

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI



BUĞDAY VE ARPADA KÖK ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞINA
SEBEP OLAN *Fusarium* TÜRLERİNİN MORFOLOJİK VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DAMLA ŞEN ONSEKİZ

BOLU, AĞUSTOS - 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Damla ŞEN ONSEKİZ tarafından hazırlanan “**BUĞDAY VE ARPADA KÖK ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞINA SEBEP OLAN *Fusarium* TÜRLERİNİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**” adlı tez çalışması Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda 20.08.2019 tarihinde savunularak **Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü** Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

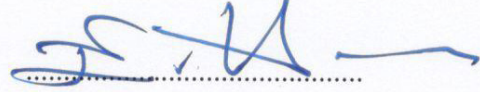
Danışman
Doç. Dr. Göksel ÖZER
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

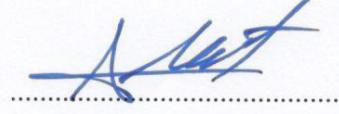
Üye
Prof. Dr. M. Erhan GÖRE
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Nedim ALTIN
Düzce Üniversitesi

İmza


.....


.....


.....

Prof. Dr. Ömer ÖZYURT


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü ✓



Sevgili yeğenim Şevval'e,

ETİK BEYAN

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Damla ŞEN ONSEKİZ

ÖZET

**BUĞDAY VE ARPADA KÖK ÇÜRÜKLÜĞÜ HASTALIĞINA SEBEP
OLAN *Fusarium* TÜRLERİNİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
DAMLA ŞEN ONSEKİZ
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. GÖKSEL ÖZER)**

BOLU, AĞUSTOS - 2019

Fusarium spp. buğday ve arpa üretim alanlarında kök ve kök boğazı hastalıklarına sebep olan yaygın olarak görülen ve ekonomik verim kayıplara neden olan önemli bir toprak patojenidir. Bu çalışma kapsamında Azerbaycan'ın önemli buğday ve arpa ekiliş alanlarından elde edilmiş hastalıklı bitkilerin kök ve kök boğazı patojenleri olan *Fusarium* türlerinin tanımlanması morfolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hastalıklı bitki dokularından izole edilen ve saflaştırılan toplam 200 izolatin morfolojik karakterizasyonu için patates dektroz agar (PDA) ve sentetik nutrient agar (SNA) ortamları kullanılmıştır. Moleküler çalışmalarda etmen türlerinin tanımlanması Translation Elongation Factor 1- α (*Ef-1 α*) gen bölgesinin sekansına dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan Neighbour joining filogenetik ağacında izolatların taksanomic olarak tür seviyesinde gruplandığını göstermiştir. Morfolojik ve moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda izolatlar izolat sayıları önceliğine göre *F. culmorum* (80), *F. acuminatum* (67), *F. pseudograminearum* (17), *F. equiseti* (14), *F. proliferatum* (9), *F. oxysporum* (7) ve *F. graminearum* (6) olarak tanımlanmışlardır. Türleri temsil eden izolatların Seri 82 yazlık buğday çeşidi üzerine patojenik reaksiyonları incelendiğinde en yüksek hastalık skoruna sahip grubun *F. culmorum* (3,59) izolatları olmuş, bunu 3,49 ile *F. pseudograminearum* ve 3,23 ile de *F. graminearum* izolatlarının takip etmiştir. Diğer türlerin kontrol bitkilerine kıyasla istatistiki olarak önemli derecede hastalık oluşturmamış ve bu izolatların patojen olmadıklarına karar verilmiştir. Çalışma sonucunda önemli patojenler olarak ortaya çıkan *F. culmorum*, *F. acuminatum* ve *F. pseudograminearum* türlerinin ülkesel düzeyde yürütülen ıslah ve hastalıkla mücadele programlarına dahil edilmesi önerilmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: *Fusarium* spp., Buğday, Arpa, Kök çürüklüğü

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Fusarium* SPECIES CAUSING ROOT ROT DISEASES ON WHEAT AND BARLEY

MSC THESIS

DAMLA ŞEN ONSEKİZ

BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF
NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. GÖKSEL ÖZER)

BOLU, AUGUST 2019

Fusarium spp. is an important soil pathogen group that causes root and root rot diseases in wheat and barley production areas and causes economic yield losses. In this study, the identification of *Fusarium* species, root and root collar pathogens of diseased plants obtained from important wheat and barley cultivation areas of Azerbaijan, was carried out using morphological and molecular methods. Potato dextrose agar (PDA) and synthetic nutrient agar (SNA) media were used for morphological characterization of a total of 200 isolates isolated and purified from diseased plant tissues. Identification of pathogen species in molecular studies was performed based on the sequence of Translation Elongation Factor 1- α (*Ef-1 α*) gene region. Neighbor joining showed that the isolates were grouped at the species level in the phylogenetic tree. As a result of morphological and molecular characterization studies, the isolates were *F. culmorum* (80), *F. acuminatum* (67), *F. pseudograminearum* (17), *F. equiseti* (14), *F. proliferatum* (9), *F. oxysporum* (7), and *F. graminearum* (6). When the pathogenic reactions of the isolates representing the species on Series 82 (a spring wheat variety) were examined, *F. culmorum* (3,59) was the highest disease group followed by *F. pseudograminearum* 3,49 and 3,23 with *F. graminearum*. The other species did not produce statistically significant disease compared to control plants and it was determined that these isolates were not pathogenic. It is recommended that *F. culmorum*, *F. acuminatum* and *F. pseudograminearum* species emerged as important pathogens in this study should be included in the national breeding and disease management programs.

KEYWORDS: *Fusarium* spp., Wheat, Barley, Root rot

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	x
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1 Çalışma.....	18
3.1.1 Materyal	18
3.1.2 Fungal İzolasyon.....	18
3.2 <i>Fusarium</i> Türlerinin Karakterizasyonu	21
3.2.1 Morfolojik Karakterizasyon.....	21
3.2.2 Moleküler Karakterizasyon.....	21
3.2.2.1 Fungusların Geliştirilmesi	21
3.2.2.2 DNA İzolasyonu.....	22
3.2.2.3 PCR Reaksiyonu	24
3.2.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi	25
3.2.2.5 Sekans ve Sekans Analizi	27
3.3 Patonejisite Testi	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1 Bulgular	33
4.1.1 Patojen Olan Fungusların Tür Düzeyinde Belirlenmesi	33
4.1.2 Morfolojik Karakterizasyon.....	35
4.1.2.1 <i>Fusarium culmorum</i>	36
4.1.2.2 <i>Fusarium graminearum</i>	37
4.1.2.3 <i>Fusarium pseudograminearum</i>	38
4.1.2.4 <i>Fusarium acuminatum</i>	39
4.1.2.5 <i>Fusarium equiseti</i>	40
4.1.2.6 <i>Fusarium oxysporum</i>	41
4.1.2.7 <i>Fusarium proliferatum</i>	42
4.1.3 Moleküler Karakterizasyon.....	43
4.1.3.1 DNA İzolasyonu.....	43
4.1.3.2 PCR Reaksiyonu ve Jel Elektroforezi ile Türlerin Belirlenmesi	43
4.1.4 Patojenisite Testi.....	45
5. SONUÇ ve ÖNERİ.....	48
6. KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Türkiye’de buğday ekim alanı, üretim ve verim değerleri	2
Şekil 1.2. Türkiye’de arpa ekim alanı, üretimi ve verim değerleri	4
Şekil 3.1. Toplanan örneklerin köklerinin yıkanma aşaması	19
Şekil 3.2. Toplanan örneklerin yıkanmış ve kesilmiş görüntüsü	19
Şekil 3.3. Tek spor izolasyonunda izlenen prosedürü gösteren bir diyagram	20
Şekil 3.4 Besi yerinde gelişmiş olan fungusları yumuşatmak için kullanılan kuru blok ısıtıcısı.....	23
Şekil 3.5. DS-11 FX serisi spektrofotometre	23
Şekil 3.6. Santrifüj cihazı.....	24
Şekil 3.7. <i>Fusarium</i> türlerinin <i>Ef-1a</i> bölgelerinin PCR amplifikasyonu için kullanılan T100 termal cycler’in ekran görüntüsü.....	25
Şekil 3.8. Güç kaynağı ve elektroforez tankı	26
Şekil 3.9. G:BOX F3 jel görüntüleme sistemi	27
Şekil 3.10. Tohumların sterilizasyon aşaması.....	28
Şekil 3. 11. Tohumların sterilizasyonu ve Petrilere ekim aşaması	29
Şekil 3.12. Tohumların inkübasyona bırakılma aşaması	29
Şekil 3.13. Besi yerinden disk şeklinde alınması ve toprağa yerleştirilmesi	30
Şekil 3.14. Patojenisite için ekilen tohumların gelişme süreci	30
Şekil 3.15. İklim odasında yetişen bitkilerin dokuz haftalık gösterdiği gelişme..	31
Şekil 3.16. Bazı bitki köklerinin <i>Fusarium</i> türlerine karşı gösterdiği reaksiyon sonucunun 1-5 skalasına göre değerlendirilmesi	32
Şekil 3.17. Bazı bitki köklerinin <i>Fusarium</i> türlerine karşı gösterdiği reaksiyon sonucunun 1-5 skalasına göre değerlendirilmesi	32
Şekil 4.1. <i>Fusarium culmorum</i>	36
Şekil 4.2. <i>Fusarium graminearum</i>	37
Şekil 4.3. <i>Fusarium pseudograminearum</i>	38
Şekil 4.4. <i>Fusarium acuminatum</i>	39
Şekil 4.5. <i>Fusarium equiseti</i>	40
Şekil 4.6. <i>Fusarium oxysporum</i>	41
Şekil 4.7. <i>Fusarium proliferatum</i>	42
Şekil 4.8. İzolatlara ait <i>Ef-1a</i> gen bölgelerinin elektroforezde elde edilmiş jelin UV cihazıyla çekilmiş görüntüsü.....	45
Şekil 4.9. İzolatlara ait Neighbor-joining dendrogramı	46

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Dünyada başlıca üretici ülkelerin buğday ekim alanları.....	1
Çizelge 1.2. 2007-2017 Yılları Türkiye buğday ekim alanı, üretimi ve verim değerleri....	2
Çizelge 1.3. Dünya arpa üretiminde önemli ülkelerin üretim miktarları	3
Çizelge 1.4. 2007-2017 Yılları Türkiye arpa ekim alanı, üretimi ve verim değerleri.....	3
Çizelge 4.1. İzolasyonu gerçekleştirilen örneklerin izolat numaraları, lokasyonları, koordinatları ve elde edilen tür sayıları	34
Çizelge 4.2. İzolasyonu gerçekleştirilen örneklerin izolat numaraları, lokasyonları, koordinatları ve izolatların bulunma oranları	35
Çizelge 4.3. Buğday köklerinden izole edilen <i>Fusarium</i> türlerinin büyüme oranları	42
Çizelge 4.4. Buğday köklerinden izole edilen <i>Fusarium</i> türlerinin makrokonidiler boyutları	43
Çizelge 4.5. Patojenisite sonuçları.....	46

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

g	: Gram
µm	: Mikrometre
µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
l	: Litre
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
mM	: Milimol
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolution per minute)
m/s	: Minute per second
°C	: Santigrat Derece
°	: Derece
MgCl₂	: Magnezyum Klorid
dNTPs	: Deoksiribonükleik Trifosfat
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
bp	: Baz Çifti
kb	: Kilo Baz
km	: Kilometre
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda Ve Tarım Örgütü
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDA	: Patates Dekstroz Agar
SNA	: Sentetik Besin Agarı
sp	: Tür
spp	: Türler
TBE	: Tris Borate EDTA
UV	: Ultraviyole
WA	: Su Agarı

TEŞEKKÜR

“Buğday ve arpada kök çürüklüğü hastalığına sebep olan *Fusarium* türlerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonu” adlı yüksek lisans tez konumu belirlemede yol gösteren, her daim yanımda olan bütün bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşarak eğitimimde büyük emeği olan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Göksel ÖZER’e,

Bu süreçte desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. M. Erhan GÖRE’ye,

Çalışmam boyunca hiçbir yardımı esirgemeyen yüksek lisans programında birlikte çalıştığım bu süreçte her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Mehtap ALKAN ve Tolga YAMAN’a, ayrıca tezimin düzenlenmesinde büyük yardımları bulunan Arş. Gör. Emrah GÜLER’e,

Tez çalışmam için gereken materyalleri sağlayan Uluslararası Mısır ve Buğday Geliştirme Merkezi (CIMMYT)’ne,

Bu yola başlamamda ve bitirmemde en büyük paya sahip olan ve daima desteğini gösteren çok sevgili eşim Murat ONSEKİZ’e ve her zaman yanımda olan annem Neşe ŞEN’e, babam Mansur ŞEN’e ve ablam Şule ALCI’ya,

Candan sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Dünya tarım ekonomisi için olduğu kadar ülkemiz tarım ekonomisinde de tahılların önemi oldukça yüksektir. Buğday (*Triticum spp.*) insan beslenmesi için gerekli olan kültür bitkileri arasında dünyada hem ekiliş hem de üretim açısından ilk sırada yer almaktadır. Buğday bitkisinin yüksek adaptasyon yeteneğine sahip olması bu durumun başlıca sebeplerinden birisidir. Buğday tanesi yüksek besin değeri, depolama ve işlenmesindeki kolaylıklardan dolayı yaklaşık olarak 50 ülkenin temel besini durumundadır. Buğday dünya nüfusuna bitkisel kaynaklı besinlerden sağlanan toplam kalorinin yaklaşık %20'sini sağlamaktadır. Ülkemizde ise bu oran %53'tür. Buğday başta unlu mamuller olmak üzere birçok gıda ve sanayi sektöründe kullanılmaktadır. Dünya'da buğday üretimi sıralaması yıllar itibari ile değişmekle birlikte 2017 yılında en fazla üretimin yapıldığı ülke Hindistan olup bunu sırasıyla Rusya ve Çin izlemektedir (Çizelge 1.1).

