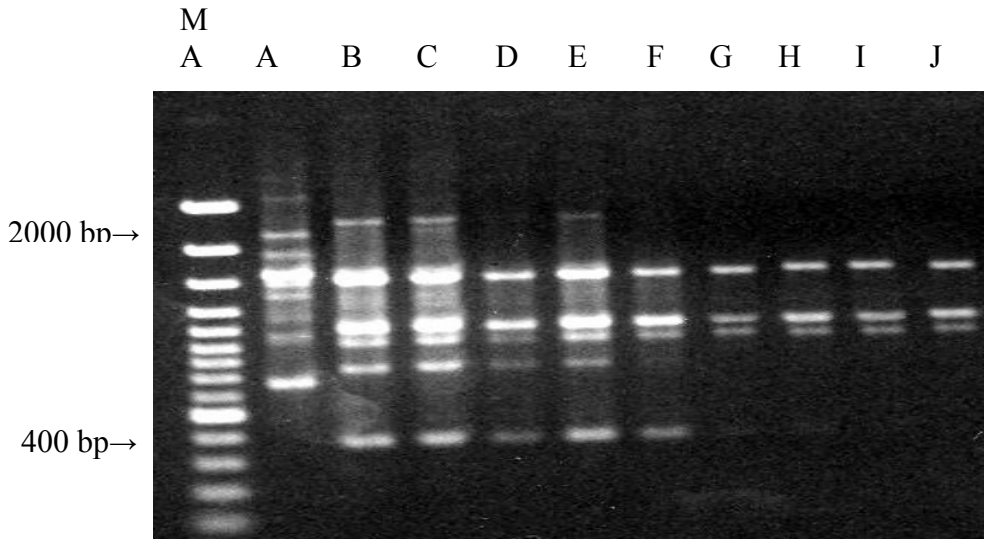
Şekil 4.41. *F. culmorum* izolatlarının OPU-15 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder. A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).

OPU-19 primeri ile yapılan amplifikasyonda *F. culmorum* izolatlarının 500-2000 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu ve polimorfizmin olduğu gözlenmiştir. Özellikle B-1 izolatının diğerlerden farklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.42).



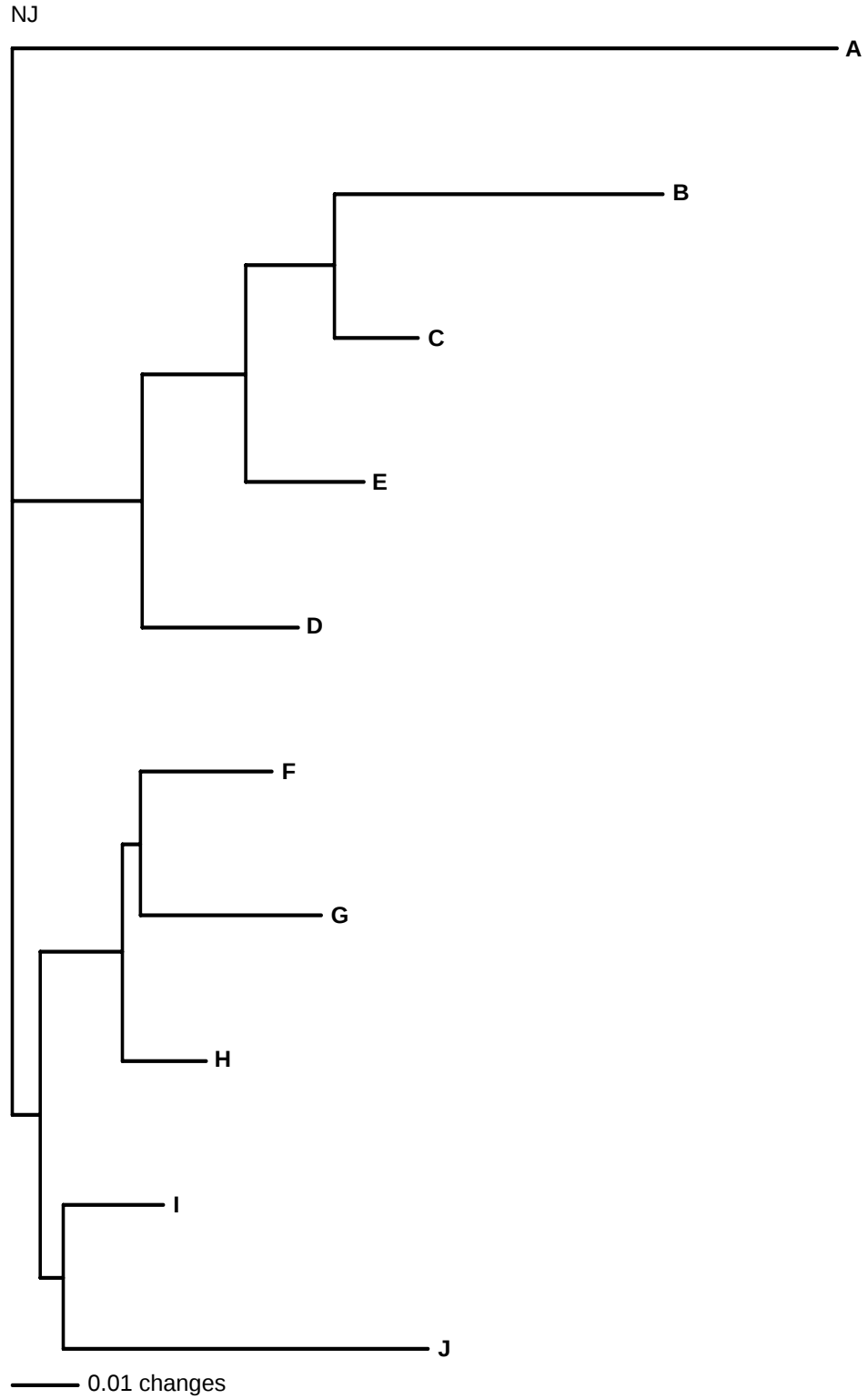
Şekil 4.42. *F. culmorum* izolatlarının OPU-19 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder. A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).

UBC-85 primeri ile yapılan amplifikasyonda *F. culmorum* izolatlarının 400-2000 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu ve polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir. Alınan sonuçlar özellikle B-1 izolatının diğerlerden farklı olduğu. B-9, B-10, B-11 ve B-12 izolatlarının ise benzerlik gösterdikleri gözlenmiştir (Şekil 4.43).



Şekil 4.43. *F. culmorum* izolatlarının UBC-85 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder. A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları).

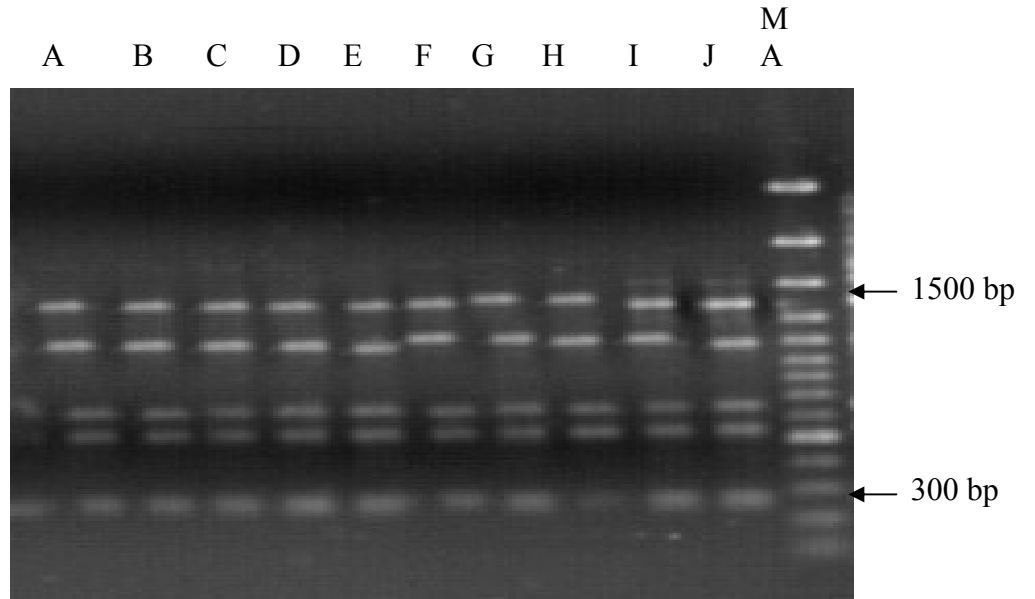
F. culmorum'un genotipik akrabalık derecesinin belirlenmesinde PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Vers. 3.1.1.) programı kullanılarak "NJ cluster" analizi ile elde edilen dendrogram Şekil 4.44'de verilmiştir. *F. culmorum*'un F (B-8), G (B-9) ve H (B-10), I (B-11), J (B-12) izolatları bir grup içerisinde yer almış. izolatlar arasında en yakın benzerlik F (B-8) ve G (B-9) arasında belirlenmiştir. Bu grup içerisinde genetik olarak en uzak izolatın J (B-12) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.44. *F. culmorum* izolatlarının RAPD-PCR çalışması sonucunda genetik yakınlıklarını gösteren NJ ile elde edilmiş dendrogram (A: B-1, B: B-2, C: B-3, D: B-4, E: B-5, F: B-8, G: B-9, H: B-10, I: B-11, J: B-12 izolatları)

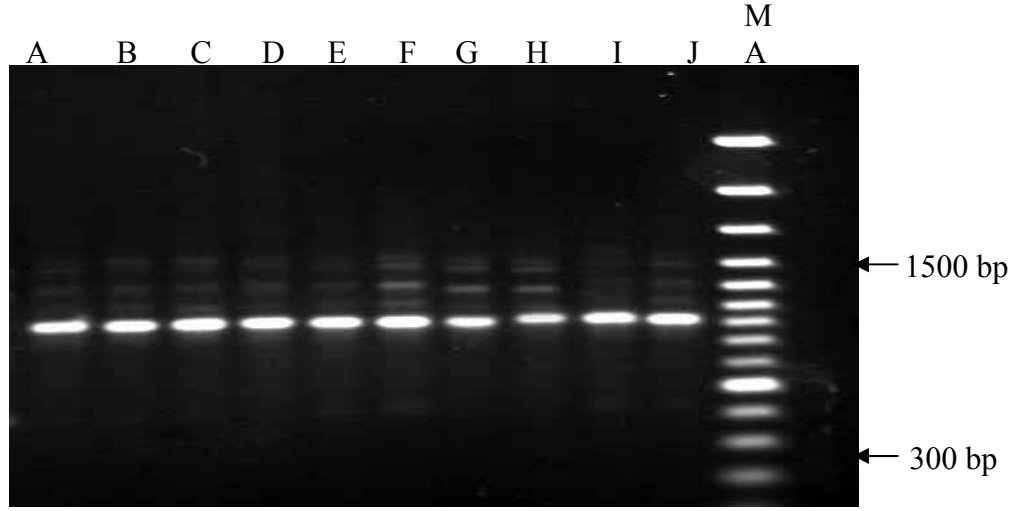
F. culmorum izolatları arasında B (B-2), C (B-3), D (B-4) ve E (B-8) izolatları başka bir grup oluşturmuş ve genetik olarak en yakın benzerlik B (B-2) ve C (B-3) izolatları arasında gözlenmiştir. Adana ili ve çevresinde buğday yetiştiriciliği yapılan bölgelerde yapılan survey çalışmaları sonucunda hastalıkla bulaşık tarlalardan *Fusarium* spp. ile enfekteli olduğu düşünülen buğday tarlalarından izole edilen A (B-1) izolatının bütün izolatlardan farklı olduğu belirlenmiştir. Genel olarak *F. culmorum* B-1 izolatının renk ve görüntü bakımından diğer izolatlardan çok farklı görünmemesine rağmen, RAPD-PCR analiz sonuçlarına göre diğer izolatlardan farklı olduğu tespit edilmiştir.