Günümüzde kültürü yapılmakta olan buğdayın orijini bilim adamları tarafından tartışılmasına rağmen Güneybatı Asya kabul edilmektedir. Diğer taraftan Türkiye, Suriye, Irak ve Kafkasya'da yabancı türlerine rastlandığından dolayı bu ülkeler de buğdayın gen merkezi olarak kabul edilmektedir (Sencar vd., 1994).

Çizelge 1.1. Dünyada başlıca üretici ülkelerin buğday ekim alanları (milyon ha) (FAOSTAT, 2019)

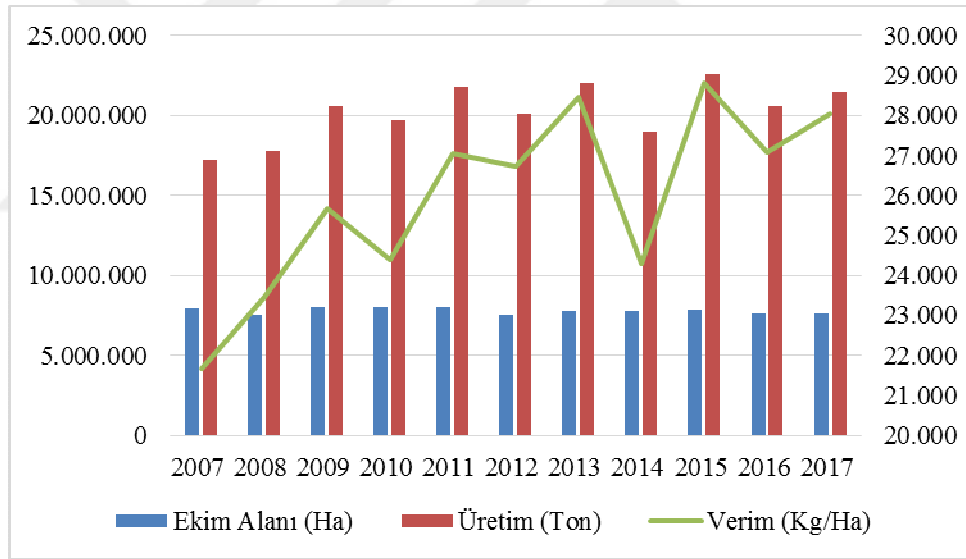
Ülkeler	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Arjantin	4,56	3,06	3,45	4,96	3,95	5,57
Avustralya	13,90	12,98	12,61	12,38	11,28	12,19
Kanada	9,50	10,44	9,48	9,58	9,26	9,04
Çin	24,27	24,12	24,07	24,60	24,70	24,51
Hindistan	29,86	29,65	30,47	31,47	30,42	30,60
Kazakistan	12,41	12,95	11,92	11,57	12,37	11,91
Pakistan	8,65	8,66	9,20	9,20	9,22	8,97
Rusya	21,28	23,37	23,91	25,87	27,31	27,52
Türkiye	7,52	7,75	7,82	7,85	7,61	7,66
Ukrayna	5,63	6,57	6,01	6,84	6,21	6,38
ABD	19,80	18,35	18,77	19,06	17,75	15,21
Azerbaycan	0,69	0,69	0,60	0,54	0,59	0,60

2007 yılında ülkemizde buğday bitkisinin yaklaşık 7,95 milyon ha alanda ekilişi gerçekleştirilmiş olup, buna karşılık 17,23 milyon ton üretim ve 2,17 ton/ha

verim değerleri gözlenmiş iken bu veriler 2017 yılında ise yaklaşık 7,66 milyon ha ekiliş alanı, 21,5 milyon ton üretim ve 2,81 ton/ha verim olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 1.2, Şekil 1.1).

Çizelge 1.2. 2007-2017 Yılları Türkiye buğday ekim alanı, üretimi ve verim Değerleri (FAOSTAT, 2019)

Yıllar	Ekim Alanı (milyon ha)	Üretim (milyon ton)	Verim (ton/ha)
2007	7,95	17,23	2,17
2008	7,58	17,78	2,35
2009	8,03	20,60	2,57
2010	8,06	19,67	2,44
2011	8,06	21,80	2,70
2012	7,52	20,10	2,67
2013	7,75	22,05	2,85
2014	7,82	19,00	2,43
2015	7,85	22,60	2,88
2016	7,61	20,60	2,71
2017	7,66	21,50	2,81



Şekil 1.1. Türkiye’de buğday ekim alanı, üretim ve verim değerleri.

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) genelde hayvan yem sanayisinde ve malt endüstrisinde kullanım alanı bulan diğer önemli bir tahıl bitkisidir. Bununla birlikte insan beslenmesinde ve günlük kalori ihtiyacının giderilmesinde arpanın doğrudan kullanımını çok azdır. Bugün dünyada ekimi yapılan arpanın %65’i hayvan yemi olarak, %33’ü maltlık olarak alkollü içecek yapımında ve %2’si de insan besini olarak gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Ülkemizde ise tüketimin %90’ı hayvan yemi olarak, kalan kısmı malt sanayinde ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır.

Arpa, bunların yanında etanol üretiminde de özellikle ABD’de az miktarda kullanılmaktadır. Dünyada tahıllar arasında üretimde mısır, buğday ve pirinçten sonra 4. sırada yer alan arpa, Türkiye’de ise buğdaydan sonra en önemli ikinci tahıl durumundadır. Dünya’da arpa üretiminin en fazla yapıldığı ülkeler ve üretim alanları aşağıda verilmiştir (Çizelge 1.3).

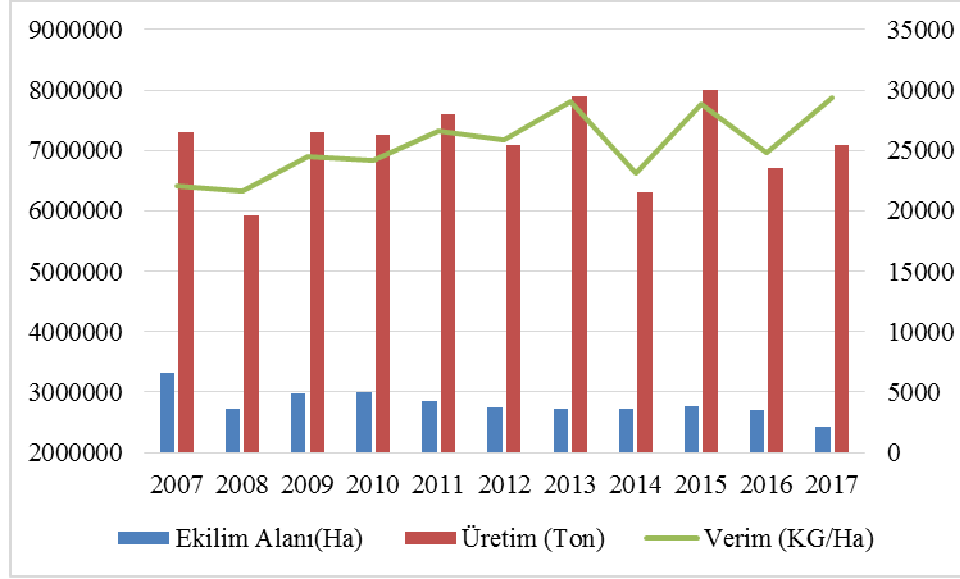
Çizelge 1.3. Dünya arpa üretiminde önemli ülkelerin üretim miktarları (Milyon Ton) (FAOSTAT, 2019)

Ülkeler	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Arjantin	1,6	1,20	0,88	0,88	1,24	0,87
Avustralya	3,72	3,64	3,81	4,07	4,10	4,83
Azerbaycan	0,29	0,32	0,33	0,36	0,35	0,31
Kanada	2,75	2,65	2,13	2,35	2,33	2,19
Çin	0,48	4,6	0,46	0,44	0,30	0,46
Hindistan	0,64	6,9	0,67	0,70	0,59	0,65
Kazakistan	1,63	1,83	1,90	2,03	1,89	2,06
Pakistan	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06
Rusya	7,64	8,01	9,00	8,23	8,13	7,84
Türkiye	2,74	2,71	2,71	2,77	2,70	2,41
Ukrayna	3,29	3,23	3,00	2,80	2,85	2,50
Amerika	1,32	1,23	1,01	1,25	1,03	0,79

Türkiye’nin tüm bölgelerinde yetiştirilmekle birlikte özellikle İç Anadolu Bölgesi ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi yoğun arpa üretimi gerçekleştirilen önemli iki bölge olarak öne çıkmaktadır. Son 10 yıllık istatistik değerler bakıldığında arpa ekim alanlarının 2,4–3,4 milyon hektar arasında, üretiminin ise 5,9– 8,0 milyon ton arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 1.4, Şekil 1.2).

Çizelge 1.4. 2007-2017 Yılları Türkiye arpa ekim alanı, üretimi ve verim değerleri (FAOSTAT,2019)

Yıllar	Ekim Alanı (milyon ha)	Üretim (milyon ton)	Verim (ton/ha)
2007	3,31	7,30	2,20
2008	2,73	5,92	2,16
2009	2,97	7,30	2,45
2010	2,99	7,25	2,41
2011	2,85	7,60	2,66
2012	2,74	7,10	2,58
2013	2,71	7,90	2,90
2014	2,71	6,30	2,31
2015	2,77	8,00	2,88
2016	2,70	6,70	2,48
2017	2,41	7,10	2,93



Şekil 1.2. Türkiye’de arpa ekim alanı, üretimi ve verim değerleri (FAOSTAT, 2019).

Buğday ve arpa tarımını olumsuz yönde etkileyen ve önemli ürün kayıplarına neden olan birçok biyotik ve abiyotik faktör mevcuttur. Kök ve kök boğazı fungal hastalıkları tahıllarda verimi sınırlayan biyotik faktörlerin başında gelmektedir (Stubbs vd., 1992). Dünyada ve ülkemizde tahıllarda kök ve kök boğazı çürüklüğünün bölgelere ve etmenlere bağlı olarak uygun koşullarda %80'lere kadar zarara neden olabileceği belirtilmiştir (Mishra, 1973; Finci, 1979; Huber ve McCay-Buis, 1993; Aktaş vd., 1997). *Fusarium* cinsi kapsadıkları tür sayılarının oldukça yüksek olması, monokotiledon ve dikotiledon bitkiler içerisinde oldukça geniş bir konukçu dizisine sahip olmaları ve dünya üzerindeki farklı ekolojik ortamlarda yaşamlarını sürdürebilmeleri nedeniyle tarımsal üretimde yüksek öneme sahiptirler. Buğday ve arpa bitkilerindeki kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalık etmeni olan *Fusarium* spp. metre kareye düşen bitki sayısını, bitki başına düşen kardeşlenme sayısını, başak uzunluğunu ve dolayısıyla başak başına düşen tane sayısında azalmalara neden olmaktadır (Yıldırım vd., 2016). Sonuç olarak *Fusarium* türleri hububat üretiminde verim kayıplarına neden olmakla birlikte ürün kalitesinde de azalmalara neden olmaktadır (Aktaş, 2001).

Fusarium türlerinin tanımlamasında kullanılan yöntemler morfolojik, sitolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler olarak sıralanabilir. Morfolojik teşhis makro ve mikrokonidi morfolojisi, fiyalid yapısı, misel özellikleri, ortamdaki koloni

pigmentasyonu ve büyüme oranları gibi kriterler göz önünde bulundurularak Leslie ve Summerell (2006)'ya göre gerçekleştirilmektedir.

Moleküler tanımlama tekniklerinde yaygın olarak DNA molekülü kullanılmaktadır. DNA ile yapılan moleküler çalışmalar, daha güvenilir ve hızlı sonuçlar vermektedir. DNA, genetik bilgiyi taşıyan çift sarmal moleküldür ve fungus hücrelerinde çekirdekte ve mitokondrilerde bulunmaktadır. Moleküler yöntemlerde yaygın olarak bir nükleik asit dizilerinin çoğaltılması yöntemi ise olan Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction = PCR) dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Bununla birlikte son zamanlarda moleküler tekniklerin yaygınlaşması çalışmalara moleküler düzeyde kesin olarak teşhisine olanak sağlamıştır. Bu kapsamda *Fusarium* türlerini tür bazında teşhisine olanak veren Translasyon uzama faktör 1 α (Translation elongation factor 1 α = EF-1 α) bölgesinin sekans datalarından yararlanılarak türler teşhis edilebilmektedir (O'Donnell vd., 1998). Moleküler veriler, funguslar için taksonomik grupların ve ırklarının tespitinde de kullanılmaktadır.

Buğday ve arpada kök ve kök boğazında sorun olan *Fusarium* türleri içerisinde en yaygın olanları *F. culmorum*, *F. graminearum* ve *F. pseudograminearum* olarak tespit edilmiştir. Bu etmenler toprakta bitki artıkları üzerinde iki yıldan uzun bir süre canlı kalabilme yeteneklerine sahiptir. Diğer *Fusarium* türleri ile olan kompleks enfeksiyonların hastalık şiddetini arttırabildiği gözlemlenmiştir. Bu fungusların kesin tanıları günümüzde morfolojik ve moleküler tanılamaların birlikte yapıldığı çalışmalarla gerçekleştirilmektedir. *Fusarium* spp. esas olarak toprak kökenli bir patojen olması ile birlikte enfekte edilmiş olan hastalıklı bitkilerin tohumu ile de taşınabilmektedir.

Bitki hastalıkları ile mücadele stratejilerinin belirlenmesinde hastalığa neden olan etmenin kesin tanısı kritik bir öneme sahiptir. Gerçekleştirilecek çalışma hem beslenme hem de ekonomi bakımından araştırma bölgesi ve dünya için büyük öneme sahiptir. Çalışma kapsamında bölgede yaygın buğday ve arpada kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığına sebep olan *Fusarium* türleri tespit edilecektir. Kısaca yürütülmüş olan tezde gerçekleştirilen iş paketleri:

Azerbaycan'ın önemli buğday ve arpa ekiliş alanlarında sorun oluşturan *Fusarium spp.*'nin izolasyonu ve morfolojik teşhisi,

Morfolojik teşhis, izolatlardan elde edilen genomik DNA'ların EF-1 α lokuslarının sekans analizleri ile doğrulanması ve referans izolatlar ile birlikte elde edilen izolatların arasındaki akrabalık ilişkisinin filogenetik haritalama ile ortaya konması,

Türlerin buğdayı hastalandırma dereceleri arasındaki farkın klasik hastalık reaksiyon testleri ile ortaya konması olarak sıralanabilir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Göbelez (1952) çalışmasında, bazı *Fusarium* spp. (*F. nivale* ve *F. herbarum*) izolatlarının hububat tohumlarıyla taşınarak tohumların çimlenmesini engellediklerini veya fide döneminde fidelerde çürüklüklere neden olduğunu ortaya koymuştur. *Fusarium* spp. izolatlarının hızlı spor vermesine dayandırılarak tür düzeyinde ki teşhislerde yüksek başarı elde etmişlerdir.

Cook (1968) Amerika'nın Kuzey Batı Pasifik Bölgesi'nde yürüttüğü bir araştırmada; buğday kök boğazında çürüklüğüne yol açan fungus etmenleri incelemiştir. Hastalık taşıyan buğdayların izolasyonu sonucunda %90'dan fazla *F. culmorum* tespit edilmiştir. Walla Walla'da ve Washington'da Benton idare bölgesinde çeşitli buğday tarlalarında baskın gözükten fungusun ise *F. graminearum* olduğu sonucuna varılmıştır. *F. avenaceum* ise bölgenin tamamında bulunan bitkilerin taçlarından seyrek biçimde izole edilmiş ve bu fungus türüyle bulaşık olan bitkilerde ölüm oranı çok az görülmüştür. Genel olarak tespit edilen fungusların ise sırasıyla *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* ve *F. avenaceum* olduğunu bildirmiştir.

Yılmazdemir (1976) yaptığı çalışmada Edirne, Tekirdağ ve Kırklareli illerinde buğday kök ve kök boğazı hastalığına sebep olan fungal patojenlerin tespiti için 137 buğday tarlasından toplam 905 izolat elde etmiş ve bunlar içerisinde 28 tür elde etmiştir. Bu izolatların 574'ünün *Fusarium* spp., 108'inin *Alternaria* spp., 68'inin *Helminthosporium* spp. ile *Dreschlera* spp. ve 33'ünün *Pythium* spp. olduğunu tespit etmiştir.

Finci (1978) Trakya Bölgesi'nde yaptığı çalışmada oldukça yaygın görülen kök ve kök boğazı hastalıkları nedeniyle başaktaki dane ağırlığının %30-60 arasında azaldığını bildirmiştir. Yine, Finci (1979) Trakya Bölgesi'nde buğdayın kök ve kök boğazı hastalıklarıyla ilgisi bulunan çalışmalar yürütmüş, hastalık semptomları ve bunların önüne geçmek için tedbir ve mücadele önerileri sunmuştur.

Soran ve Damgacı (1980), Ankara ilinde buğday tarlalarında yaptıkları çalışmada *R. solani*, *Pythium* sp., *F. solani*, *F. dimerum*, *F. oxysporum* ve *H. sativum*

türlerinin buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığına neden olduklarını tespit etmişlerdir.

Diehl vd. (1982) yaptıkları araştırmada; 1979 yılında, Brezilya, Rio Grande do Sul'da 17 buğday ekiliş alanında buğdaylarda oldukça sık görülen kök çürüklüğünün agresifliği ve meydana gelme oranının Feekes gelişme dönemi 8 ve 9'da (bayrak yaprak çıkışı) %31 ve %9, olgunlaşma-gelişme döneminde ise %47-82 arasında görüldüğünü belirlemişlerdir.

Hill vd. (1983) Amerika'nın Colorado ve Wyoming eyaletlerinde yaptıkları iki yıllık bir çalışmada, fungal patojenlerin neden olduğu kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmada 852 farklı fungal izolat izole edilmiş ve bunlardan 408 adet izolatin patojen olduğu tespit bulunmuştur. İçlerinden *Bipolaris sorokiniana* türü %34 oranında izole edilmiştir. Diğer türler olarak *F. tricinctum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. sambucinum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. solani* ve *F. acuminatum* türlerini kapsayan *Fusarium* cinsi funguslar %55'lik bir oranda tespit edilmiştir.

Wiese (1987) yürüttüğü bir projede buğday bitkilerinde kök, kök boğazı ve sap kısmında yanıklık veya çürüklük hastalıklarının belirtilerine sebep olan başlıca *Fusarium* türlerinin sırasıyla; *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* (= *F. graminearum* Grup 2), *F. avenaceum*, *F. acuminatum*, *F. crookwellense*, *F. poae* ve *Microdochium nivale* (*F. nivale*) olduklarını bildirilmiştir.

Sturz ve Bernier (1989) Kanada'da yaptıkları çalışmada; kışlık buğdayda kök ve kök boğazı hastalığına sebep olan fungal patojenleri belirlemek için kök ve kök tacı kısımlarından bahar ve yaz mevsimlerini içeren dönemde izolasyon yapmışlardır. Bu izolasyonlar sonucunda *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, *Cochliobolus sativus*, *F. culmorum*, *Gerlachia (Monographella) nivalis*, *Microdochium bolleyi*, *F. avenaceum (Gibberella avenacea)* *F. equiseti* ve *Periconia macrospinoso*'yu tespit etmişlerdir.

Windels ve Holen (1989) Amerika'nın Minnesota Eyaleti buğday tarlalarında 3 yıl boyunca yapmış oldukları sörvey çalışmalarında kök ve kök boğazı hastalığına sebep olan fungal patojenleri incelemek amacıyla izolasyonlarını

gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri verilere göre *B. sorokiniana* %76 oranında tespit edilen tür olmuş, diğer izolatların ise *Fusarium* spp. içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Türleri ise *F. graminearum* (Grup 2) %16, *F. culmorum* %6, *F. acuminatum* %3, *F. poae* %2 ve *F. avenaceum* %1'lik oranda izole edilmişlerdir.

Özer ve Soran (1991) yaptıkları çalışmada; Türkiye'de buğday, arpa, çavdar ve yulafta *F. oxysporum*, *F. equiseti* ve *F. culmorum* etmenlerinin kök ve kök boğazı hastalığına sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Mathre (1992) yaptığı bir çalışmada hastalık etmeni olarak belirlenmiş olan *F. culmorum* ve *F. pseudograminearum* türlerinin Ortadoğu, Akdeniz, A.B.D. Kuzey Pasifik'te başlıca hastalığa sebep olan türler olduğunu tespit etmiştir.

Murat Çavuşoğlu ve Hancıoğlu (1995) yürüttükleri çalışmada, Ankara ilinde buğday tarlalarında kök ve kök boğazı hastalıklarına yol açan *Fusarium* türlerini saptamak için 70 buğday ekim alanında sörvey çalışması yaparak hasta bitki örneklerini toplamışlardır. Toplanan bitkilerden yapılan izolasyonlar sonucunda; *Fusarium* türlerinden oluşan toplam 31 izolat elde etmişlerdir. Bu 31 izolattan 15'inin bölgede yaygın olarak ekimi yapılan Gerek-79 buğday çeşidinde patojen olduğu gözlemlenmiştir. İzolatlardan 2'si *F. culmorum*, 8'i *F. acuminatum*, 4'ü *F. graminearum* ve bir tanesi de *F. heterosporium* olarak bulmuşlardır.

Aktaş vd. (1995) yaptığı bir çalışmada Konya ilinde arpa bitkisinin yetiştiği tarlalardan kök ve kök boğazı hastalıklarına sebebiyet veren fungus türlerini tespit etmişlerdir. Konya ili arpa ekim alanlarında 90 örnekleme yapılmış ve ortalama hastalık şiddetinin %27 olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucu ortaya çıkan patojen türlerin; *F. culmorum*, *A. alternata*, *B. sorokiniana*, *Fusarium moniliforme*, *R. cerealis*, *F. equiseti* ve *F. acuminatum* olduğu tespit edilmiştir.

Rossi vd. (1995), Kuzeybatı İtalya'da bulunan ekmeklik ve makarnalık buğdaylarda 3 yıllık geniş bir arazi çalışması yapmışlardır. Bu çalışmalardan elde edilen bulgulara göre kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının çok yaygın ve önemli ölçüde ölümlere sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bu hastalıkla enfekte olmuş olan kök boğazı kısmından izole edilmiş en önemli fungus türlerinin *Microdochium nivale*, *B. sorokiniana*, *F. avenaceum*, *F. graminearum* ve *F. moniliforme* ile

Pythium sp. olduğunu tespit etmişlerdir. Keskin göz lekesi hastalığı ile (*Rhizoctonia sp.*) sıkça karşılaşmışlar ve karabacak (*Gaeumannomyces graminis var. tritici*) ve göz lekesi (*Pseudocercospora herpotrichoides*) hastalığını ise çok seyrek gözlemlemişlerdir.

Aktaş vd. (1996) Sakarya ilinde Sakarya Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve Pamukova Çiftliği tarlalarında yürüttükleri bir çalışmada hububatlarda kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalıklarına yol açan ve patojen fungus olan; *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium moniliforme*, *F.culmorum*, *Drechslera sorokiniana*, *Ophiobolus graminis*, *Pythium graminicola* ve *Pseudocercospora herpotrichoides* olarak tespit etmişlerdir. 15 buğday çeşidinde hastalığın dağılışı tartılı ortalamaya göre enstitü arazisinde %13,13 ve çiftlik arazisinde %10 olarak tespit edilmiştir.

Pettitt ve Parry (1996) İngiltere’de yaptıkları çalışmada *Fusarium culmorum*, *F. avenaceum*, *M. nivale* ve *F. graminearum* türlerinin buğdayda sap çürüklüğü hastalığına sebep olduğu belirlenmiş ve bu ülkedeki ekim alanlarında ki hastalık çıkışı ile sıcaklığa bağlı olarak gün derece bağlantısı üzerine çalışmışlardır.