OPT-01 primeri ile yapılan amplifikasyonda *F. graminearum* izolatlarının 300-1500 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu ve izolatlar arasında farklılığın olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.45).



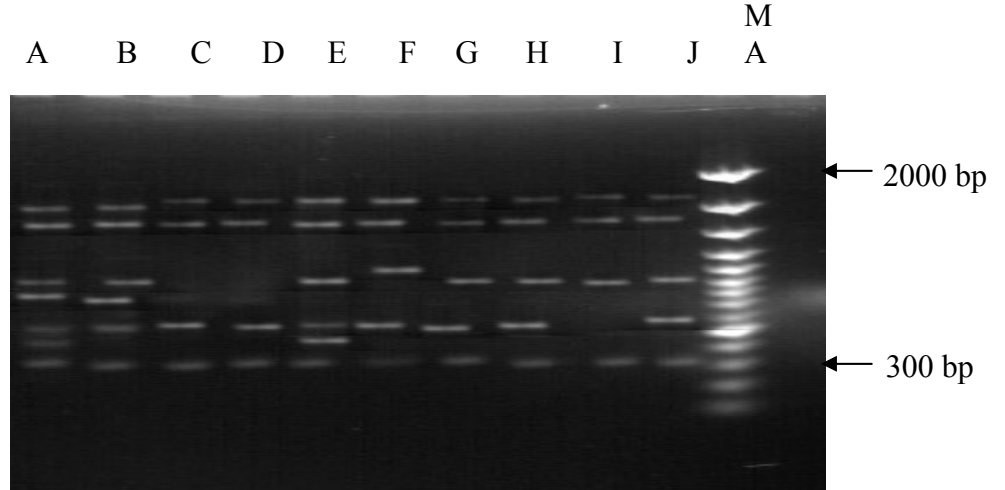
Şekil 4.45. *F. graminearum* izolatlarının OPT-01 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).

OPT-04 primeri ile yapılan amplifikasyon sonucunda *F. graminearum* izolatlarının 300-1500 bp büyüklüğünde bant oluşturduğu. izolatlar arasında farklılığın olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.46).



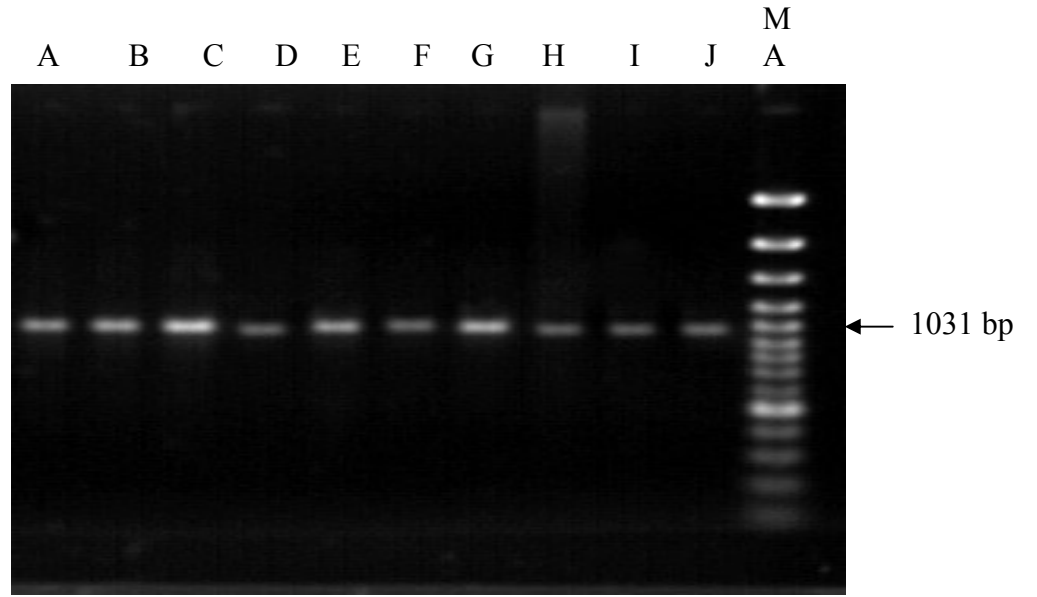
Şekil 4.46. *F. graminearum* izolatlarının OPT-04 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).

OPT-06 primeri ile yapılan amplifikasyon sonucunda *F. graminearum* izolatlarında polimorfizm gerçekleşmiş ve 300-2000 bp büyüklüğünde bantlar belirlenmiştir. Genellikle izolatlar farklı bantlar oluşturmuştur (Şekil 4.47).



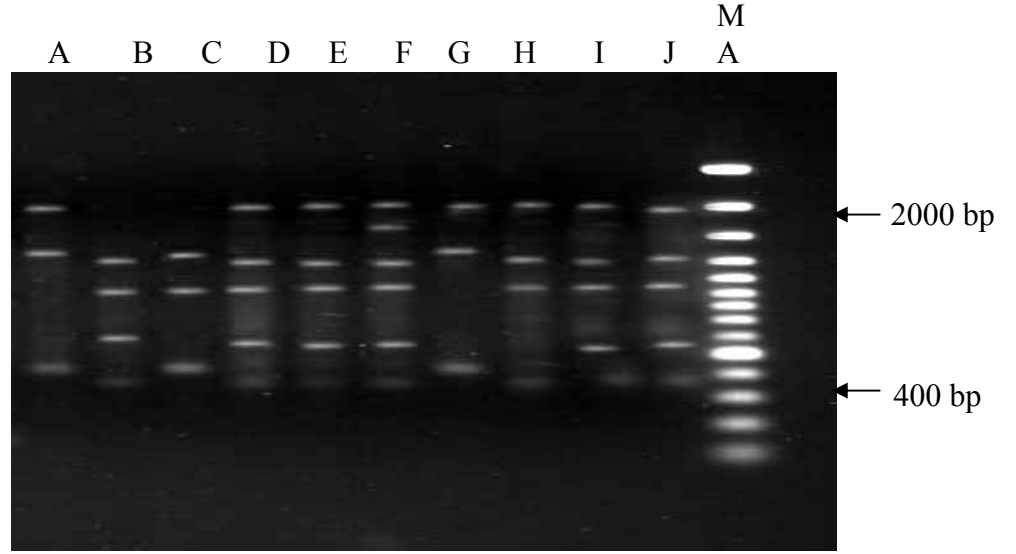
Şekil 4.47. *F. graminearum* izolatlarının OPT-06 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).

OPT-16 primerinin *F. graminearum*'un izolatları ile amplifikasyonu sonucunda 300-1000 bp büyüklüğünde bant oluşturmuş, fakat izolatlar arasında herhangi bir polimorfizm gözlenmemiştir (Şekil 4.48).



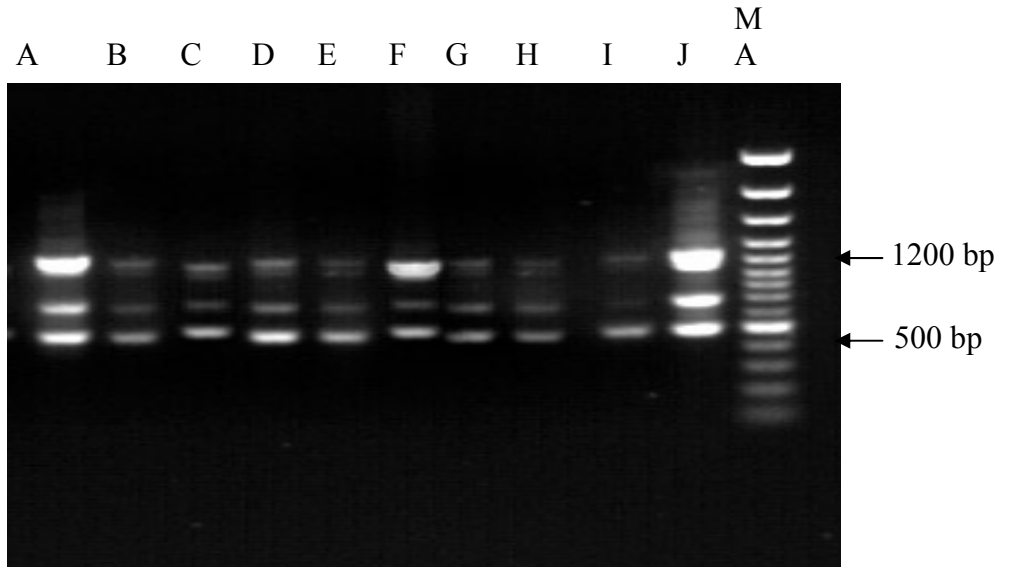
Şekil 4.48. *F. graminearum* izolatlarının OPT-16 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).

OPT-18 primerinin *F. graminearum* izolatlarıyla amplifikasyonu sonucunda polimorfizm gerçekleşmiş ve 400-2000 bp büyüklüğünde bantlar oluşturmuştur. Amplifikasyon sonucunda A-15, A-8, A-6 ve A-11 izolatlarının diğer izolatlardan farklı bant oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.49).



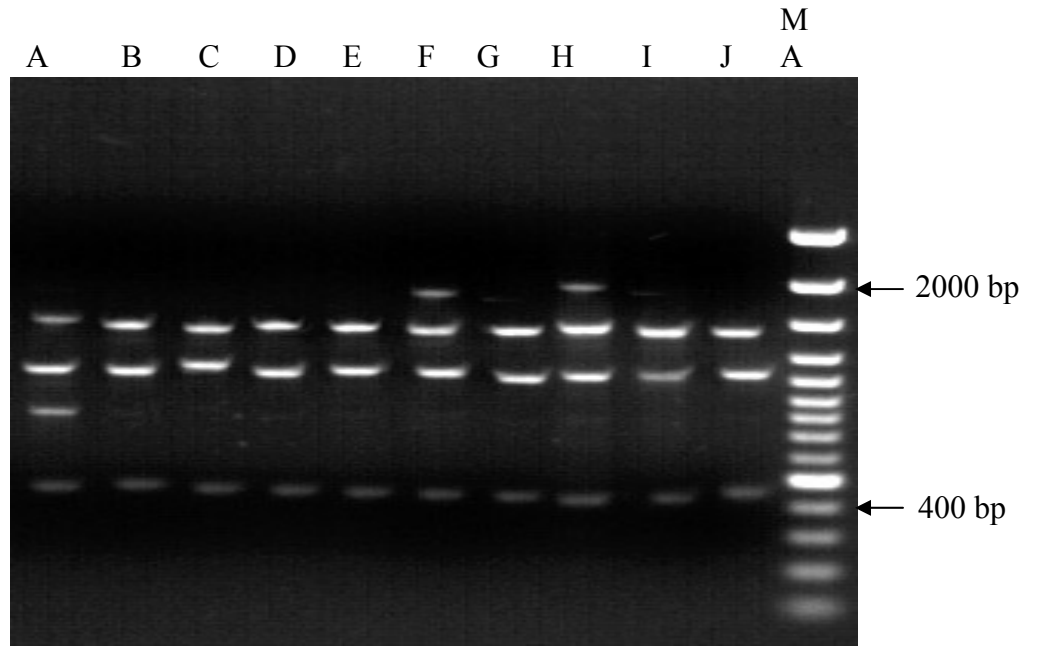
Şekil 4.49. *F. graminearum* izolatlarının OPT-18 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).

OPU-13 primerinin *F. graminearum*'un izolatlarıyla amplifikasyonu sonucunda 500-1200 bp büyüklüğünde bant oluşmuş. fakat izolatlar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.50).