Smiley ve Patterson (1996) yaptıkları bir çalışmada, yarı kurak kuzeybatı pasifik bölgesinde yürüttükleri sörvey çalışması sonucu 288 adet sulanmayan buğday bitkisinin yetiştiği tarlalardan buğday bitkilerini ve toprak örneklerini toplamışlardır. Oregon’dan 10 ve Washington’daki 9 il/ilçe’den topladıkları örneklerin taç kısmının altından ve üstünden izolasyonlar yapmışlardır. Kuru bölgelerde kök çürüklüğü hastalığına sebep olan ve önemli ölçüde kayıba sebep olan türü *Fusarium graminearum* Grup 1 olarak belirlenmiştir. *F. culmorum* ise toprakta yaygın şekilde bulunmakla birlikte *F. graminearum*’un bulunduğu bölgelerin yarısı kadar olan kısmındaki bitkilerde de gözlemlenmiştir. Geriye kalan fungal etmenler ise *Bipolaris sorokiniana*, *Microdochium nivale* ve *F. avenaceum* olarak tespit edilmiştir.

Yıldırım vd. (1998) yaptıkları çalışmada, Karaman, Aksaray ve Niğde illerinde buğday tarlalarından topladıkları kök ve kök boğazı hastalıklı örneklerden bazı etmenleri tespit etmek amacıyla izolasyon yapmışlardır. İzolasyonu gerçekleştirilen etmenleri şu şekilde sırasıyla açıklamışlardır; *Drechslera sorokiniana* %33,7 *Rhizoctonia sp.* %20,2, *F. culmorum* %106, *Alternaria alternata* % 10,6, *Ulocladium sp.* %6,7, *Penicillium sp.* %4,8, *Cladosporium sp.* %3,9, *F.*

moniliforme %2,9, *Curvularia inaequalis* %1,9, *Stemphylium* sp. %1,9, *Drechslera* sp. %1, *Rhizopus stolonifer* %1, *Septonema* sp. %1 olarak tespit etmişlerdir. Karaman ve Niğde illerinde *Drechslera sorokiniana* etmeni yaygın olan patojen olarak gözlemlenmiştir. Bu sonucu izleyen ise *Rhizoctonia* sp. olmuştur. Aksaray ilinde tespit edilen ve en çok bulunan türe sahip cins *Rhizoctonia* olmuş bunu da *Drechslera sorokiniana* etmeni izlemiştir.

Aktaş vd. (1999) Konya ilinde yürüttükleri bir çalışmada, hububatta yaygın bir hastalık olan kök ve kök boğazı çürüklüğünün şiddetini %36,21 olarak bildirmişlerdir. Toplanan örneklerden yapılan izolasyon sonucunda 29 adet farklı fungus türü tespit etmişlerdir. Bu türleri şu şekilde açıklamışlardır; *F. culmorum* %24, *R. cerealis* %13, *Cladosporium herbarum* %10, *Alternaria alternata* %9, *Drechslera sorokiniana* %7, *Rhizopus stolonifer* %7, *F. moniliforme* %7 oranlarında bulmuşlardır. Tane başına verimde en fazla kayıp %9 ile *F.culmorum* patojeninde en az olarak da %5 ile *F. moniliforme* etmeninde olmuştur. Hastalık şiddeti en yüksek düzeyde %24 oranında ile *D. sorokiniana*, en düşük düzeyde %19 oranında *R. cerealis* patojeninde meydana gelmiştir.

Arslan (1999) Bursa ilinde 1996 ve 1997 üretim sezonunda gerçekleştirdiği çalışmada buğday ekim alanlarından elde ettiği örneklerde kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalıklarına sebep olan fungal patojenlerin belirlenmesini, ortaya çıkan bu hastalığa yakalanma ve yaygınlık oranlarını, simptomatolojik ve taksonomik özelliklerini, patojenisitelerini, buğday çeşitlerinin reaksiyonlarını ve tohum ilacı olarak kullanılan bazı fungusitlerin etkilerini araştırmıştır. Bu bölgelerde kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı görülen bitkilerde yayılma oranları 1996 ve 1997 yıllarında sırasıyla %14,53 ve %11,27, yaygınlık oranı ise %38,82 ve %37,97 olarak tespit edilmiştir. Kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı için yapılan izolasyonlar sonucunda en çok görülen funguslar şu şekilde sıralanmıştır; *Fusarium* sp., *Rhizoctonia cerealis*, *Alternaria alternata* ve *Drechslera sorokiniana*'dır. Araştırmacı bu fungusların simptomatolojik ve taksonomik özellikleri üzerinde çalışarak bulgularını bildirmiştir. *Fusarium* sp. ve *R. cerealis* izolatlarının patojenisiteleri sırasıyla %8,5 – 100 ve %35 –100 arasında değişmiştir. 8 buğday çeşidinden 1'i (Saraybosna) *F. culmorum*'a orta derecede duyarlı, *F. graminearum* ve

R. cerealis'e duyarlı olarak tespit edilmiştir. Diğer 7 çeşit her 3 etmene duyarlı bulunmuştur.

Burgess vd. (2001), yürüttüğü çalışma sonucunda buğdayda kök ve kök boğazı ve sap çürüklüğü hastalıklarına sebep olan fungal patojenler içerisindeki *Fusarium* cinsi fungusların önemli derecede baskın olduğunu ortaya koymuştur. Kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı ilk kez 1930'lu yıllarda Amerika'da ortaya çıktığı bilinmektedir ve bunu izleyen süreçlerde bu hastalıkların Asya, Avrupa, Afrika ve Avustralya kıtasında bulunan ülkelerde de görüldüğünü başka çalışmalarla ortaya konmuştur.

Uçkun (2001), İzmir, Aydın ve Denizli illeri buğday alanlarında 2000–2001 yıllarında, kök ve kök boğazı çürüklüğüne yol açan fungal etmenler ile hastalığın yoğunluğu ile ilgili çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmasını yürüttüğü tarlalarda hastalık görülme oranını ve hastalık şiddetini sırasıyla, %58,28 ve %25,07 olarak gözlemlemiş ve bütün tarlaların hastalığa sebep olan patojen ile enfekte olduğunu tespit etmiştir. Kök ve kök boğazı hastalığına yol açması sebebiyle yapılan izolasyonlar sonu baskın ve yaygın olarak bulunan funguslar, *Fusarium* sp., *R. cerealis*, *Alternaria alternata* ve *Dreschlera sorokiniana*'dır. *R. cerealis* ve *Fusarium* sp. olarak tespit etmiştir. Bu izolatların patojenisiteleri sırasıyla %26–76 ve %0–72 aralıklarında bulunmuştur. Bulunan patojenler arasında en agresif türlerin *R. cerealis* ve *F. culmorum* olduğunu bildirmiştir.

Kurowski (2002), Polonya'da kışlık buğday, tritikale, çavdar, yazlık arpa ve yulaf bitkilerinde çalışma yürütmüştür. Çalışmasında köklerden izole edilen en yaygın etmenlerin *Fusarium* türleri (*F.culmorum*, *F.oxysporum*, *F.equiseti*, *F.avenacea*), *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Aureobasidium pullulans*, *Microdochium nivale* (*Monographella nivalis*), *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris sorokiniana* (= *Cochliobolus sativus*) ve *Cylindrocarpon destructans* (*Nectria radicicola*) olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, hububat fidelerinde *F. culmorum* ve *R. solani*'nin yüksek seviyelerde patojeniteye sahip olduğunu ve izole edilen etmenler arasında patojenitesi en yüksek olanlar da bulunmuştur.

Pettitt vd. (2003), İngiltere'de 260 farklı bölgede yaptığı sörvey çalışmalarının sonucunda; *F. culmorum*, *F. avenaceum* ve *M. nivale* adlı türlerin

buğdayda sap çürüklüğünün nedeni olan *Fusarium* türleri olduğu belirlenmiştir. *F. culmorum* bu türler arasında en sık izole edilen tür olup, bunu sırasıyla *M. nivale* ve *F. avenaceum* türleri takip etmiştir.

Demirci (2003), yaptığı bir çalışmada buğdayların verim ve kayıplarında çok büyük önem arz eden ve özellikle erken dönemde kök ve kök boğazı hastalığına sebep olabilen *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* ve *Bipolaris sorokiniana*'nın, 10 farklı buğday çeşidindeki hastalık oluşturma şiddetleri ve çıkış derecesini tespit etmeyi amaçlamıştır. *F. culmorum*'a karşı Bezostaja-1 ve Gün 91' in ve *B. sorokiniana*' ya karşı Bezostaja-1, Kutluk-91, Kırgız-95, Gün-91 ve Dağdaş-94'ün orta derecede dayanıklı olduğunu tespit etmiştir. Bütün buğday çeşitlerinin *F. graminearum*'a karşı büyük ölçüde hastalık şiddeti gösterdiğini belirtmiştir, Mızrak çeşidinin ise çok küçük bir farkla orta derecede hassaslığa yol açtığını tespit etmiştir.

Bentley vd. (2004) tarafından yapılmış olan bu çalışmada bazı buğday ekiliş alanlarından (Marmara'nın Batı sahilinden 12, batı Karadeniz Bölgesi'nden 4 ve Orta Anadolu'nun doğu geçit kısmında bulunan 9 örnek) 2003 yılında toplam 25 örnekleme ile yürüttüğü bur sörvey çalışmasında her tarladan çaprazlama şeklinde rastgele 50 örnek toplamıştır. Toplanan 13 buğday bitkisi sapındaki izolasyon çalışmaları sonucunda toplam 16 *Fusarium* türü izole edilmiştir. Ortaya çıkan yoğun patojen türler ise *Fusarium culmorum* ve *F. pseudograminearum* olmuştur. Diğer sekiz adet *Fusarium* türü ise nispeten yaygın şekilde tespit edilmiştir. Bunlar *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. armeniacum*, *Microdochium nivale* (*F. nivale*) ve *F. avenaceum*'dur. Bunlara ilave olarak geri kalan *Fusarium* türleri de düşük sıklıkta tespit edilmiş olup bunlar; *F. proliferatum* (%5,7), *F. solani* (%5,9), *F. reticulatum* (%1,4), *F. compactum* (%0,9), *F. pseudograminearum* (%0,3), *F. crookwellense* (%0,3), *F. polyphialidicum* (%0,2) ve *F. udum* (%0,2)'dur.

Arıcı ve Koç (2004), Adana ili ve bazı yakın bölgelerinde buğday tarlalarında hastalığa neden olan *Fusarium* türlerini tespit etmek amacıyla 2003 yılında bahar döneminde arazi çalışması yürütmüşlerdir. Toplanmış olan bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda *Fusarium* türlerine ait toplam 34 izolat elde etmişlerdir. Bu izolatlara Seri-82 buğday çeşidi kullanılarak patojenisite testi uygulamışlardır. Patojenisite testi sonucunda *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*,

F. crookwellense ve *F. avenaceum*'un buğday tarlalarında hastalığa yol açabileceği ortaya çıkmıştır. Adana ve çevresinde buğday başaklarında en sık görülen patojenin ise *F. graminearum* olduğu bildirilmiştir.

Hekimhan vd. (2005), Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nün Konya/Çumra deneme arazisinde 20 hububat çeşidinin (12 ekmeklik buğday, 5 makarnalık buğday, 2 arpa ve 1 tritikale) kök ve kök boğazı hastalık etmenlerine (*Fusarium pseudograminearum*, *F. culmorum* ve *Bipolaris sorokiniana*) karşı dayanıklılığını belirlemek amacıyla kuru şartlarda 3 yıl (2000–2003) süreyle bir deneme yürütmüşlerdir. Kök çürüklüğü patojenleri yıllar ve çeşitler üzerinden ortalama %26 oranında verim kayıplarına sebep olmuş aynı zamanda yıllar arasında da önemli değişim göstermiştir. Farklı hububat grupları için verim kayıpları; 12 ekmeklik buğday materyalinde %24,5 makarnalık buğday materyalinde %42,2 arpa materyalinde %12 ve tritikale materyalinde ise ortalama %18 olarak gerçekleşmiştir. Denemede kullanılan materyaller üzerinden tolerans seviyesi makarnalık buğday<ekmeklik buğday<tritikale<arpa olarak belirlenmiştir. Yürütülen bu çalışma açık olarak göstermektedir ki; kuru şartlarda kök çürüklüğü patojenleri ülkemizde ekonomik olarak önemli derecede verim kayıplarına sebep olabilmektedir.

Akgül (2008), Çukurova bölgesi buğday tarlalarında kök, kök boğazı ve sap çürüklüğü hastalığına sebep olan *Fusarium* türlerini belirleme, bazı buğday çeşitlerinin hastalığa karşı reaksiyonları, farklı gübreleme pratiklerinin ve fungusitlerin hastalığın ilerlemesine etkilerini araştırmak için doktora çalışması yürütmüştür. Yürütülen bu çalışmada, Çukurova Bölgesi buğday tarlalarında kök, kök boğazı ve sap çürüklüğü hastalığına sebep olan durumlar tespit edilerek hastalığa sebep olan *Fusarium* türleri teşhis edilmiştir. Bunun yanında, bu türler içerisinde, patojenik karakterdeki *F. culmorum*'un neden olduğu hastalığa karşı bazı ekmeklik buğday çeşitlerinin reaksiyonları, farklı gübre ve fungusit uygulamalarının hastalık gelişimine etkileri araştırılmıştır. İki yıllık sörvey çalışması ile 135 farklı tarlada, hastalık çıkışı %8-100, hastalık şiddeti %2-33,4 oranları arasında değişim göstermiş ve örnek alınan alanların tamamında hastalığın var olduğu tespit edilmiştir. Hastalıklı bitki örneklerinden *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. semitectum* ve *F. verticilloides* türleri izole edilmiş ve *Fusarium* cinsinin dokulardaki fungal flora içerisinde %29,4'lük oranla en sık rastlanan cins olduğu görülmüştür. Denemeye

alınan 12 farklı buğday çeşidinde hastalığa karşı kayda değer ve istikrarlı bir tolerans gözlenememiştir.

Tunali vd. (2008), gerçekleştirdikleri çalışmada Türkiye'deki buğday ekiliş alanlarında problem oluşturan toprak altı patojenlerin varlığını araştırmışlardır. Çalışma kapsamında 2 yıllık periyotta 518 tarla incelenmiş ve incelenen tarlaların %26'dan fazlasının kök çürüklüğü kompleksi içerisindeki bir türle bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Bu kompleks içerisindeki en yaygın türler olarak *Fusarium culmorum* (%14)>*Bipolaris sorokiniana* (%10)>*F. pseudograminearum* (%2) olarak bulunmuştur. Yüksek yağışların neden olduğu kök çürüklüklerini düşük oranda bulmuşlar ve bu etmenleri; %2 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ve %3 *Pythium* spp. olarak bulmuşlardır *Rhizoctonia* spp. İzolatlarının oranı ise çalışma kapsamında elde edilen izolatların %22'sini oluşturmuştur. Ayrıca tahıl arazilerindeki birçok *Fusarium* spp. izolatlarının da patojen olmadıkları anlaşılmıştır ki bu türlerin oranları; %11 (*F. oxysporum* ve *F. chlamydosporum*), %10 (*F. sporotrichioides*) ve %8 (*F. avenaceum* ve *F. solani*) olarak bulunmuştur.

Uyanık (2009) Adana yöresi buğday ekilişlerinde kök hastalıklarının nedenlerini araştırdığı yüksek lisans çalışmasını 2007 ve 2008 yıllarında Adana ve İçel'de 68 buğday tarlasında yürütmüştür. Yaptığı izolasyonlarda 5 *Fusarium*, 2 *Rhizoctonia*, 1 *Pythium* türünü patojen olarak belirlemiştir. *Fusarium semitectum*, *F. oxysporum* ve *F. crookwellense* patojen olarak tespit ettiği *Fusarium* türleridir. Patojenisite çalışmalarında buğday inokulumu kullanmıştır. Buğday danelerini suda haşlamış, kurutup şişelerde 121 °C de 1 saat otoklav ettikten sonra soğutup patates dekstroz agar (PDA) disklerinden oluşan inokulumu ilave ederek 24 °C de 3 hafta inkübasyona bırakmıştır. *Fusarium* buğday kültüründe geliştikten sonra kültürü küvetler içerisinde çeker ocakta kurutup, kurutulmuş inokulumu saksıda patojenisite çalışmalarında kullanmıştır.

Orakçı (2009) buğday çeşitlerinin *F. culmorum*'un neden olduğu kök boğazı çürüklüğüne karşı dayanıklılıklarını belirlemek için yürüttüğü doktora çalışmasında; sera ve tarla koşullarında *F. culmorum* izolatlarının patojenisitesi, inokulasyon tekniklerinin optimizasyonu ve buğday genotiplerinin dayanıklılığı çalışmalarını yürütmüştür. 14 *F. culmorum* izolatının patojenisitesini belirlemiş ve çeşitler arasında izolatların patojenisiteleri yönünden farklılıkları önemli bulmuştur

($P>0.001$). Farklı inokulasyon yöntemlerinin etkinliğini kökçüğe bulaştırma>tohumla bulaştırma>gövdeye bulaştırma olarak belirlemiştir. Dayanıklılık çalışmasında ise 28 hattı toleranslı ümitvar olarak belirlemiştir.

Gargouri vd. (2009), misel-agar ve spor süspansiyonu şeklinde iki farklı inokulasyon yönteminin *Fusarium* spp. ve *Microdochium* spp. izolatlarının patojenisiteleri üzerine etkilerini incelemiştir. Çalışmada 15 *F. culmorum* izolatu kullanmışlardır. Her iki tekniği de istatistiki olarak önemli bulmuşlardır. Misel-agar yönteminde hastalık şiddetinin spor süspansiyonundan daha yüksek olarak ortaya çıktığı belirtilmektedir. Patojenisite testlerinde kullanılan *F. culmorum*, *M. nivale* var. *nivale*, *F. avenaceum* ve *F. pseudograminearum* spor süspansiyonu uygulamasında tohumlardan tekrar izole etmişlerdir. Bütün izolatların fidelerin saplarında renk değişimine neden olduğu ve bütün gözlemlerde *F. culmorum* ve *F. pseudograminearum*'un en büyük renk değişimine sebep olduğunu bildirmişlerdir. Bununla beraber *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* ile kıyaslandığında; saptardan ve tohumlardan en yüksek sıklıkta izole edilen fungus olarak belirlenmiştir. Bütün bu sonuçların ışığında *F. culmorum* tohumdan ve saptan izole edilen en agresif patojen olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak infekteli tohumların ve bitki artıklarının patojenlerin hayatta kalmalarında en büyük 19 etken olduklarını ve kök ve kök boğazı çürüklüğüne ve başak yanıklığına sebep olduklarını belirtmişlerdir.

Gebremariam vd. (2018), Türkiye'deki buğday ekiliş alanlarında toprak altı hastalıklarına neden olan *Fusarium* türlerinin tespiti için 2013 yılında oldukça geniş bir arazi çalışması gerçekleştirmişlerdir. 200 tarladan toplanan örneklerden elde edilen *Fusarium* spp. izolatlarının morfolojik teşhislerini doğrulamak için ayrıca *Efl- α* gen bölgesini sekans dalarını da değerlendirmişlerdir. 17 *Fusarium* türünü temsilen 339 izolatu değerlendirildiği çalışmada izolatlar *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. brachygybosum*, *F. hostae*, *F. redolens*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. torulosum*, *F. proliferatum*, *F. flocciferum*, *F. solani*, *F. incarnatum*, *F. tricinctum* ve *F. reticulatum* türleri içerisinde girdiği anlaşılmıştır. *Fusarium equiseti* %36'lık bir oran ile en sık izole edilen tür olmuştur. En fazla zarar oluşturan türler içerisinde ise sırasıyla *F. culmorum* %13.6, *F. pseudograminearum* %1 ve *F. graminearum* %0.5 olarak bulunmuştur. 17 *Fusarium* türünden altı türü ile patojenisite çalışmaları

gerçekleştirilmiştir. *Fusarium culmorum*, *F. pseudograminearum* ve *F. graminearum* ciddi taç çürüklüğüne neden olmuştur. *Fusarium avenaceum* ve *F. hostae* izolatları ise zayıf veya orta derecede patojen bulunmuştur. *Fusarium redolens* zayıf patojen olarak bulunmuşken *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. solani*, *F. incarnatum*, *F. reticulatum*, *F. flocciferum*, *F. tricinctum*, *F. brachygibbosum*, *F. torulosum*, *F. acuminatum* ve *F. proliferatum* patojen olmadığı anlaşılmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Çalışma

3.1.1 Materyal

Yürütülmüş olan bu çalışmada incelenen hastalıklı bitki materyalleri Azerbaycan'ın önemli hububat ekiliş alanlarından Uluslararası Mısır ve Buğday Geliştirme Merkezi (International Maize and Wheat Improvement Center =CIMMYT) toprak kökenli patojenleri tarama çalışması dahilinde elde edilmiştir.

Bu araştırmada kapsamında yürütülmüş çalışmalar özetle buğday ve arpa ekiliş alanlarından toplanmış kök çürüklüğü belirtisi gösteren hastalıklı bitki örneklerinden hastalığa sebep olan *Fusarium* spp. izolatlarının izolasyonunu, izolasyonu gerçekleştirilen izolatların tür teşhisi ve tanımlanan türlerin patojenisite çalışmaları yer almaktadır. Yürütülen çalışmaların metotları aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

3.1.2 Fungal İzolasyon

Bu çalışmada her tarlalardan toplanan bitkilerin üst kısımları kesilip atılarak kökleri ile kağıt torbalara alınmış, torbaların üzeri numaralandırarak laboratuvara getirilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir. Örnekler izolasyondan önce yıkanmış ve kök kısımlarından toprakları temizlenmiştir (Şekil 3.1). Örneklerin kök, kök boğazı ve saplarının ikinci boğuma kadar olan kısmı kesilmiştir (Şekil 3.2). Önce makroskobik incelenmiş ve farklı belirtiler gösteren örnekler gruplandırılmıştır. Gruplar içerisinde tipik belirtiler gösteren altışar bitki seçilmiştir. Sonra kök, kök boğazı ve saplarının 10 cm'lik kısımları alınmıştır. Her örnek önce 5-6 mm uzunluğunda kesilerek %2'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda iki dakika süreyle yüzeysel olarak sterilize

edildikten sonra iki kez steril damıtılmış suda durulanmış ve ardından steril kurutma kağıtlarına aktarılıp steril bir kabın içerisinde kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 3.1. Toplanan örneklerin köklerinin yıkanma aşaması.



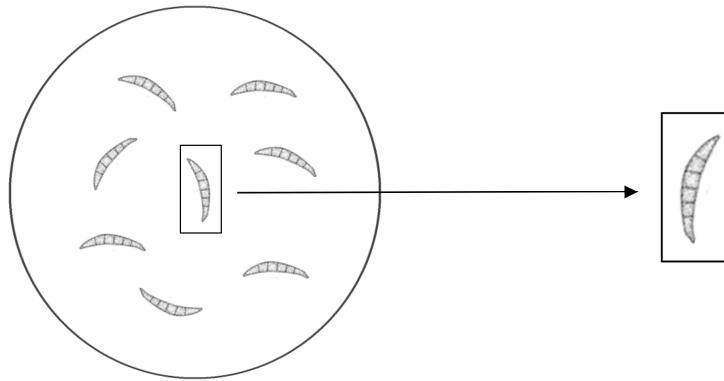
Şekil 3.2. Toplanan örneklerin yıkanmış ve kesilmiş görüntüsü.

İzolasyonlarda 1/5 kuvvetinde patates dekstroz agar (PDA) besi ortamı içeren Petri kapları hazırlanmıştır. 8 gr PDA (Merck, Darmstadt, Almanya) + 15 gr agar (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) içeren besi ortamları, 121 °C sıcaklık ve 1 atm basınçta 15 dakika süreyle sterilize edilip ardından 50 °C'ye soğutulduktan sonra

içerisinde bakteriyel gelişimi engellemesi için streptomycin (0,1 g/L) ve chloramphenicol (0,05 g/L) eklenmiş ve 9 cm çaplı Petri kaplarına dökülmüştür. Yüzeysel olarak sterilize edilen bitki dokuları, bu ortam üzerinde aktarılmış ve Petri kapları *Fusarium* spp. izolatlarının sporulasyonunu uyarılması amacıyla black light florasan lamba altında 24 ± 2 °C'de 1 hafta inkübe edilmiştir.

Fusarium türlerinin sporulasyonunu teşvik etmek ve taksonomik özelliklerini incelemek amacıyla sentetik besin agarı (SNA) (Samson vd., 2002) ortamı kullanılmış ve bu ortama alınan *Fusarium* spp. izolatları tekrar black light florasan lamba takılarak modifiye edilmiş inkübatörlere yerleştirilmiştir. Elde edilen izolatlar 4-5 °C'de saklanmıştır. Funguslar stereo mikroskop altında incelenmiş ve türlerine göre gruplandırılarak teşhisleri mikolojik kriterlere göre yapılmıştır (Leslie ve Summerell, 2006)

Steril saf suya SNA'dan elde edilen küçük bir makrokonidi koyarak konidiyal süspansiyon yapılmıştır. Spor süspansiyonu %2 su agarı (Water Agar = WA) üzerine dökülmüştür. (Burgess vd., 1994; Leslie ve Summerell, 2006). WA plakaları karanlıkta 25 °C'de yaklaşık 18 ila 20 saat boyunca eğimli bir pozisyonda (30-40 °C) inkübe edilmiştir (Burgess vd., 1994). Su agarından çimlenmiş olan bir konidi, steril düzleştirilmiş uç iğnesi kullanılarak küçük bir agar karesi içinde dikkatlice çıkarılmış ve yeni bir SNA ortamına aktarılmış ve yukarıda belirtilen ışık ve sıcaklık koşullarında 7-10 gün boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen monosporik *Fusarium* kültürleri %15 gliserolde, derin dondurucuda (-80 °C) ilave çalışmalarda kullanılmak üzere uzun süreli muhafaza için depolanmıştır.