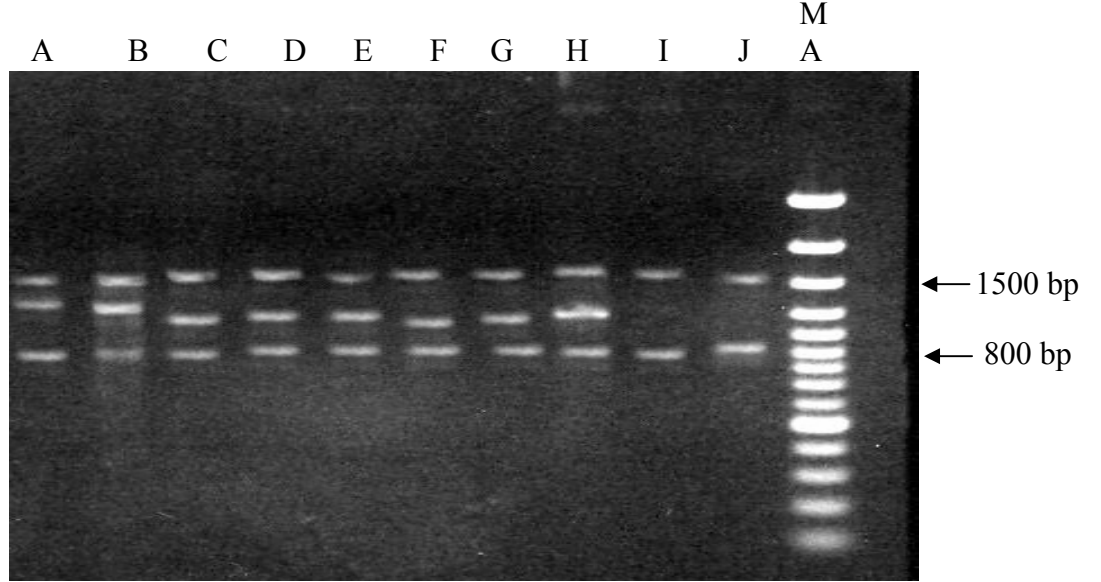
Şekil 4.50. *F. graminearum* izolatlarının OPU-13 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).

OPU-15 primeri *F. graminearum* izolatlarında polimorfik bantlar oluşturmuş ve amplifikasyon sonucunda bant uzunlukları 400-2000 bp büyüklüğünde gerçekleşmiştir. Amplifikasyon sonucunda A-15, A-4 ve A-13 izolatlarının diğerlerinden farklı bandlar oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.51).



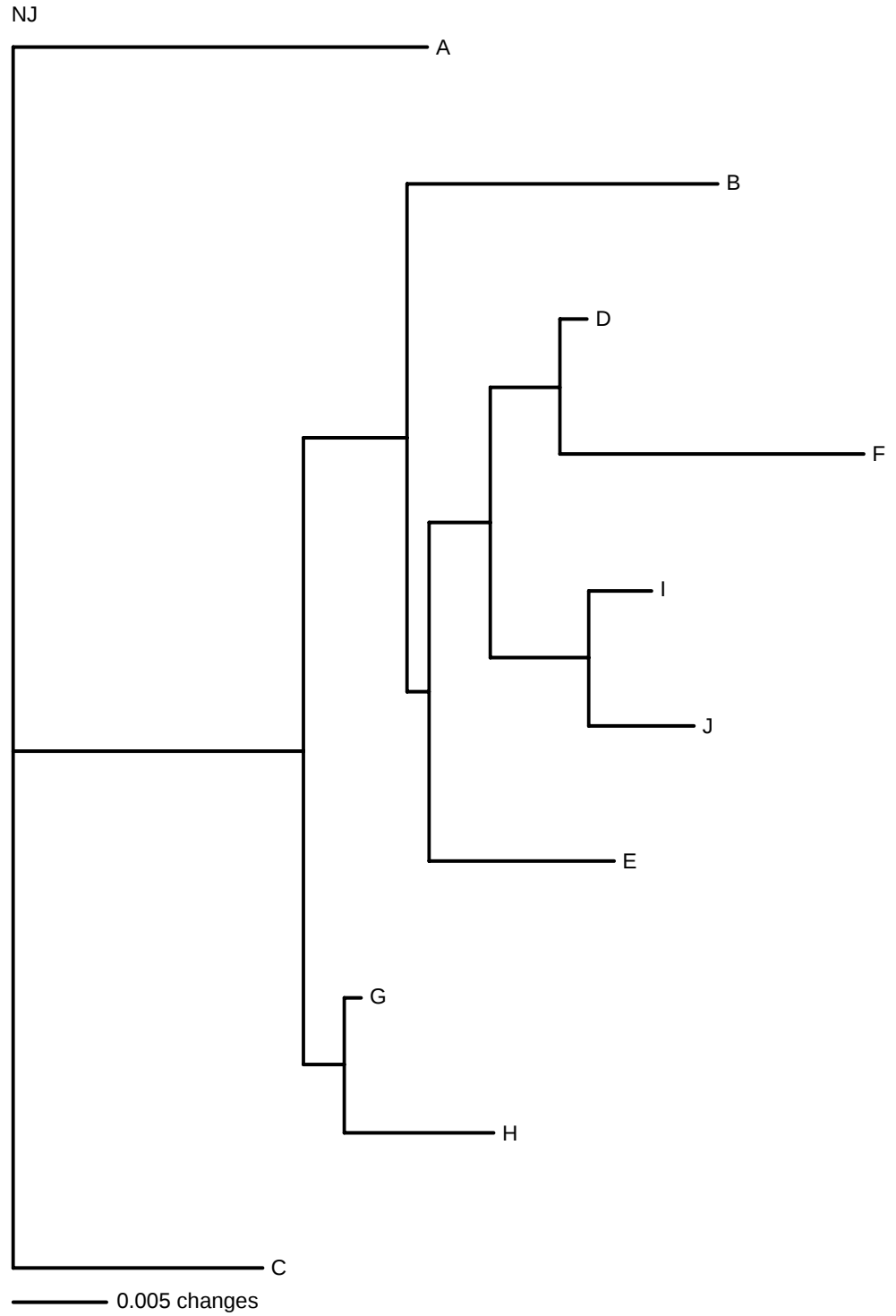
Şekil 4.51. *F. graminearum* izolatlarının OPU-15 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).

UBC-85 primerinin *F. graminearum*'un bütün izolatları amplifikasyon sonucunda 800-1500 bp büyüklüğünde bant oluşturmuş. A-6 ve A-9 izolatlarının diğer izolatlardan farklı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.52)



Şekil 4.52. *F. graminearum* izolatlarının UBC-85 primeri ile amplifikasyonu ile elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).

Adana ili ve çevresinde buğday yetiştiriciliği yapılan bölgelerde yapılan survey çalışmaları sonucunda elde edilen *F. graminearum* izolatlarının genotipik akrabalık derecesinin belirlenmesinde PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Vers. 3.1.1.) programı kullanılarak “NJ cluster” analizi ile elde edilen dendrogram Şekil 4.53’de verilmiştir. *F. graminearum*’un B (A-8), D (A-2), E (A-3), F (A-4), J (A-9) ve I (A-16) izolatları bir grup oluşturmuş ve genetik olarak en yakın benzerlik I (A-16) ve J (A-9) izolatları arasında belirlenmiştir. G (A-11) ve H (A-13) izolatları farklı bir grup içerisinde yer almakta olup izolatlar arasında çok yakın benzerlik tespit edilmiştir. A (A-15) ve C (A-6) izolatları diğer *F.graminearum* izolatlarından farklı bir grup içerisinde yer almış, en uzak genetik benzerlik bu izolatlar arasında gözlenmiştir.



Şekil 4.53. *F. graminearum* izolatlarının RAPD-PCR çalışması sonucunda genetik yakınlıklarını gösteren NJ ile elde edilmiş dendrogram. A: A-15, B: A-8, C: A-6, D: A-2, E: A-3, F: A-4, G: A-11, H: A-13, I: A-16, J: A-9 izolatları).

Fungal izolatlar son zamanlarda mikroskopik ve koloni karakterleri kullanılarak teşhis edilmektedir. Buna rağmen tespit edilen izolatlar arasında bazı taksonomik problemlerle karşılaşilmektedir. Bu problemleri aşmak için RFLP, RAPD-PCR gibi moleküler analiz yöntemleri kullanılmaktadır.

RAPD-PCR analiz yöntemi izolatların genetik farklılıkların tespitinde kullanılan oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Bu şekilde 20-30 ng DNA ve 10 bazlık oligonükleotid primer kullanılarak teşhis yapmak mümkün olabilmektedir.

F. graminearum ve *F. culmorum*'un genetik benzerlikleri üzerine bazı araştırmacılar moleküler çalışmalar yapmışlardır. Nicholson ve ark. (1998). *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatları ile OPT-01, OPT-16 ve OPU-17 primerleri kullanarak yapmış oldukları çalışmada *F. culmorum* izolatlarının OPT-01 primeri ile 800 bp, *F. graminearum* izolatlarının OPT-16 primeri ile yaptığı amplifikasyonda ise 700 bp büyüklüğünde bant oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. Yine aynı araştırmacılar OPU-17 primerinin *F. culmorum* izolatlarıyla amplifikasyonunda 1000 bp büyüklüğünde bant oluşturduğunu bildirmişlerdir. Schilling ve ark. (1996), OPT 18 ve UBC-85 primerlerini kullanmışlar ve OPT-18 primeri *F. culmorum* izolatlarıyla amplifikasyonu sonucunda 470 bp. *F. graminearum* izolatlarının ise UBC-85 primeri ile 410 bp büyüklüğünde bant oluşturduğunu saptamışlardır. Carter ve ark. (2000), OPT-01, OPT-04, OPT-6, OPT-16, OPU-13, OPU-15 ve OPU-19 primerleri ile *F. graminearum* izolatlarının amplifikasyonu sonucunda bantlar elde etmişler ve bu primerlerin *F. graminarum* izolatlarının genetik benzerliklerini ortaya koymak için kullanılabileceklerini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada kullanılan primerlerin, *F. culmorum* ve *F. graminearum* ile amplifikasyonunda alınan sonuçlar, yukarıda bahsedilen araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Yapılan bu çalışmada *F. culmorum* için en fazla polimorfizm OPT-18 kullanılarak, *F. graminarum* için ise OPT-18 ve UBC-85 primerleri kullanarak yapılan amplifikasyon sonucunda gerçekleşmiştir. RAPD-PCR ile *F. culmorum*'un tanımlanmasında en uygun primerin OPT-01 ve OPT-18 (Nicholson ve ark., 1998; Schilling ve ark., 1996), *F. graminearum* için ise UBC-85 (Schilling ve ark., 1996) primerleri olduğu diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir.