Şekil 3.3. Tek spor izolasyonunda izlenen prosedürü gösteren bir diyagram.

3.2 *Fusarium* Türlerinin Karakterizasyonu

3.2.1 Morfolojik Karakterizasyon

Fusarium türlerinin morfolojik tanımlamaları, *Fusarium* tanımlama el kitapları kullanılarak yapılmaktadır ve makro ve mikrokonidilerin morfolojisi, fiyalid yapısı, misel özellikleri, PDA ortamındaki koloni pigmentasyonu ve büyüme oranlarına dayanmaktadır (Leslie ve Summerell, 2006). Havai miselyumun agardaki pigmentasyonu, monosporik *Fusarium* kültürlerinin PDA üzerinde 7 gün boyunca 25 °C / 20 °C sıcaklıkta, 12 saatlik periyotlarla black light floresan ışığı altında inkübasyona bırakıldıktan sonra incelenmiştir. PDA'da kültürlerinin tam karanlıkta 25 °C'lik bir sıcaklıkta 72 saat boyunca bekletilip gelişmesinden sonra Petri kaplarında gelişme çapları ölçülmüştür. Her plaka için 90° açıda (dik) iki ölçüm alınmıştır. Makro ve mikrokonidilerle morfolojiyi, fiyalid yapısı ve chlamyospore varlığı veya yokluğunu incelemek için monosporik *Fusarium* izolatları SNA'ya aktarılmıştır. 7-10 gün boyunca 25 °C gündüz / 20 °C gece sıcaklıklarında 12 saatlik periyotlarla beyaz ve black light floresan ışığı altında inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2 Moleküler Karakterizasyon

3.2.2.1 Fungusların Geliştirilmesi

Miselyumlar, 7-10 günlük *Fusarium* kültürlerinden, Patates Dekstroz Suyu (PDA) besisi yerine alınmıştır. Misel yığını, steril 1 mL pipet uçları ile çekilerek toplanmış ve steril tüplere aktarılmıştır. Geri kalan ortam boşaltılmış ve misel yığını yıkamak için yaklaşık 10 mL steril saf su ilave edilmiştir ve daha sonra miselleri steril filtre kurutma kağıdına bastırarak kurutulmuştur. Suyunun alınmasından sonra, misel/spor yığını steril bir 1,5 mL'lik Eppendorf tüpe aktararak DNA izolasyonuna kadar -20 °C'de saklanmıştır.

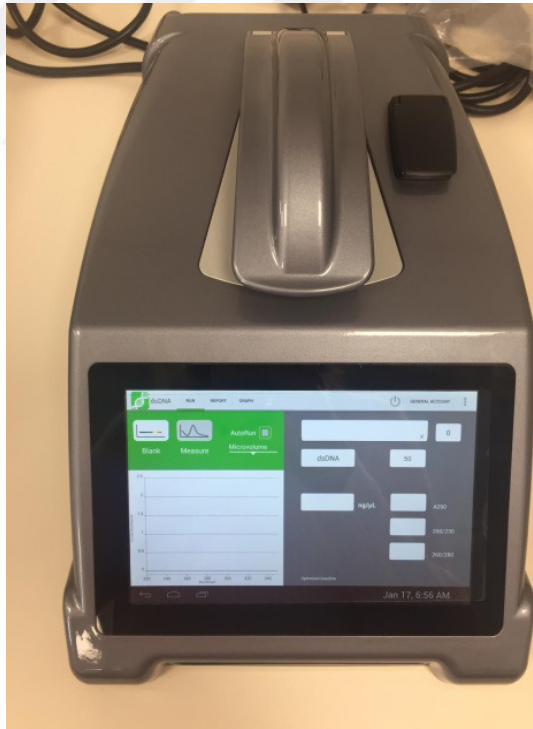
3.2.2.2 DNA İzolasyonu

Genomik DNA, DArT protokolu kullanılarak her *Fusarium* spp. izolatlarından tek tek ekstrakte edilmiştir.

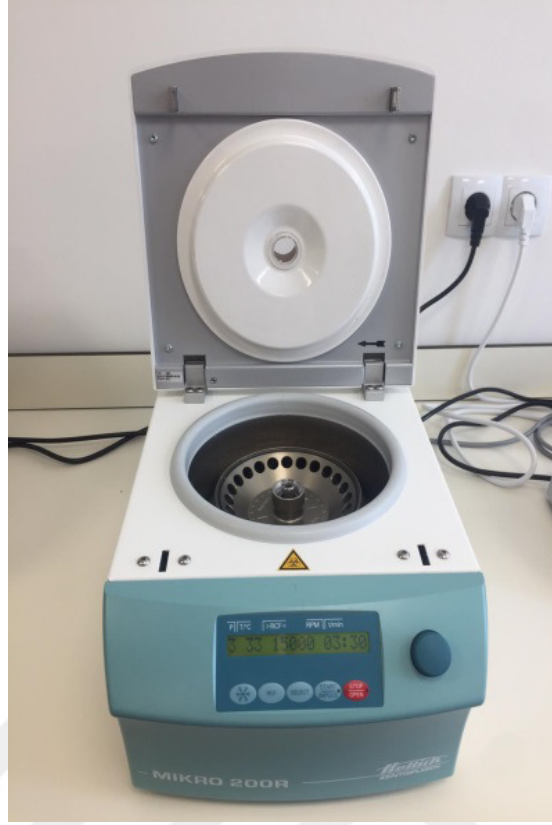
İzolatların genomik DNA'sının izolasyonu amacıyla DArT protokolünde (<http://www.diversityarrays.com>) açıklanan bir hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) tabanlı yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Her izolata ait 1,5 mL'lik Eppendorf tüpe aktarılmış olan yaklaşık 100 mg misel/spor dokusuna önceden ısıtılmış olan (65 °C) 750 µL ekstraksiyon–lizis tamponu (125 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA pH 8,0, %2 CTAB, %2 PVP-40, 0,8 M NaCl, %0,5 sodium disulfite, %1 sarcosyl) tüpe eklenmiştir. Örnekler bir mikro homojenizatör kullanılarak homojen hale getirilmiş ve her 15 dakikada bir hafifçe ters düz edilerek 65 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuru blok ısıtıcıdan (Şekil 3.4) alınan örnekler oda sıcaklığına kadar soğutularak üzerlerine 750 µL kloroform/izoamil alkol (24:1 w/w) eklenmiş ve 10 dakika süre ile yavaşça ters düz edilerek 12000 g'de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatantlar temiz 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak üzerlerine DNA'yı çökeltmek için 0,6 hacim soğuk izopropanol eklenmiştir. 12000 g'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra (Şekil 3.6), süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletler 2 kez %70'lik soğuk etanolle yıkanmış ve oda sıcaklığında 30 dakika ile kurutulmuştur. DNA 200 µL steril ultra saf su içinde çözülerek, konsantrasyonu DS-11 FX Serisi Spektrofotometre (Denovix Inc., ABD) ile ölçülmüş (Şekil 3.5) ve PCR çalışmaları için 50 ng/µL'ye ayarlanmıştır.



Şekil 3.4. DNA izolasyonunda kullanılan kuru blok ısıtıcısı.



Şekil 3.5. DNA izolasyonunda kullanılan spektrofotometre.



Şekil 3.6. DNA izolasyonunda kullanılan santrifüj cihazı.

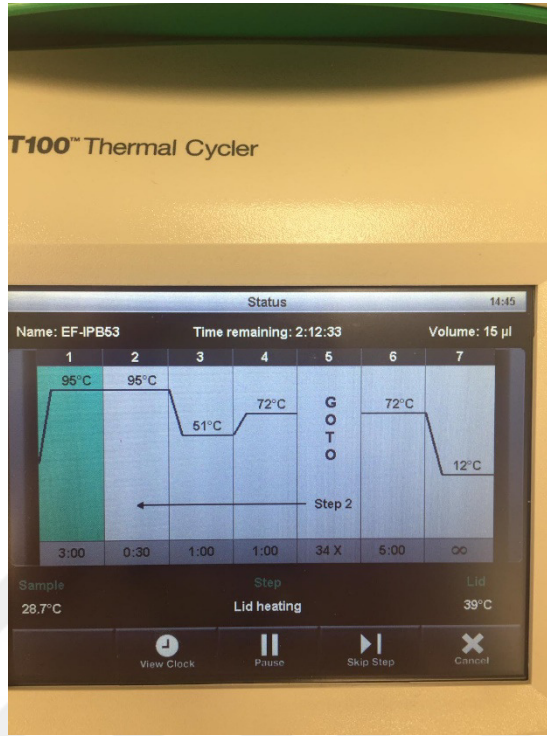
3.2.2.3 PCR Reaksiyonu

Fusarium türlerine ait izolatların genomik DNA'sının Translation Elongation Factor 1- α (*Ef-1 α*) gen bölgesi, ef1 (5'- ATG GGT AAG GA(A/G) GAC AAG AC - 3') ve ef2 (5'- GGA (G/A)GT ACC AGT (G/C)AT CAT GTT -3') primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir (O'Donnell vd., 1998).

Her 30 μ L PCR reaksiyon karışımı; 25-50 ng fungal DNA, 6 μ L 5X tampon solüsyonu, 1,5 mM MgCl₂, 0,13 mM dNTP, 0,35 μ M ef1 (ileri primer), 0,35 μ M ef2 (ters primer), 1,5 ünite *Taq* polimeraz (Dream *Taq* DNA polimeraz, Fermentas) ve polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction Amplification = PCR) için yeterli saflıkta su içermektedir.

PCR amplifikasyonu, bir T100 termal cycler (BioRad, Hercules, CA, ABD)'in başlangıçta denatüre edici sıcaklığı olan 95 °C' de 3 dakika, 95 °C' de 30 saniye denatürasyon, 51 °C'de ise 1 dakika annealing (bağlanma) sıcaklığı, 72 °C'de

1 dakika uzama sıcaklığı olarak toplam 35 döngü ve 72 °C' de 5 dakika boyunca final uzama sıcaklığı ile tamamlamıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. *Fusarium* türlerinin *Ef-1α* bölgelerinin PCR amplifikasyonu için kullanılan T100 termal cycler'in ekran görüntüsü.

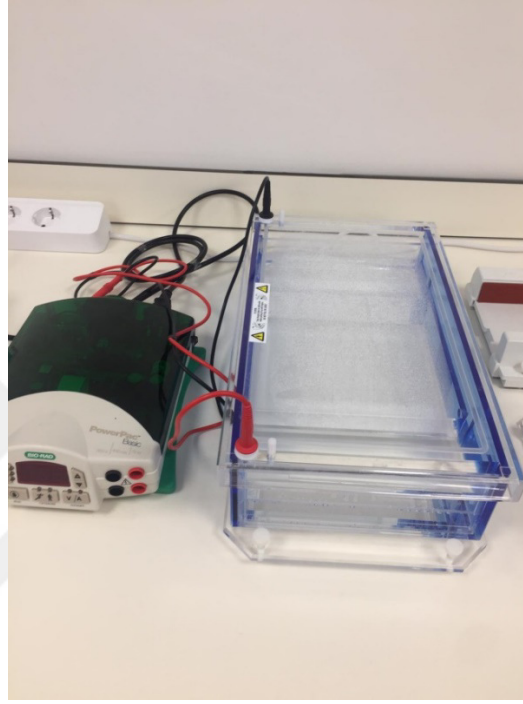
3.2.2.4 Agaroz Jel Elektrofrez

PCR ürünleri 0,5X Tris-borate-EDTA (TBE) tampon solüsyonunda %1'lik agaroz jel içerisinde 90 volt 60 dakika elektrofretik ayrıma tabi tutulmuşlardır. %1 agaroz jeli hazırlamak için 160 ml 0,5X TBE'ye 1,6 g agaroz ilave edilmiştir. Karışım mikrodalgada yaklaşık 2 dakika kadar ısıtılmıştır. Çözelti elle tutabilecek sıcaklığa uygun olana kadar soğuması için bekletilmiştir. Daha sonra jel tepsisine dökülmüştür. Jelin hazırlanmasında son adım olan oyukları açmak için ise tarak koyulmuş ve jelin donması beklenmiştir.

Jelin oyukları içine 10 µL PCR ürünü yüklenmiştir. İçerisinde TBE tampon çözeltisi bulunan elektrofrez tankına jel yerleştirilmiştir. Elektrik akımı sağlamak için bir güç kaynağına bağlanmıştır ve bu elektrik akımı negatif yüklü DNA'nın

pozitif yüklü katoda doğru hareket etmesini sağlayarak DNA'ların bu yöndeki hareketini başlatmıştır (Şekil 3.8).