4.12. *In vitro* Seleksiyon ile Regenere Edilen Bitkilerin Moleküler Analizi

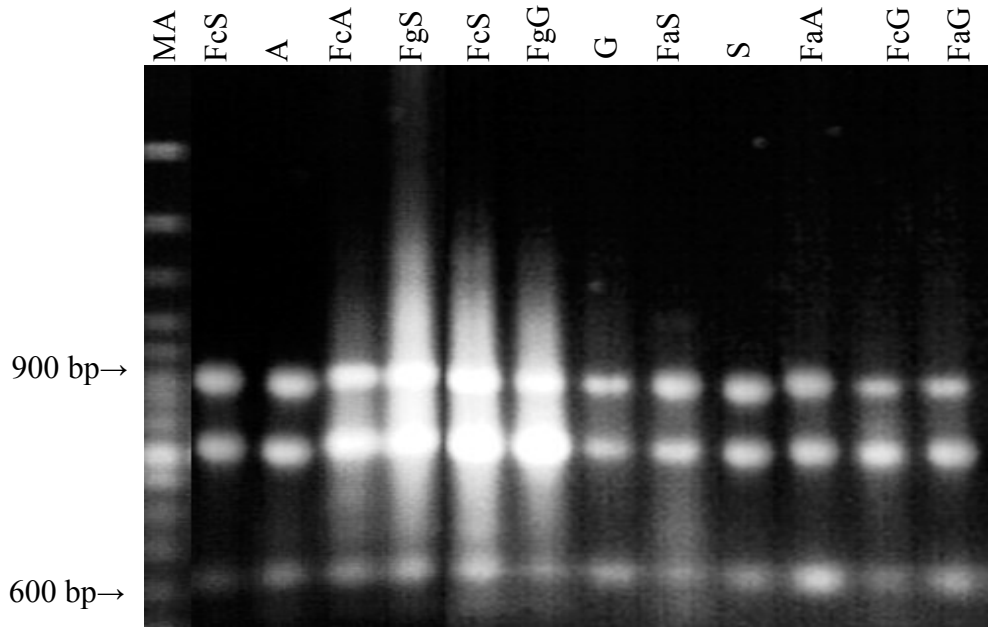
Bitkiler ile ilgili taksonomik ve filogenetik çalışmalarda morfolojik, sitogenetik analizler yapılmaktadır. Özellikle ıslah çalışmalarında ve hastalıklara dayanıklı bitki elde edilmesinde, bitkilerin genetik yapısının ve genetik farklılığın bilinmesi çok önemlidir. Moleküler markırlar kullanılarak bitki çeşitleri arasında genetik farklılıkların ortaya konulmasında RAPD analiz yöntemi başarılı bir şekilde uygulama alanı bulmuştur (Dhar ve ark., 1997; Turner ve ark., 1999; Cao ve ark., 2000; Sun ve ark., 2003; Khan ve ark., 2005).

Yapılan çalışmada, Sharp ve ark. (1988)' na göre DNA izolasyonu sonucunda bitkilere ait 50-200 ng DNA izole edilmiştir. *In vitro* seleksiyon sonucunda elde edilen bitkilerin DNA'sı ile (A: Adana 99, S: Seri 82, G: Genç 99, FaA: Fusarik asit içeren ortamda gelişen kalluslardan regenere olan Adana 99, FaS: Fusarik asit içeren ortamda gelişen kalluslardan regenere olan Seri 82, FaG: Fusarik asit içeren ortamda gelişen kalluslardan regenere olan Genç 99, FcS: *F. culmorum* kültür filtratını içeren ortamda gelişen kalluslardan regenere olan dayanıklı olduğu düşünülen Seri 82, FcG: *F. culmorum* kültür filtratını içeren ortamda gelişen kalluslardan regenere olan dayanıklı olduğu düşünülen Genç 99, FcA: *F. culmorum* kültür filtratını içeren ortamda gelişen kalluslardan regenere olan dayanıklı olduğu düşünülen Adana 99, FgG: *F. graminearum* kültür filtratını içeren ortamda gelişen kalluslardan regenere olan Genç 99, FgA *F. graminearum* kültür filtratını içeren ortamda gelişen kalluslardan regenere olan Adana 99).

Yapılan çalışmada testlenen primerlerden OPE-05, OPH-04 ve OPN-15 primerleri *in vitro* seleksiyon ile elde edilen bitki DNA'ları ile yapılan RAPD analizi sonucunda reaksiyon göstermemiştir. Çalışmada kullanılan diğer primerler amplifikasyon sonucunda bantlar oluşturmuşlar fakat polimorfizm gözlenmemiştir.

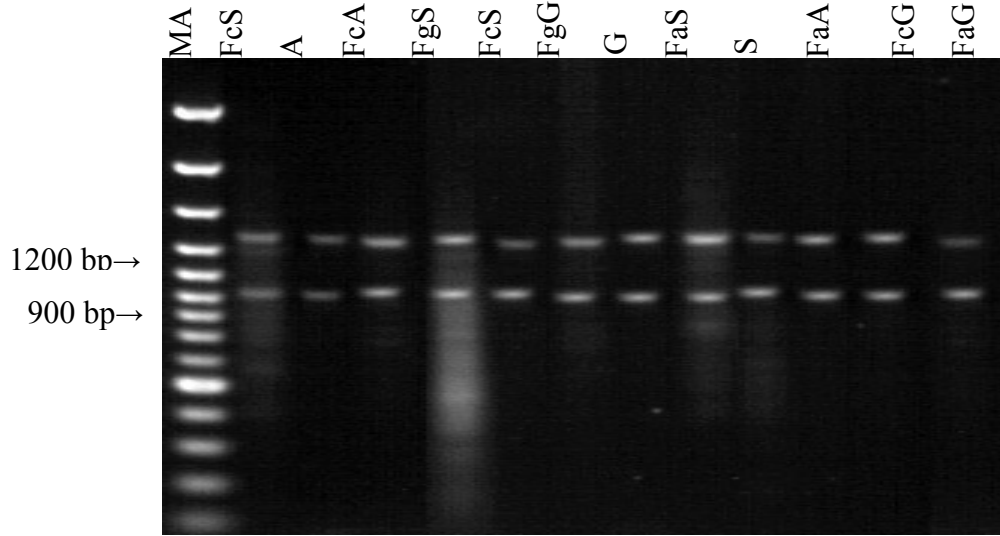
Primerler kullanılarak yapılan RAPD analizi sonucu elde edilen bantlar aşağıda verilmiştir.

Yapılan çalışmada OPA-04 primeri ile yapılan amplifikasyon sonucunda 600-900 bp büyüklüğünde bantlar oluştuğu. fakat izolatlar arasında herhangi bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.54).



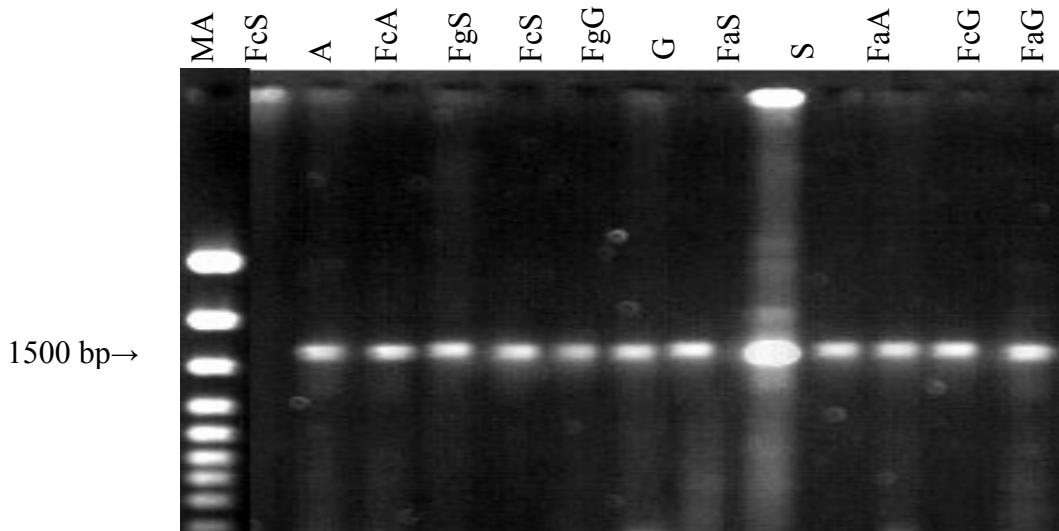
Şekil 4.54. *In vitro* seleksiyonda elde edilen bitkilerin DNA'larının OPA-04 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan PCR ürünlerinin elektroforezi sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: Adana 99, S: Seri 82, G: Genç 99, Fa: Fusarik asit, Fc: *F. graminearum*, Fc: *F. culmorum*).

OPA-05 primerinin bitki DNA'ları ile amplifikasyonu sonucunda 900-1200 bp büyüklüğünde bantlar oluşmuş, fakat bitkiler arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.55)



Şekil 4.55. *In vitro* seleksiyonda elde edilen bitkilerin DNA'larının OPA-05 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan PCR ürünlerinin elektroforezi sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: Adana 99, S: Seri 82, G: Genç 99, Fa: Fusarik asit, Fc: *F. graminearum*, Fc:*F. culmorum*).

OPD-05 primeri ile yapılan amplifikasyonda 1500 bp büyüklüğünde bant oluştuğu ve polimorfizmin gerçekleşmediği gözlenmiştir (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. *In vitro* seleksiyonda elde edilen bitkilerin DNA'larının OPD-05 primeri ile amplifikasyonu sonucu oluşan PCR ürünlerinin elektroforezi sonucundaki görüntüsü (MA: 100 bp DNA ladder, A: Adana 99, S: Seri 82, G: Genç 99, Fa: Fusarik asit, Fc: *F. graminearum*, Fc:*F. culmorum*).

Yapılan bu çalışmada OPA-4, OPA-5, OPD-5 primerleri kullanılarak yapılan RAPD-PCR analizinde elde edilen sonuçlarla Kudryavtsev ve ark., (2003) yapmış oldukları çalışmanın sonuçları ile paralellik gösterirken, Goryunova ve ark. (2004). buğday bitkilerinin OPE-05, OPH-04, OPN-15 primerleri ile yapmış oldukları amplifikasyonda polimorfik bantlar elde etmişlerdir. Kudryavtsev ve ark., (2003) buğday çeşitlerinin genetik benzerliklerini ortaya koymak için OPA-4, OPA-5, OPD-5 primerlerinin kullanılabileceklerini belirtmişlerdir.

Genel olarak çalışmada kullanılan buğday çeşitlerinin morfolojik, fizyolojik, bitki karakterleri, büyüme modeli açısından birbirine yakın olduğu ve RAPD-PCR analiz sonuçlarına göre de elde edilen bitkiler arasında herhangi genetik farklılığın olmadığı sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Somaklonal varyasyondan yararlanarak *in vitro* seleksiyonla buğday (*Triticum aestivum* L.)’da Başak Yanıklığı Hastalığı’na dayanıklı bitki elde etmek için yapılan çalışmanın sonuçları kısaca şu şekilde açıklanabilir.

1. Adana ili ve çevresinde yapılan bu çalışma sonucunda Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı’na neden olan *F. graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarının teşhisleri yapılmış ve bölgede *F.graminearum* izolatının buğday ekim alanlarında daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Laboratuvar koşullarında yapılan çalışmalar sonucunda Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı’na neden olan patojenlerin en iyi 25 °C sıcaklıkta PDA ortamı üzerinde geliştiği tespit edilmiştir.

2. Yapılan çalışmaları sonucunda elde edilen izolatların Seri 82 buğday çeşidi üzerinde yapılan patojenite testi sonucunda *F. graminearum* A-13 ve *F. culmorum* B-4 izolatının, diğer izolatlara göre daha virulent olduğu belirlenmiştir. Patojenitesi yüksek *Fusarium* ırklarıyla bölgemizde yetiştiriciliği yapılan 10 buğday çeşidi üzerinde yapılan patojenite testi sonucunda bölgemizde Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı’na karşı tolerant yada dayanıklı bir buğday çeşidinin olmadığı tespit edilmiştir. Uygulamaya tabii tutulan buğday çeşitlerinin bu hastalığa karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, Buğday Başak Yanıklığı Hastalık etmeni tüm buğday çeşitlerinin tanelerinde zararlara neden olduğu enfekteli buğday çeşitlerinin tanelerinde, özellikle Sham I ve Amanos 97, Seri 82 ve Yüreğir 99 buğday çeşitlerinin tanelerinde renk açılması, küçülme ve deformasyonlar tespit edilmiştir.

3. *In vitro* seleksiyonda kullanılan kallusları elde etmek amacıyla MS ortamı üzerinde kültüre alınan olgunlaşmamış embriyolarından en yüksek oranda kallus oluşumu, döllemeden 18 gün sonra Genç 99 buğday çeşidinde %92, olgunlaşmamış buğday tanelerinden döllemeden 18 gün sonra Seri 82 buğday çeşidinde %21 oranında, olgunlaşmış buğday tanelerinden ise en fazla kallus oluşumu Adana 99 buğday çeşidinde %70 oranında belirlenmiştir.

4. Olgunlaşmış ve olgunlaşmamış buğday embriyolarından elde edilen embriyogenik kalluslardan bitki regenerasyonunu gerçekleştirmek için kullanılan farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda hormon içeren ortamlardan en fazla bitki

regenerasyonu %32 oranında 2 mg/L BAP+0,5 mg/L IAA+%2 sakkaroz içeren MS ortamı üzerinde gerçekleşmiştir. Araştırma sonucuna göre kalluslardan bitki regenerasyonunda hormonların çok önemli bir faktör olduğu, bunun yanı sıra bitki regenerasyonun da buğday genotipinin de önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir.

5. *In vitro* seleksiyonda kullanılan lethal dozları belirlemek amacıyla *F. graminearum*, *F. culmorum* kültür filtratlarının ve fusarik asitin farklı konsantrasyonları domates ve buğday bitkisi üzerinde denenmiş ve *F. graminearum* ve *F. culmorum* kültür filtratının LD₅₀ değeri %30, fusarik asitin LD₅₀ değeri ise 0,3 mM olarak belirlenmiştir.

6. Lethal dozlar belirlendikten sonra *F. graminearum* A-13 ve *F. culmorum* B-4 izolatlarından elde edilen %30 oranında kültür filtratı ve 0.3 mM fusarik asit içeren kallus ortamı üzerinde gelişen kallusların gelişimleri kontrol olarak alınan kalluslar ile karşılaştırıldığında kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlarda düzenli olarak azalmış ve bazı kallus parçalarında gelişmeler tespit edilmiştir. Kallusların 3. alt kültüre alınmaları sonunda fusarik asit içeren ortamlar üzerindeki kallusların gelişiminde %20-36 arasında önceki aya oranla bir artış tespit edilmiştir. Kontrol olarak alınan hücrelerde 3. alt kültürde bir önceki aya göre çeşitler arasında farklılık olmasına rağmen bu artış %62-72 arasında olmuştur. Kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlar üzerinde gelişen kallusların gelişmelerinde 3. ve 4. alt kültürlerde bir sapma gözlenmemiştir.

7. *F. graminearum* A-13 ve *F. culmorum* B-4 izolatlarından elde edilen %30 oranında kültür filtratı ve 0.3 mM fusarik asit içeren kallus ortamı üzerinde canlı kalan kalluslar bitki regenerasyonu için 0.5 mg/L IAA+1 mg/L BAP+ %2 sakkaroz içeren katı MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Daha sonra regenere olan bitkiler 1/2 MS+1 mg/l NAA+ %2 sakkaroz içeren ortamlar üzerinde kültüre alınarak köklendirilmesi sağlanmıştır. Yapılan araştırmalarda bitki eldesinde kritik dönemlerden birisinin de toprağa adaptasyon aşaması olduğu gözlenmiştir. Bu aşamada evapotranspirasyonu önlemek için bitkilerin 7-10 gün süre ile polietilen plastik torbalar altında tutulması ya da mislemenin yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Buna rağmen regenere olan çok sayıda bitki, toprak adaptasyonu aşaması sırasında kaybedilmiştir.

8. Kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlar üzerinde selekte edilen kalluslardan bitkiler regenere edilmiş, başak oluşturulmuş, ancak bu bitkilerden tane elde edilememiştir. Bunun başlıca nedeni buğday tanesinin oluşması için gerekli sıcaklık ve ışık faktörünün tam olarak sağlanmamasından ve uzun süre kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortam üzerinde alt kültüre alınan kallusların varyasyona uğramasıyla ortaya çıkan farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

9. Adana ili ve çevresinden buğday tarlalarından toplanan hastalıklı bitki örneklerinden elde edilen 10 adet *F. graminierum* ve 10 adet *F. culmorum*'a ait izolatlar arasındaki genetik farklılıkları belirlemek için RAPD analizi (Randomly Amplified Polimorphic DNA) yapılmıştır. Çalışmada OPERON serisinden 10 primer kullanılmış ve testlenen primerlerden OPU-17, *F. culmorum* izolatlarıyla, OPU-19 ve OPU-17 primerleri *F. graminearum* izolatlarıyla yapılan RAPD analizi sonucunda reaksiyon göstermemiştir. *F. culmorum* ile primerlerin RAPD-PCR ile amplifikasyon sonucu elde edilen bant pozisyonundan 27 bant da, *F. graminearum* ile primerlerin amplifikasyonu sonucunda elde edilen bant pozisyonundan 9 bant da, polimorfizm gözlenmiştir. *F. culmorum* için en fazla polimorfizm OPT-18 kullanılarak, *F.graminarum* için ise OPT-18 ve UBC-85 primerleri kullanarak yapılan amplifikasyon sonucunda gerçekleşmiştir. *Fusarium* spp'nin klasik yöntemlerle sınıflandırılması ve teşhis edilmesinde bazı problemlerle karşılaşılmaktadır. Bu nedenle, fitopatojen fungusların teşhisi ve sınıflandırılmasında klasik yöntemlerin moleküler biyoloji içerisinde yer alan yöntemlerden bazılarıyla desteklenmesi sağlıklı sonuç alınması bakımından yararlı olacaktır.

10. Kültür filtratı ve fusarik asit içeren kallus ortamı üzerinde canlı kalan kalluslardan regenere edilen bitkiler arasındaki olası genetik farklılığı belirlemek amacıyla RAPD-PCR analizleri yapılmıştır. RAPD-PCR analiz sonuçlarına göre de elde edilen bitkiler arasında herhangi genetik farklılığın olmadığı sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmalarda in vitro seleksiyonla elde edilen bitkilerde tek bir genotipte farklılık tespit edilememiştir. Bunun nedeni; bazı duyarlı hücreler seleksiyon aşamasında dayanıklı hücreler tarafından korunabilmektedir. Duyarlı olan bu hücreler gayri muntazam olup, dayanıklı kalluslar olarak tahmin edilmekte ve bu hücrelerden bitki regenerasyonu olabilmektedir. Bunun için seleksiyonda kullanılan

kallus parçalarının kültür filtratı ve toksin içeren ortamlar üzerinde mümkün olduğunca küçük kütleler halinde kültüre alınması gerektiği ileri sürülmektedir. Bunun dışında arzu edilen dayanıklılık sadece hücre düzeyinde kalabilmekte ve bu dayanıklılık *in vitro*'da gelişme döneminde kaybolabilmektedir.

11. Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na neden olan etmenin buğday tanelerinin çimlenmesine ve kök gelişimine etkisini belirlemek amacıyla %30 oranında *F. graminearum* A-13, *F. culmorum* B-4 izolatlarından elde edilen kültür filtratı ve 0.3mM fusarik asit içeren ortam üzerinde çimlendirme denemesi yapılmıştır. Alınan sonuçlara göre her iki fungusu ait %30'luk kültür filtratının ve fusarik asit uygulamasının buğday tohumlarının çimlenmesini engellediği saptanmıştır.

Yapılan bu araştırma ile somaklonal varyasyondan yararlanarak *in vitro* seleksiyon ile son zamanlarda buğdayın en önemli hastalıkları arasında yer alan Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklı hatlar elde etmek amaçlandıysa da, *in vitro* seleksiyon sonucunda regenerere edilen bitki DNA'ları kullanılarak yapılan RAPD-PCR sonuçlarına göre söz konusu bu bitkiler arasında genetik bir farklılık saptanamamıştır. Farklılığın ortaya çıkmamasında kullanılan yöntemin yetersiz olması söz konusu olabileceği gibi buğdaydan elde edilen embriyogenik kallusların göreceli olarak kısa sürede regenerasyon yeteneğini kaybetmesi nedeniyle uzun süre kallus olarak kültüre alınamaması da etkili olmuş olabilir. Bu nedenle ileriki çalışmalarda varyasyonu artırmak için kimyasal ve fiziksel mutagenlerden yararlanılması, amaca ulaşılmasında etkin sonuçlar verebilir. Diğer taraftan her geçen gün dünya buğday verim ve kalitesini, buna bağlı olarak insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen, etkin bir kimyasal mücadelesi ve dayanıklı buğday çeşidi olmayan ve günümüzün en güncel araştırma konuları arasında yer alan adı geçen hastalığa karşı dayanıklı genlerin izolasyonu ve izole edilen bu genlerin çeşitli gen transferi yöntemleriyle verim ve kalitesi yüksek buğday çeşitlerine aktarılması ile ilgili araştırmalara ağırlık verilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- AHLOOWALIA, B.S., 1982. Plant Regeneration from Callus Culture in Wheat. Crop Science, 22: 405-410.
- AKINSANMI, O.A., MILLER, V., SIMTENDORFER, S., BACKHOUSE, D., AND CHAKRABORTY, S., 2004. Identity and Pathogenicity of *Fusarium* Spp. Isolated from Wheat fields in Queensland and Northern New South Wales. Australasian. L. Agric. Res., 55: 97-107.
- AKTAŞ, H. ve B. TUNALI, 1993. Konya ilinde Buğdayın Bazı Hastalık Sorunları ve Çözüm Yolları. 1. Konya'da Hububat Tarımının Sorunları ve Çözüm Yolları Semp.12-14 Mayıs 1993, Konya, 247-255.
- AKTAŞ, H.E., BOSTANCIOĞLU, H., TUNALI, B., and BAYRAM, E., 1996. Determination of the Root Rots Disease Agents, Their Interference with Cultural Practices and Evaluation of Varieties and Lines Against to Important Ones in Sakarya Region. Plant Protect. Bull., 36: 151-167.
- AKTAŞ, H.E., KINACI, E., YILDIRIM, A.F., SAYIN, L., and KURAL, A., 1999. Determination of Root and Foot Rot Pathogens Which are Problems in Konya Province and Research and Solution. Cereal Symposium Book. Konya, 392-403.
- ANDERSEN, A.L., 1948. The Development of *Giberella zeae* Head blight of Wheat. Phytopathology, 38: 595-611.
- ANONYMUS, 2001. Tarım Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü.
- ANONYMUS, 2002. Adana Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsü.
- ARTHUR, J.C., 1891. Wheat Scab. Indian Agric. Exp. St. Bull. 36: 192-32.
- ARUN, B., JOSHI, A.K., CHAND, R. and SINGH, B.D., 2003. Wheat Somaclonal Variants Showing Earliness, Improved Spot Blotch Resistance and Higher Yield. Euphytica, 132: 235-241.
- BADEA, M.E., SANDULESCU, D., GOZIA, O., RADUTOIU, S.E., RAICU, P., and GORENFLOT, R., 1997. Effets du Filtrat de Culture de *Fusarium graminearum* Et de La Température Sur l'embryogenèse Somatique Chez