Yaklaşık 1 saat sonra, jel dikkatlice çıkarılmış ve 15-20 dakika etidyum bromür içeren solüsyonda bekletilmiş ve bir G:BOX F3 jel görüntüleme sistemi (Cambridge, UK: Syngene) yardımı ile jelin fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Güç kaynağı ve elektroforez tankı.



Şekil 3.9. G:BOX F3 jel görüntüleme sistemi (Cambridge, UK: Syngene).

3.2.2.5 Sekans ve Sekans Analizi

Elektroforez sonucu bantların varlığı anlaşılan ürünleri geri kalan 20 μ L'si ABI Prism® 3730xi cihazı yardımı ile sekans bilgilerinin elde edilmesi amacı ile ticari bir şirkete (Macrogen, Seoul, Güney Kore) gönderilmiştir. Sekans tek yönlü ef1 primeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ham sekans dataları Mega7 programı kullanılarak işlenmiş ve NCBI GenBank ta bulunan diğer sekanslarla benzerliklerinin karşılaştırmak için BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen sekanslar ClustalW program kullanılarak alignment analizi gerçekleştirilmiştir (Thompson vd., 1994). Fusarium türlerine ait izolatlara ait sekanslar ile GenBank'tan elde edilen referans izolatların sekansları ile Mega7 programı kullanılarak filogenetik ağacı Neighbor-joining dendrogramı Tamura ve Nei (1993) modeli kullanılarak 1000 bootstrap tekrarı ile çizilmiştir.

3.3 Patonejisite Testi

Monosporik *Fusarium* spp. izolatları, patojenisite testinde inokulum oluşturmak için PDA üzerinde geliştirilmiştir. Çalışmalarda Seri 82 buğday çeşidi kullanılmıştır.

Buğday tohumlarının %1'lik NaOCl çözeltisi (v/v) ile yüzey dezenfeksiyonunu yapmak üzere geçen süreyi (1, 2 ve 3 dakika) kontrol etmek için bir ön deneme gerçekleştirilmiştir. Bu sürelerin hepsinde buğday tohumları çimlenmeye başlamıştır. Bu nedenle, buğday tohumlarının yüzey dezenfeksiyonu için 3 dakika boyunca %1'lik NaOCl çözeltisi kullanılmıştır (Şekil 3.10). Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış olan tohumlar iki kez sterilize edilmiş olan damıtılmış su içinde durulanmış ve steril filtre kağıdı üzerinde kurutulmuştur. Tohumlar daha sonra steril damıtılmış suyla doyurulmuş bir filtre kağıdı destesiyle Petri kabına yerleştirilmiştir (Şekil 3.11) ve çimlenme için 3-4 gün boyunca 25 °C'lik bir sıcaklıkta bir etüvde tutulmuştur (Şekil 3.12).



Şekil 3.10. Tohumların sterilizasyon aşaması.

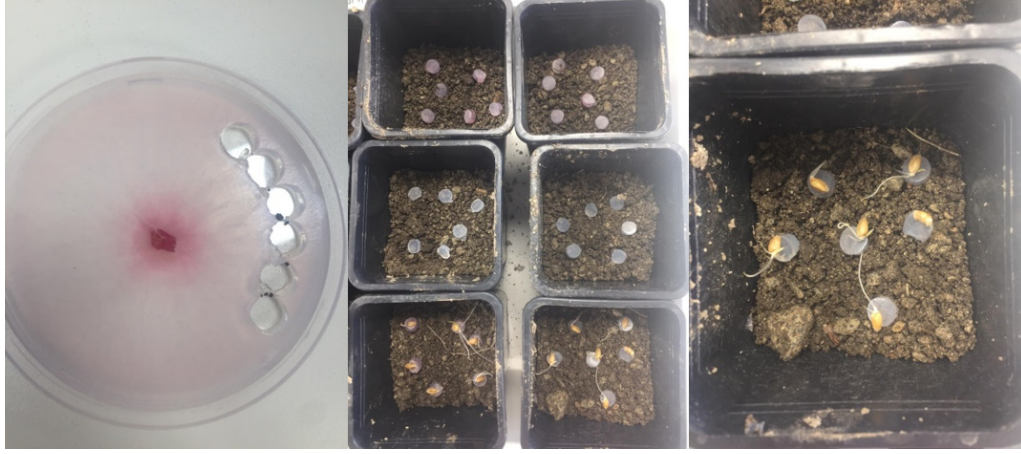


Şekil 3.11. Tohumların sterilizasyonu ve Petrilere ekim aşaması.

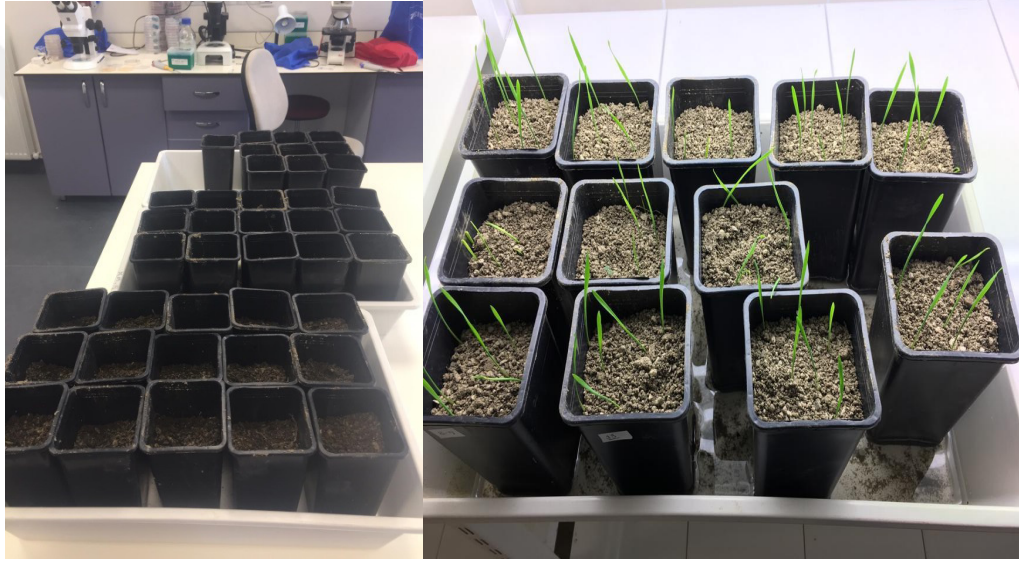


Şekil 3.12. Tohumların inkübasyon aşaması.

Patojenisite testi için buğday fideleri steril saksılarda 50:40:10 kum, toprak ve organik madde (v/v/v) karışımı kullanılarak yetiştirilmiştir. Toprak karışımı bulunan saksıların üzerine yaklaşık 7 günlük kültürlerden alınan 0,5 santimetre çapındaki miselyal diskler koyulmuştur. Agar disklerin üzerine tek bir tohum yerleştirilmiştir ve ince bir toprak karışımıyla kapatılmıştır (Şekil 3.13). Bitkiler, 16 saat suni ışık koşullarında ve 25 °C gündüz ve 15 °C gece sıcaklıklarında %60-80 bağıl nem koşullarında büyüme odasında tutulmuştur (Mitter vd., 2006), (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15). Bitkiler gerektiğinde sulanarak test süresince tekrarlanmıştır.



Şekil 3.13. Besi yerinden disk şeklinde alınması ve toprağa yerleştirilmesi.



Şekil 3.14. Patojenisite için ekilen tohumların gelişme süreci.



Şekil 3.15. İklim odasında yetişen bitkiler.

Aşılama işleminden dokuz hafta sonra bitkiler topraktan yıkanmıştır. Taç ve ana gövde tabanındaki tipik esmerleşme/çürüme yüzdesine dayalı olarak Nicol vd., (2001)'in (Wildermuth ve McNamara'dan 1994'den modifiye edilmiştir) 1-5 skalası (1: %1-9 Dayanıklı, 2: %10-29 Orta dayanıklı, 3: %30-69 Orta hassas, 4: %70-89 Hassas, 5: %90-99 Çok hassas) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.16).

Patojenler, her bir patojenik türün temsili izolatları için Koch postulatlarını yerine getirmek için aşılanmış bitkilerin ve kontrol bitkilerde oluşan belirtilerden yeniden izole edilmiştir. Yeniden izole edilen kültürlerin morfolojilerini, türlerin bilinen kültürleriyle karşılaştırarak bunlara karşılık gelen *Fusarium* türleri olarak doğrulanmıştır. Kontrol bitkilerinde herhangi bir *Fusarium* spp. kültür gelişimi gözlenmemiştir.



Şekil 3.16. Bazı bitki köklerinin *Fusarium* türlerine karşı gösterdiği reaksiyon sonucunun 1-5 skalasına göre değerlendirilmesi.



Şekil 3.17. Bazı bitki köklerinin *Fusarium* türlerine karşı gösterdiği reaksiyon sonucunun 1-5 skalasına göre değerlendirilmesi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 Patojen Olan Fungusların Tür Düzeyinde Belirlenmesi

Bu çalışmada, Azerbaycan'ın farklı buğday yetiştirme bölgelerindeki 19 buğday tarlası ve 16 arpa tarlası olmak üzere toplam 35 tarladan toplanan örneklerden toplam 200 *Fusarium* izolatu elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Yapılan izolasyonlar sonucunda bu bölgelerden elde edilen *Fusarium* türlerinden en yaygın olanı *F. culmorum* (80) olarak tespit edilmiş bu sırayıda *F. acuminatum* (67) takip etmiştir. Üçüncü olarak *F. pseudograminearum* (17) bulunmuştur. Diğer fungus türleri ise *F. equiseti* (14), *F. proliferatum* (9), *F. oxysporum* (7) ve *F. graminearum* (6) olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu *Fusarium* türlerinin bu bölgelerde bulunma yoğunlukları ise yukarıda türlerin belirtildiği sıra ile %40, %34, %8,5, %7, %4,5, %3,5 ve %3 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Bölge'de arpa tarlalarından elde edilen izolat sayıları ise *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* ve *F. proliferatum* türleri için sırasıyla 31, 11, 38, 9, 3, ve 3 olarak bulunmuş, buna rağmen arpa arazilerinden herhangi bir *F. graminearum* izolatu elde edilememiştir. Benzer şekilde bu rakamlar buğday tarlalarından elde edilen izolatlar için *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* ve *F. proliferatum* türleri için sırasıyla 49, 6, 6, 29, 5, 4 ve 6 olarak tespit edilmiştir.

Hububat ekiliş alanlarında yürütülmüş çalışmalarda elde edilen türler ve türlerin oranlarına ait veriler çalışmamız sonucunda elde edilen verilerle büyük oranda örtüşmektedir. Örneğin Tunali vd., (2008) Türkiye'deki hububat alanlarından elde ettiği kök çürüklüğü fungal izolatları içerisinde en yaygın türü *F. culmorum* olarak bulmuştur.

Çizelge 4.1. İzolasyonu gerçekleştirilen örneklerin izolat numaraları, lokasyonları, koordinatları ve elde edilen izolat sayıları

No	Lokasyon	Bitki	Enlem	Boylam	Fc	Fg	Fpg	Fac	Fe	Fo	Fp
1	Qobustan	Buğday	40° 30' 28 N	48° 59' 21 E				3			
2	İsmayilli	Buğday	40° 40' 39 N	48° 32' 70 E				4			
3	İsmayılı	Arpa	40° 47' 10 N	48° 10' 71 E				2			
4	İsmayılı	Buğday	40° 40' 46 N	48° 04' 86 E		3		1			
5	İsmayılı	Buğday	40° 46' 34 N	48° 01' 97 E		3		3			
6	İsmayılı	Buğday	40° 43' 33 N	48° 00' 85 E				4			
7	İsmayılı	Buğday	40° 42' 63 N	47° 59' 11 E				2			
8	İsmayılı	Arpa	40° 42' 65 N	47° 57' 33 E				3			
9	Şəki	Arpa	41° 02' 42 N	47° 26' 19 E				3	3		
10	Şəki	Arpa	41° 07' 01 N	47° 15' 83 E			5	2			
11	Şəki	Arpa	41° 02' 33 N	47° 09' 33 E				2		3	
12	Şəki	Buğday	41° 02' 34 N	47° 09' 36 E						2	
13	Şəki	Arpa	41° 00' 11 N	47° 07' 21 E				4			
14	Şəki	Arpa	41° 00' 09 N	47° 07' 27 E	3			2	3		
15	Şəki	Arpa	40° 53' 62 N	47° 11' 62 E				3			
16	Şəki	Arpa	40° 50' 91 N	47° 13' 13 E	4			4			
17	Şəki	Arpa	40° 50' 92 N	47° 13' 17 E				3			
18	Bərdə	Buğday	40° 19' 84 N	47° 07' 76 E	4						
19	Bərdə	Buğday	40° 19' 84 N	47° 07' 76 E	4						
20	Bərdə	Buğday	40° 17' 00 N	47° 11' 48 E	3						
21	Bərdə	Buğday	40° 16' 95 N	47° 11' 53 E	5		3			2	
22	Bərdə	Buğday	40° 16' 61 N	47° 11' 36 E	4						
23	Ağdaş	Arpa	40° 16' 11 N	47° 12' 24 E	3			3			
24	Ağdaş	Arpa	40° 16' 11 N	47° 12' 24 E	5						
25	Ucar	Buğday	40° 27' 78 N	47° 51' 14 E	5		3				
26	Ucar	Arpa	40° 27' 45 N	47° 51' 94 E	4		2				
27	Kürdəmir	Buğday	40° 05' 64 N	48° 09' 21 E	5						
28	Kürdəmir	Arpa	40° 05' 64 N	48° 09' 21 E	5		4		3		
29	Kürdəmir	Arpa	40° 05' 07 N	48° 10' 43 E	3			3			
30	Kürdəmir	Buğday	40° 05' 07 N	48° 10' 43 E	5				2		
31	Kürdəmir	Buğday	40° 05' 12 N	48° 11' 56 E	4			4			2
32	Kürdəmir	Arpa	40° 05' 12 N	48° 11' 56 E	4			4			3
33	Kürdəmir	Buğday	40° 05' 19 N	48° 12' 47 E	2			2			2
34	Kürdəmir	Buğday	40° 05' 19 N	48° 12' 47 E	3			3			2
35	Kürdəmir	Buğday	40° 14' 74 N	48° 26' 37 E	5			3	3		
Toplam					80	6	17	67	14	7	9