- Triticum Aestivum* L. Revue de Cytologie Et Biologie Végétales. Le Botaniste, 20 (2): 3-10.
- BAHRI, G.H., and SHANER, G., 1994. Scab of wheat: Prospect for Control. Plant Dis., 78: 760-766.
- BAI, G.H., 1996. Variation in *Fusarium graminearum* and Cultivar Resistance to Wheat Scab Plant Disease, 80 (9): 975-979.
- BAI, G.H., PLATTNER, R., DESJARDINS, A. and KOLP, F., 2001. Resistance to Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Accumulation in Wheat. Plant Breeding, 120: 1-6.
- BAJAJ, Y.P.S., 1984. The Regeneration of Plants from Frozen Pollen Embryos and Zygotic Embryos of Wheat and Rice. Theor. App. Genet., 67: 525-528.
- BANNIKOVA, V.P., and BARABANOVA, E.A., 1990. Induction and Histological Features of Somatic Embryogenesis in the Tissue Culture of Gramineae. Sitologiya Genetika, 24(2): 61-68
- BARRO, F., MARTIN, A., LAZZERI, P.A., and BARCELO, P., 1999. Medium Optimization for Efficient Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Inflorescences and Immature Scutella of Elite Cultivars of Wheat, Barley and Tritordeum. Euphytica, 108: 161-167.
- BENKIRANE, H., KARIMA, S., CHLYAH, A. and CHLYAH, H., 2000. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Fragments of Immature Inflorescences and Coleoptiles of Durum Wheat. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 61: 107-113.
- BILDANOVA, L.L., SALINA, E.A., and PERSHINA, L.A., 2002. Investigation of the Backcross Progeny of Barley–Wheat Hybrids by the RAPD and RAMPO Methods. Russian Journal of Genetics, 38 (3): 257-263
- BOOTH, C., 1977. Fusarium: Laboratory Guide to the Identification of the Major Species. Common Wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 58 pp.
- BOZORGIPOUR, R. and SNAPE, J.W., 1997. An Assessment of Somaclonal Variation as a Breeding Tool for Generating Herbicide Tolerant Genotypes in Wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica, 94: 335-340

- BRAUN, H.J., ZENCIRCI, N., ALTAY, F., ATLI, M., AVCI, M., ESER, V., KAMBERTAY, M., and PAYNE, T.S., 2001. Turkish Wheat Pool. pp. 851-879. In A. P. Bonjean and W.J. Agnus (Ed.) The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding. Lavosier Pupliching, Paris.
- BRUINS, M.B.M., KARSAI, I., SCHEPERS, J., and SNIJDERS, C. H. A., 1993. Phytotoxicity of Deoxynivalenol to Wheat Tissue with Regard to *In Vitro* Selection for Fusarium Head Blight Resistance. *Plant Sci.*, 94: 195-206.
- BRYAN, G.J., DIXON, A., GALE, M.D and WISEMAN, G., 1998. A PCR-Based Method for the Detection of Hexaploid Bread Wheat Adulteration of Durum Wheat and Pasta. *Journal of Cereal Science*, 28: 135-145.
- BUERSTMAYR, H., LEMMENS, M., HART, L., DOLDI, P., STEINER, B., STIER-STEINER, M., and RUCKENBAUER, P., 2002. Molecular Mapping of QTLs For Fusarium Head Blight Resistance In Spring Wheat I: Resistance to Fungal Spread (Type II Resistance). *Theor. Appl. Genet.*, 104: 84-91.
- BUERSTMAYR, H., LEMMENS, M., GRAUSGRUBER, H., MOULE, F., FIDESSER, F., and RUCKENBAUER, P., 2004. Fusarium Head Blight on Wheat. <http://grain.jouy.inra.fr/ggpages/awn/417awn41a11.html>
- CAI, X., R.W. STACK, R.C. FROHBURG, AND S.S. MAAN. 2003. Genetic Characterization of Fusarium Head Blight Resistance in Spring Wheat. *Proc. Tenth Int. Wheat Genetics. Symp.* 3:1108-1110.
- CAO, W., HUCL, P., SCOLES, G.J., and CHIBBAR, R.N, 1998. Genetic Diversity within Spelta and Macha Wheats Based on RAPD Analysis. *Euphytica*, 104: 181-189.
- CAO, W., SCOLES, G.J., HUCL, P., and CHIBBAR, R.N., 2000. Phylogenetic Relationships of Five Morphological Groups of Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell) Based on RAPD Analysis. *Genome*, 43: 724-727.
- CARTER, J.P., REZANOOR, H.N., DESJARDINS A.E., and Nicholson, P., 2000. Variation in *Fusarium graminearum* Isolates from Nepal Associated with Their Host of Origin. *Plant Pathology*, 49: 452-460.
- CARTER, J.P., REZANOOR, H.N., HOLDEN, D., DESJARDINS, A.E, PATNER R.D., and NICHOLSON P., 2002. Variation in Pathogenity Associated with

- The Genetic Diversity of *Fusarium graminearum*. European J. Plant Pathology 108: 573-583.
- CHAWLA, H.S., and WENZEL, G., 1987. In Vitro Selection for Fusaric Acid Resistance Barley Plants. Plant Breeding, 99: 159-163.
- CHEN, L.S., MCCORMICK, P., and HOHN, T. M., 2000. Altered Regulation of 15-Acetyldeoxynivalenol Production in *Fusarium graminearum*. Applied and Environmental Microbiology, 66 (5): 2062-2065.
- CHEN, W.Q., and SWART, W.J. 2002. The *In Vitro* Phytotoxicity of Culture Filtrates of *Fusarium oxysporum* to Five Genotypes of *Amaranthus hybridus*. Euphytica, 127: 61-67.
- CULLEN, D., CALDWELL, R.W., and SMALLEY, E.B., 1982. Cultural Characteristics, Pathogenicity, and Zerealenone Production by Strains of *Giberella zeae* Isolated From Corn. Phytopatholog, 72: 1415-1418.
- CURIR, P., GUGLIERI, L., DOLCI, M., CAPPONI, A., and AURINO, G., 2000. Fusaric Acid Production by *Fusarium oxysporum* f.sp.lilii and Its Role in The Lily Basal Rot Disease. European Journal of plant Pathology, 106: 849-856.
- DELPORTE, F., MOSTADE, O., and JACQUEMIN, J.M., 2001. Plant Regeneration through Callus Initiation from Thin Mature Embryo Fragments of Wheat. Plant Cell Tiss. Org. Culure, 67: 73-80.
- DERVIŞ, S., 1999. Screening of Wheat Varieties for Resistance to Head Scab Caused by *Fusarium graminearum* Schwabe. Turk. J. Agric. For. 25: 37-43.
- DEVOS, K.M., and GALE, M.D., 1992. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Wheat. Theor. Appl. Genet., 84: 567-572.
- DHAR, A.K., POKRAS, M.H., GARCIA, D.K., EVERS, D.C., and GORDON, Z.J., 1997. Analysis of Genetic Diversity in Common Loon *Gavia immer* Using RAPD and Mitochondrial RFLP Techniques. MOLECULAR Ecology, 6: 581-586.
- DOOHAN, F.M., PARRY, D.W., JENKINSON, P., and NICHOLSON, P., 1998. The Use of Specific-Specific PCR-Based Assays to Analyse Fusarium Ear Blight of Wheat. Plant Pathology, 47, 197-205.

- DOOHAN, F.M., PARRY, D.W., and NICHOLSON, P., 1999. Fusarium Ear Blight of Wheat, The Use of Quantitative PCR and Visual Disease Assessment in Studies of Disease Control. *Plant Pathology*, 48, 209-217.
- EVANS, C.K., XIE, W., DILL-MACKY, R., and MIROCHA, C.J., 2000. Biosynthesis of Deoxynivalenol in Spikelets of Barley Inoculated with Macroconidia of *Fusarium graminearum* Plant Disease, 84: 654-660.
- FADEL, F., and WENZEL, G., 1993. *In Vitro* Selection for Tolerance to *Fusarium* in F₁ Microspore Populations of Wheat. U.S. Copyright Clearance Center Code Statement. *Plant Breeding*, 110: 89-95.
- FELFÖLDI K., and PURNHAUSER, L., 1992. Induction of Regenerating Callus Cultures from Immature Embryos of 44 Wheat and 3 Triticale Cultivars. *Cereal Research Communication*, 20 (3-4): 273-277.
- FELIX D'MELLO, J.P., MACDONALD, A.M.C., POSTEL, D., DIJKSMA, W.T.P., DUJARDIN, A., and PLACINTA C.M., 1998. Pesticide Use and Mycotoxin Production in *Fusarium* and *Aspergillus* Phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 104 (8): 741-751
- FENNEL, S., BOHOROVA, N., VAN GINKEL, M., CROSSA, J., and HOISINGTON, D., 1996. Plant Regeneration from Immature Embryos of 48 Elite CIMMYT Bread Wheats. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 163-169.
- GALIO-MEAGNER, M., 2003. RFLP Subsraction, A Molecular Method for Identifying *Fusarium graminearum* Strains. <http://www.smallgrains.org/research/>
- GALLIC, M.T., 1989. Importancia Y Distrubicion De La Fusariosis Del Trigo En Argentina. in: Taller Sobre La Fusariosis De La Espiga En America Del Sur. M.M. Kohli(Ed). Mexico, D.F: CIMMYT.
- GARGOURI, S., BERNIER, L., HAJLAOUI, M.R., and MARRACKCHI, M., 2003. Genetic Variability and Population Structure of The Wheat Foot Rot Fungus, *F. culmorum*, In Tunisia. *European J. Plant Pathology*, 109: 807-815.
- GELDERBLOM, W.C., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F., THIEL, P.G., HORAK, R.M., VLEGGGAAR, R., and KRIEK NP., 1998. Fumonisin-Novels

- Mycotoxins With Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium Moniliforme*. Appl Environ Microbiol. , 54(7):1806–1811
- GERLACH, W., and NIRENBERG, H.J., 1982. The Genus *Fusarium*. A Pictorial Atlas. Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 406 Pp.
- GILBERT, J., ABRAMSON, D., MCCALLUM, B., and CLEAR, R., 2001. Comparison of Canadian *Fusarium graminearum* Isolates for Aggressiveness, Vegetative Compatibility, and Production of Ergosterol and Mycotoxins. Mycopathologia, 153: 209-215.
- GONZALES, J.M., FRIERO, E., and JOUVE, N., 2001. Influence of Genotype and Culture Medium on Callus Formation and Plant Regeneration from Immature Embryos of *Triticum turgidum* Desf. Cultivars. Plant Breeding, 120: 513-517.
- GORAL, T., and ARSENIUK, E., 1997. Somaclonal Variation in Winter Triticale for Resistance to *Fusarium* Head Blight. Cereal research Communications, 25: (2-3), 741-742.
- GORYUNOVA, S. V., KOCHIEVA, E. Z., CHIKIDA N. N., and PUKHALSKIY, V. A., 2004. Phylogenetic Relationships and Intraspecific Variation of D-Genome *Aegilops* L. as Revealed by RAPD Analysis. Russian Journal of Genetics, 40(5): 515–523.
- GU, X., and LIANG, G.H., 1997. Plantlet Regeneration from Protoplast-Derived Haploid Embryogenic Calli of Wheat. Plant Cell, tissue and Organ Culture, 50: 139-145.
- GÜMÜŞTEKİN, and K.AKIN, 1998. Trakya Bölgesin’ de Buğday Islah Çalışmaları Kapsamında Islah Edilen Yeni Hatların Buğday Kök Hastalıkları ve Paslara Karşı Reaksiyonlarının Tespiti. <http://veri.tagem.gov.tr/cgi-bin/isis3w.exe>
- HARRIS, L.J., 1999. Possible Role of Trichothecene Mycotoxins in Virulence of *Fusarium graminearum* on Maize. Plant Disease, 83(10): 954-960.
- HART, L. P. and SCHABENBERGER, O., 1998. Variability of Vomitoxin In Truckloads Of Wheat. in: An Wheat Scab Epidemic Year. Plant Disease (1998) 82: 625 – 630

- HE, G.Y., and LAZZERI, P.A., 2001. Improvement of Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Durum Wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* Desf.) Scutellum and Inflorescence Cultures. *Euphytica*, 119, 369-376.
- HEKİMHAN, H., BAGCI, A., NICOL, J., ARISOY, T., and SAHIN, S., 2004. Dryland Root Rot: A Major Threat to Winter Cereal Production Under Sub-Optimal Growing Conditions. 4th Intl. Crop. Sci. Congress, 26-1 Oct. Brisbane, Australia. www.regional.org.au/au.cs
- HIDALGO, O. B., SANTOS, R., TUSSEL, R. T., PIRES DE MATOS, A., and CABRAL, R. S., 1999. Phytotoxicity of *Fusarium subglutinans* Culture Filtrates on *In Vitro* Plantlets and Cali of Resistant and Susceptible Pineapple (*Ananas comosus*). *Plant Pathology*, 48: 756-758.
- IRETA, J.M., and LILCHRIST L.S., 1994. Fusarium Head scab of Wheat (*Fusarium graminearum* Schwabe). Wheat Program Special Report. WPSR No.21b
- IVANOV, P., ANATANSSOV, Z., MILKOVA, V., and NIKOLAVA, L., 1998. Culture Selected Somaclonal Variation in Five *Triticum aestivum* L. Genotypes. *Euphytica*, 104: 167-172.
- JIMENEZ, V.M., and BANGERTH, F., 2001. Endogenous Hormone Concentrations and Embryogenic Callus Development in Wheat. *Plant Cell, tissue and Organ Culture*, 67: 37-46.
- JIN, H., HARTMAN, G. L., NICKELL, C. D., and WIDHOLM, J. M., 1996. Characterization and Purification of a Phytotoxin Produced by *Fusarium solani*, The Causal Agent of Soybean Sudden Death Syndrome. *Biochemistry and Cell Biology*, 86 (3): 277-282.
- KASEM Z. A., MESTERHAZY, A., and SAGI, F., 1991. *In vitro* Techniques for Selecting Wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium*-Resistance. I. Double-Layer Culture Technique. *Euphytica*, 57: 251-257.
- KASEM, A.Z. and SAGI, F., 1993. Culture of and Fertile Plant Regeneration from Regenerable Embryogenic Suspension Cell-Derived Protoplast of Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Plant Cell Report*, 12: 175-179.
- KASEM Z. A., MESTERHAZY, A., BARTOK, T., and SAGI, F., 1996. *In vitro* Techniques for Selecting Wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium*-

- Resistance. II. Culture Filtrate Technique and Inheritance of *Fusarium*-Resistance in The Somaclones. *Euphytica*, 91: 341-349.
- KHAN, I.A., AWAN, F.S, AHMAD, A., FU, Y.B., and IQBAL, A., 2005. Genetic Diversity of Pakistan Wheat Germplasm As Revealed by RAPD Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 239-244
- KIM, S.C, and KIM, S.G., 1989. Plant Regeneration from Single Cell Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *The Korean Journal Of Botany*, 32(4): 227-233.
- KOHLI, M.M., 1989. Analisis De La Fusariosis Del Trigo En El Cono Sur. In: Taller Sobre La Fusariosis De La Espiga En America Del Sur. M.M. Kohli (Ed). Mexico, D.F.: CIMMYT.
- KUDRYAVTSEV A.M., MARTYNOV, S.P., BROGGIO, M., and PUKHALSKIY, V. A., 2003. Relevance of RAPD Analysis for Revealing Phylogenetic Relationships between Cultivars of Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.). *Russian Journal of Genetics*, 39(9): 1043–1051.
- LANGEVIN, F., EUDES, F., COMEAU, A., 2004. Effect of Trichothecene Produced by *F. graminearum* During Fusarium Head Blight Development In Six Cereal Species. *European Journal Of Plant Pathology* **110**, 735–46.
- LATUNDE-DADA, A.O., and LUCAS, J.A., 1988. Somaclonal Variation And Resistance to Verticillium Wilt In Lucerne Medicago Sativa L., Plants Regenerated from Callus. *Plant Science*, 58: 111-119.
- LEE, B., 1989. Cereal Transformation. *Plant Today*, 9-11.
- LIJUAN G., QINGXIAO, Y., and QIDE, H., 1991. Studies on Screening Resistant Mutants of Wheat to *Fusarium graminearum* by Tissue Culture. *Genetic Manipulation in Plants*, 7(1): 25-33.
- LIU Z-Z, CHEN Q-Q, YAO Q-H, HUANG X-M, LU S-H, WEI C-M, SUN X-J, ZHANG F-Q, and TANG Y-L., 1991. Growth Hormone-Like Action of Deoxynivalenol Toxin On Induction and Differentiation of Wheat Calli. *Acta Agriculture Shanghai*, 7:1-7.
- MACHII, H., MIZUNO, H., HIRABAYASHI, T., LI, H., and HAGIO, T., 1998. Screening Wheat Genotypes for High Callus Induction and Regeneration

- Capability from Anter and Immature Embryo Cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 53: 67-74.
- MAIER, F.J and OETTLER, G., 1996. Genetic Variation for Head Blight Resistance in Triticale Caused by *Fusarium graminearum* Isolates of Different Deoxynivalenol Production. *Euphytica*, 89: 387-394.
- MAIER, F.J., and OETTLER, G., 1992. Selection for The Fusarium Toxin Deoxynivalenol in Callus Cultures of Triticale. *IHAR Radzikow*, 37 (1-4): 43-49.
- MARASAS, W.F.O., JASKIECZ, K., VENTER, F.S. and VAN SCHALKWYK, D.J., 1988. *Fusarium Moniliforme* Contamination of Maize in Oesophageal Cancer Areas In Transkei. *South Africa Medical Journal*, 74: 110-114.
- MESTERHAZY, A., BARTOK, T., MIROCHA, C.G., and KOMOROCZY, R., 1999. Nature of Wheat Resistance to Fusarium Head Blight and The Role of Deoxynivalenol for Breeding. *Plant Breeding*, 118: 97-110.
- MESTERHAZY, A., BARTOK, T., and LAMPER, C., 2005. Influence of Wheat Cultivar, Species of Fusarium and Isolate Aggressiveness On the Efficacy of Fungicides for Control of Fusarium Head Blight. *Plant Disease*, 87(9):1107-1115.
- MIEDANER, T., REINBRECHT, C., LAUBER, U., SCHOLLENBERGER, M., and GEIGER, H.H., 2001. Effects of Genotype Environment Interaction on Deoxynivalenol Accumulation and Resistance to Fusarium Head Blight in Rye, Triticale, and Wheat. *Plant Breeding*, 120: 97-105.
- MÖLLER, J.M., 1973. Mykotoxine in Futtermitteln. *European Food Research and Technology*, 151(4):231-236
- MURASHIGE, T., and SKOOG, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth And Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- MURAT-ÇAVUŞOĞLU, N., ve HANCIOĞLU, Ö., 1995. Ankara İli Buğday Ekim Alanlarında Kök ve Kök Boğazı Hastalıklarına Neden Olan Fusarium Türlerinin Tespiti Üzerine Araştırmalar.VII.Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 174-177.

- NACMIAS, A., BARASH, I., SOLEL, Z., ve STROBEL, G. A., 1977. Purification and Characterization of Phytotoxin Produced by *Phoma Tracheiphila*, The Causal Agent of Mal Secco Disease of Citrus. *Physiological Plant Pathology*, 10: 147-157.
- NADEL, B., and SPIEGEL-ROY, 1987. Selection of Citrus Lemon Cell Culture Variants Resistant to the Mal Secco Toxin. *Physiological Plant Pathology*, 23: 241-244.
- NEHRA, N.S., CHIBBAR, N.R., LEUNG, N., CASWELL, K., MALLARD, C., STINHAUER, L., BAGA, M., and KARTHA, K.K., 1994. Self- Fertile Transgenic Wheat Plants Regenerated from Isolated Scutellar Tissues Following Microprojectile Bombardment with Two Distinct Gene Constructs. *Plant J.*, 5: 285-297.
- NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A., and MARASAS, W.F.O., 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State Univ. Press, University Park & London, 193 pp.
- NELSON, P.E., 1993. Fumonisin, Mycotoxins Produced by *Fusarium* Species, Biology, Chemistry and Significance. *Annu. Rev. Phytopathology*, 31: 233-252.
- NETTO, N., and GIORDANI, N.A., 1989. Control Químico De La Fusariosis Del Trigo. In: Taller Sobre La Fusariosis De La Espiga En America Del Sur. M.M. Kohli (Ed). Mexico, D.F.: CIMMYT.
- NGANJE, W.E., KATIEBIE, S., WILSON, W.W., LEISTRITZ, FL. and BANGSUND, DA., 2004. Economic Impacts of *Fusarium* Head Blight In Wheat And Barley: 1993-201. North Dakota State University Agribusiness and Applied Economics Report, 538: 53 pp.
- NICHOLSON, P., JENKINSON, P., REZANOOR, H.N., and PARRY, D.W., 1993. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Variation in *Fusarium* Species Causing Ear Blight of Cereals. *Plant Pathology*, 42: 905-914.
- NICHOLSON, P., SIMSON, D.R., WESTON, G., REZANOOR, H.N., LEES, A.K., PARRY, D.W., and JOYGE, D., 1998. Detection and Quantification of

- Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in Cereal Using PCR Assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53: 17-37.
- OZIAS-AKINS, P., and VASIL, I.K., 1982. Plant Regeneration from Cultured Immature Embryos and Inflorescences of *Triticum aestivum* L. (Wheat): Evidence for Somatic Embryogenesis. *Protoplasma*, 110(2): 95-105.
- ÖZGEN, M., TÜRET, M., and AVCI, M., 2001. Cytoplasmic Effect on The Tissue Culture Response of Callus from Winter Wheat Mature Embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 64: 81-84.
- PARRY, D.W., and NICHOLSON, P., 1996. Development of a PCR Assay to Detect *Fusarium poae* in Wheat. *Plant Pathology*, 45: 383-391.
- PEEVER, T.L., CANIHOS, Y., OLSEN, L., IBANEZ, A., LIU, YC., and TIMMER, L.W., 1999. Population Genetic Structure and Host Specificity of *Alternaria* Spp. Causing Brown Spot of Minneola Tangelo and Rough Lemon in Florida. *Phytopathology*, 89: 851-860.
- PELLEGRINESCHI, A., BRITO, R.M., MCLEAN, S., and HOISINGTON, D., 2004. Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and NaCl on The Establishment of Callus and Plant Regeneration in Durum and Bread Wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77: 245-250.
- QIAO, Y.M., CATTENEO, M., LOCATELLI, F., and LUPATTO, E., 1992. Plant Regeneration from Long Term Suspension Culture-Derived Protoplast of Hexaploid Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 11: 262-265.
- QUELLET, T., and SEIFERT, K.A., 1993. Genetic Characterization of *Fusarium graminearum* Strains Using RAPD and PCR Amplification. *Genetics*, 83 (9): 1003-1007.
- REDWAY, F.A., VASIL, V., LU, D., and VASIL, K., 1990. Identification of Callus Types for Long-Term Maintenance and Regeneration from Commercial Cultivars of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. App. Genet.*, 79: 609-617.
- REIS, E.M. 1989. Fusariosis: Biología Y Epidemiología De *Gibberella Zeae* En Trigo. In M.M. Kohli, Ed. Taller Sobre La Fusariosis De La Espiga En America Del Sur. Mexico, DF, CIMMYT.

- REMOTTI, P.C., LÖFFLER H.J.M., and VLOTEN-DOTING L.V, 1997. Selection of Cell-Lines and Regeneration of Plants Resistant to Fusaric Acid from *Gladiolus X grandiflorus* cv. 'Peter Pears'. *Euphytica*, 96: 237-245.
- SAARI, E.E., and WILCOXON, R.D., 1974. Plant Disease Situation of High-Yielding dwarf Wheats in Asia and Africa. *Ann.Rev. Phytopathology*, 12: 49-68.
- SCHILLING, A.G., MÖLLER, E.M., and GEIGER, H.H., 1996. Polymerase Chain Reaction-Based Assays for Species-Specific Detection of *Fusarium culmorum*, *F.graminearum*, and *F.avenaceum*. *Molecular Plant Pathology*, 86(5): 515-522.
- SEARS, R.G., and DECKARD, E.L., 1982. Tissue Culture Variability in Wheat: Callus Induction and Plant Regeneration. *Crop Science*, 22: 546-550.
- SHARP, P.J., KREIS, M., SHEWRY, P.R., and GALE, M.D., 1988. Location Of B-Amylase Sequences In Wheat and Its Relatives. *Theo.Apll.Genet.*, 75: 286-290.
- SIMSON, D.R., REZANOOR, H.N., PARRY, D.W., and NICHOLSON, P., 2000. Evidence for Differential Host Preference in *Microdochium nivale* var. *majus* and *Microdochium nivale* var. *nivaele*. *Plant Pathology*, 49: 261-268.
- SNIDJERS, C.H.A., 1989. Current Status Of Breeding Wheat for Fusarium Head Blight Resistant and Mycotoxin Problem In The Netherlands. Foundation of Agricultural Plant Breeding, Wageningen. Taller Sobre La Fusariosis De La Espiga En America Del Sur. M.M. Kohli(Ed). Mexico, D.F.: CIMMYT. pp.141-144.
- SNIDJERS, C.H.A., 1990 a. Diallel Analysis of Resistance to Head Blight Causes by *Fusarium Culmorum* In Winter Wheat. *Euphytica*, 50: 1-9.
- SNIDJERS, C.H.A., 1990 b. The Inheritance of Resistance To Head Blight Caused by *Fusarium Culmorum* In Winter Wheat. *Euphytica*, 50: 11-18.
- STACK, R.W., and MULLEN, M.P., 1985. Head Blight Potential of Fusarium Species Associated with Spring Wheat Head. *Can. J. Plant Pathol.*, 7: 79-82.
- STRANGE R.N., MAJER, J.R., and SMITH, H., 1974. The Isolation and Identification of Choline and Betaine As Two Major Components in Anters

- and Wheat Germ that Stimulate *Fusarium graminearum* *in vitro*. *Physiol. Plant Pathol.* 4: 277-290.
- SUN, G., BOND, M., NASS, H., MARTIN, R., and DONG, Z., 2003. RAPD Polymorphisms in Spring Wheat Cultivars and Lines with Different Level of Fusarium Resistance. *Theor. App.Gen.* 106: 1059-1067.
- SWOFFORD, D. L. 1993. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Vers. 3.1.1. Washington, DC: Smithsonian Institution
- TEICH, A.H., and NELSON, K., 1984. Survey of Fusarium Head Blight and Possible Effect of Cultural Practices In Wheat Fields In Lambton Country In 1983. *Can. J. Plant Dis. Surv.* 64(1): 11-13.
- TURNER, A.S., O'HARA, R.B., REZENOR, H.N., NUTTALL, M., SIMITH, J.N., and NICHOLSON, P., 1999. Visual Disease and PCR Assessment of Stem Base Diseases in Winter Wheat. *Plant Pathology*, 48: 742-748.
- VAN ASCH, M. A. J., RIJKENBERG, F. H. J., and COUTINHO, T. A., 1992. Phytotoxicity of Fumonisin B₁, Moniliformin, and T-2 Toxin to Corn Callus Cultures. *Phytopathology*, 82(11): 1330-1332.
- VASI, V., REDWAY, F., and VASIL, I.K., 1990. Regeneration of Plants from Immature Embryogenic Suspensionculture Protoplast of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology*, 8: 425-433.
- VIKRANT, and RASHID, A., 2001. Comparative Study of Somatic Embryogenesis from Immature and Mature Embryos and Organogenesis From Leaf Base Of Triticale. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*, 64: 33-38.
- WAALWIJK, C., KASTELEIN, P., DE VRIES, I., KERENYI, Z., VAN DER LEE, T., HESSELINK, T., KOHL, J. and KEMA, G., 2003. Major Changes in *Fusarium* spp. in Wheat in the Netherlands. *Eur. J. Plant Pathol.*, 10: 743–754.
- WALKER, S.L., 2001. Variation Among Isolates of *Fusarium graminearum* Associated with Fusarium Head Blight in Nort Carolina. *Plant Disease* 85 (4): 404-410.
- WANG, Y.Z., and MILLER, J.D., 1988. Effects Of Metabolites on Wheat Tissue In Relation to Fusarium Head Blight Resistance. *J. Phytopathol.*, 122: 118-125.

- WEINING, S., and LANGRIDGE, P., 1991. Identification and Mapping of Polymorphism In Cereals Based on Polymerase Chain Reaction. *Theo. and App. Genet.*, 82: 209-216
- WELSCH, J., and MCCLELLAND, M., 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Res.*, 18:7213–7218.
- WENZEL, G., and FOROUGH-WEHR, B., 1990. Progeny Tests of Barley, Wheat, and Potato Regenerated from Cell Cultures after *In Vitro* Selection for Disease Resistance. *Theor. Appl. Genet.*, 80,359-365.
- WILCOXSON, R.D., BUSCH, R.H., and OZMON, E.A., 1992. Fusarium Head Blight Resistance In Spring Wheat Cultivars. *Plant Dis.*, 76: 658-661.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., RAFALSKI, J.A., and TINGEY, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- WOLF S.J, and EARLE E.D., 1990. Inhibition of Corn Callus Growth by *Helminthosporium carbonum* Race 1 Toxin. *Crop Sci.*, 30: 728–734.
- WU, B.H., ZHENG, Y.L., LIU, D.C, and ZHOU, Y.H., 2003. Trait Correlation of Immature Embryo Culture in Bread Wheat Plant Breeding, 132, 47-51.
- YANG, Z., YANG, X., and HUANG, D., 1998. Studies on Somaclonal Variants For Resistance to Scab In Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Through *In Vitro* Selection for Tolerance to Deoxynivalenol. *Euphytica*, 101(2): 213-219.
- YANG, Z.P., GILBERT, J., SOMERS, D.J., FEDAK, G., PROJUNIER, J.D., and YU, J., 2000. Fungi, Fungal Spores, Mycotoxins, and Food Safety, Molecular Genetic Approaches. Food Research Institute Annual Report, 40-49.

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Gülnar/Mersin’de doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Erdemli/Mersin’de tamamladım. 1989 yılında Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü kazandım ve 1993 yılında mezun oldum. 1996-1998 yılları arasında Almanya Bonn Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nde Fitopatoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans’ımı tamamladım. 1999 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. 2000 yılında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalında Doktora yapmak üzere YÖK tarafından görevlendirildim.

EKLER

Ek 1: *F. graminearum* A-13 ve *F. culmorum* B-4 izolatların koloni ve misel gelişimini belirlemek amacıyla kullanılan ortamların içerikleri.

<u>Ortamın Adı</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Patates Dekstroz Agar (PDA)	
Patates	200-250
Dekstroz	30
Agar	15
Malt Estrakt Agar (MEA)	
Malt Ekstrakt	20
Agar	15
Czapek-Dox Agar (CA)	
Sakkaroz	30
NaNO ₃	3
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Fe SO ₄ .7H ₂ O	0,01
KCl	0,5
Agar	15
Sabouraud Agar	
Glikoz	40
Pepton	10
Agar	20
Sentetik Nütrient Agar (SNA)	
KH ₂ PO ₄	1
KNO ₃	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
Glikoz	0,2
Sakkaroz	0,2
Agar	20

Ek 2. Araştırmada kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamının ieriği

Kimyasallar	Miktar (mg/L)
İnorganikler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl 6H ₂ O	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O	37,3
Organikler	
Myoİnositol	100
Nikotinik asit	0,5
Piridoksin HCl	0,5
Thiamin HCl	0,1
Glycin	2,0
Sakkaroz	% 3
Phytojel	% 0,2
pH	5,8

Ek 3. Fungusların DNA izolasyonunda kullanılan lysis buffer

Kimyasallar	Miktarı
Tris	100 mM
EDTA	50 mM
SDS	%3
Proteinaz K	100 µg/ml

Ek 4. DNA izolasyonunda Kullanılan PEG soluyonu

Kimyasallar	Miktarı
NaCl	2.5 M
PEG	% 20

Ek 5. DNA izolasyonunda kullanılan TE solusyonu

Kimyasallar	Miktarı
Tris (pH 8)	10 mM
EDTA	1 mM

Ek 6. EtBr.' nin hazırlanması

Etidiumbromid (EtBr) (0,8µg/ml)

Etidiumbromid	4 µl
ddH ₂ O	50 ml

Loading bafırı

Loading bafır	100 ml için
Ficoll 400	0,25 gr
Bromofenol blue	0,25 mg

Ficoll 400 65 °C' de eritilip üzerine bromofenol blue ilave edilir.

Ek 7. *F. graminearum* ve *F. culmorum*'un RAPD analizinde kullanılan oligonükleotidlerin isimleri, baz dizimlileri ve konsantrasyonları

Primer	Baz Dizisi	Konsantrasyon $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
OPT-01	5'-GGGCCACTCA-3'	0.322
OPT-04	5'-CACAGAGGGA-3'	0.281
OPT-06	5'-CAAGGGCAGA-3'	0.340
OPT-16	5'-GGTGAACGCT-3'	0.396
OPT-18	5'-GATGCCAGAC-3'	0.306
OPU-13	5'-GGCTGGTTCC-3'	0.168
OPU-15	5'-ACGGGCCAGT-3'	0.223
OPU-19	5'-GTCAGTGCGG-3'	0.251
OPU-17	5'-ACCTGGGGAG-3'	0.340
UBC-85	5'-GTGCTCGTGC-3'	0.132

Ek 8. Moleküler Biyoloji Testlerinde Kullanılan Ortamlar ve Stok Solüsyonlarının İçerikleri

a) DNA Ekstraksiyon bafırı (500 ml için)

Kimyasallar	Miktarı
Trisma-base	0,1 M
Sorbitol	0,35 M
EDTA- Na_2	5 mM

dd H_2O içerisinde Trisma-base çözülür HCl ile pH 8.0'a ayarlandıktan sonra toplam hacim dd H_2O ile 500 ml'ye ayarlanarak otoklav edilir.

b) Nüklei lysis bafır (100 ml için)

Kimyasallar	Miktarı
Trisma-base	0,2 M
EDTA	0,05 M
NaCl	2 M
% 2 CTAB	2 g

pH: 7,5 olmalıdır. Solüsyon otoklav edilerek sterilizasyonu yapılır.

c) % 5 Sarcosyl

Taze DNA Ekstraksiyon

Bafırı

DNA Ekstraksiyon Bafırı	1 vol.
Nüklei Lysis Bafır	1 vol
% 5 Sarcosyl	0,4 vol

d) RNaz' ın hazırlanması

RNaz (10 mg/ml)	
RNaz A (Sigma)	10 mg
1XTAE	1 ml

15 dakika steril bidestile su içerisinde kaynatılır ve –20 °C’de saklanır.

Ek 9. Agarose jelin hazırlanmasında kullanılan TAE buffer

TAE Bafır

Tris-HCl (10 mM)	1,21 gr.
Na ₂ -EDTA (1 mM)	0,37 gr.
ddH ₂ O	1000 ml.

HCl asit ile pH 8.0 ‘a ayarladıktan sonra ddH₂O ile toplam hacim 1000ml ‘ye tamamlanır ve otoklav edilir.

50xTAE

Triz base	242 g
Glacial acetic acid	57.1 ml
0,5 M Na ₂ -EDTA	100 ml

ddH₂O ile toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanır ve otoklav edilir.

pH: 8.0 olmalıdır.

Ek 10. Regenere edilen bitkilerinin RAPD analizinde kullanılan oligonükleotidler (primer), baz dizilimleri ve konsantrasyonları

Primer	Baz Dizisi	Konsantrasyon µg/µl
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	0.188
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	0.145
OPD-05	5'-TGAGCGGACA-3'	0.276
OPE-05	5'-TCAGGGAGGT-3'	0.407
OPH-04	5'-GGAAGTCGCC-3'	0.201
OPN-15	5'-CAGCGACTGT-3'	0.218