^a Fc *F. culmorum*, Fpg *F. pseudograminearum*, Fg *F. graminearum*, Fac *F. acuminatum*, Fe *F. equiseti*, Fo *F. oxysporum*, Fp *F. proliferatum*

Çizelge 4.2. İzolasyonu gerçekleştirilen örneklerin izolat numaraları, lokasyonları, koordinatları ve izolatların bulunma oranları

Şehir	Tarla No.	Lokasyonların Koordinatları		Fc	Fg	Fpg	Fac	Fe	Fo	Fp
		Enlem (N)	Boylam (E)							
Qobustan	1	40° 30' 28	48° 59' 21	0	0	0	3	0	0	0
İsmayilli	9	40° 40'-40° 47'	47° 57' -48° 32'	0	6	0	19	0	0	0
Şeki	20	40° 50'-41° 07'	47° 07' -47° 26'	7	0	5	23	6	5	0
Bərdə	10	40° 16'-40° 19'	47° 07' -47° 11'	20	0	3	0	0	2	0
Ağdaş	2	40° 16'	47° 12'	8	0	0	3	0	0	0
Ucar	5	40° 27'-40° 27'	47° 51' -47° 51'	9	0	5	0	0	0	0
Kürdəmir	24	40° 05'-40° 14'	48° 09' -48° 26'	36	0	4	19	8	0	9
Toplam	71	Toplam İzolat Sayısı:		80	6	17	67	14	7	9
İzolatların bulunma oranı (%)				40	3	8,5	34	7	3,5	4,5

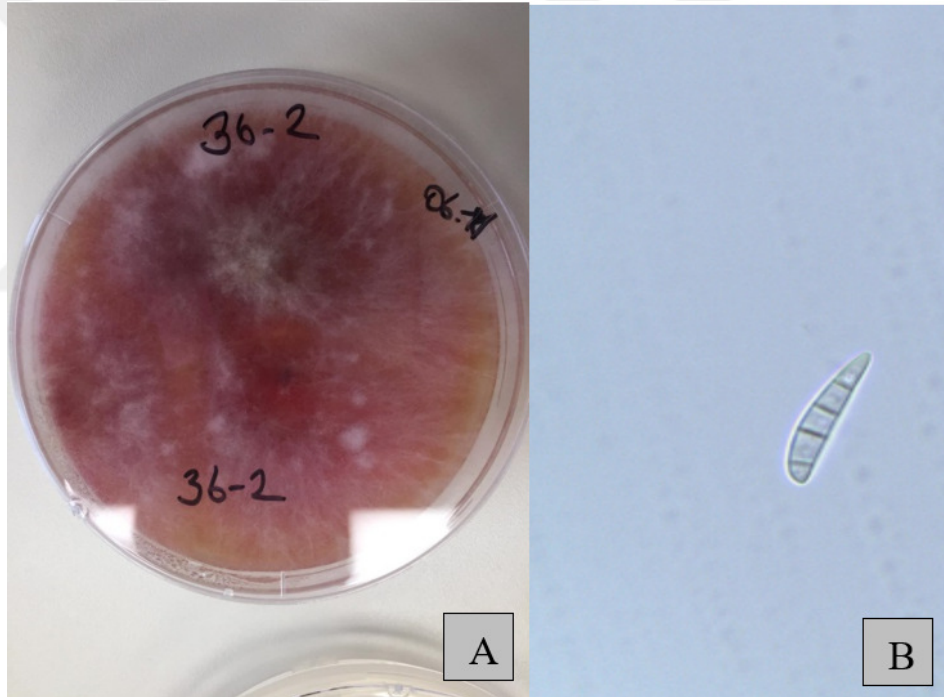
^a Fc *F. culmorum*, Fpg *F. pseudograminearum*, Fg *F. graminearum*, Fac *F. acuminatum*, Fe *F. equiseti*, Fo *F. oxysporum*, Fp *F. proliferatum*

4.1.2 Morfolojik Karakterizasyon

SNA'da geliştirilen funguslardan yapılan izolasyon sonucu elde edilen *Fusarium* türlerinin morfolojik teşhisi *Fusarium* spp. sporları lam ve lamel preparatları arasına konularak 400x büyütmede mikroskop altında incelenmiş ve hem oluşturdukları makrokonidilerin boyutları, hücresel yapıları, uç yapıları, bölme sayıları gibi özelliklerine bakılarak hem de PDA besi yerinde oluşturduğu pigmentasyonu, misel özelliklerine bakılarak Leslie ve Summerell (2006)'e göre tür düzeyinde gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.1 *Fusarium culmorum*

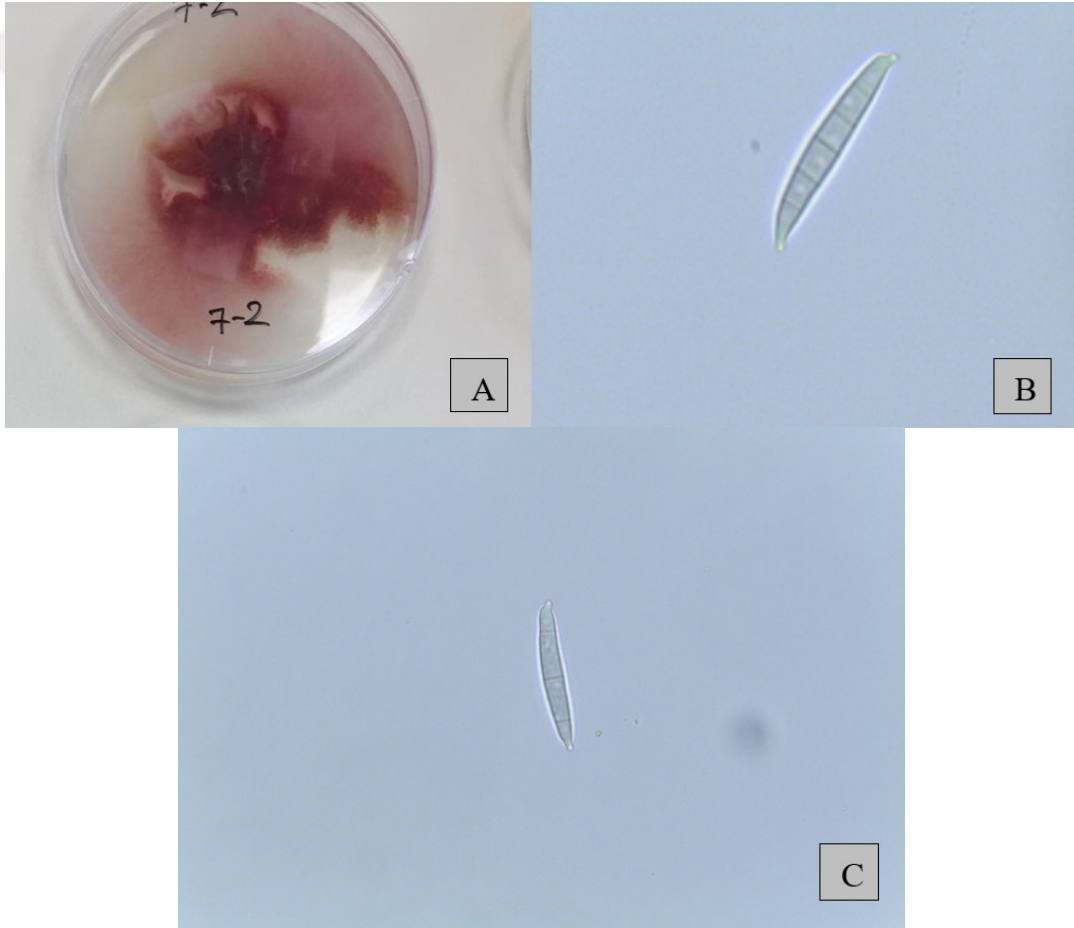
Hemen hemen her *F. culmorum* izolatu PDA'da ve SNA'da benzer koloni özellikleri göstermiştir. Büyüme oranları 40 ila 48 mm arasında değişerek hızlı büyümüşlerdir (Çizelge 4.3). *F. culmorum*, Petri kabını bir hafta içinde tamamen kaplayan (Şekil 4.1A) bol miktarda misel oluşturmuş ve PDA'da karmin kırmızısı pigmenti üretmiş ve şekil bakımından çok benzer olan makrokonidiler üretmiştir (Şekil 4.1B). *F. culmorum*, 3-4 ve çoğunun 4 bölme olduğu kalın duvarlı makrokonidiler üretmiştir (Şekil 4.1B). Üretilen makrokonidiler, ayak şeklinde belirgin bir bazal hücreye sahip değildir, ancak çentikli bazal hücrelere ve yuvarlak ve kör apikal hücrelere sahip olduğu gözlemlenmiştir. *Fusarium culmorum*, SNA'da mikrokonidiler oluşturmamıştır.



Şekil 4.1. *Fusarium culmorum* [PDA üzerindeki koloni pigmentasyonu (A), SNA üzerinde gelişen makrokonidiler (B)].

4.1.2.2 *Fusarium graminearum*

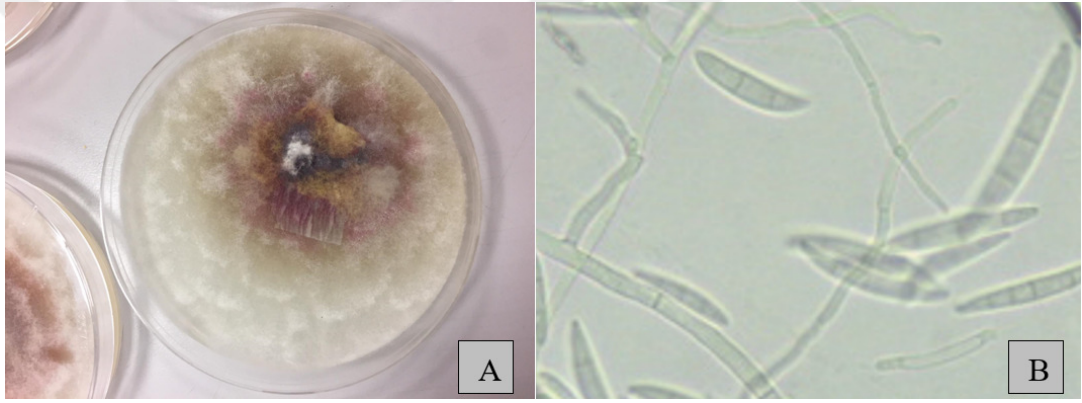
Fusarium graminearum izolatu PDA'da hızla büyümüş ve büyüme oranları 40-45 mm olarak gözlemlenmiştir (Çizelge 4.3). Karmen kırmızısı rengi oluşturduğu tespit edilmiş (Şekil 4.2A) ve PDA üzerinde kırmızı pigment oluşturan yoğun misel üretmiştir. *F. graminearum* göreceli olarak ince (5-8 μm), uzunluğu 50 ila 60 μm arasında değişen kalın cidarlı makrokonidiler oluşturmuştur (Çizelge 4.4). Makrokonidiler, iyi gelişmiş ayak şeklindeki bazal hücre ve konik apikal hücrelerle, orta derecede düz ve hafif bir şekilde kavislidir (Şekil 4.2B ve 4.2C). Üretilen makrokonidilerin bölme sayısı 4 ila 6 arasında değişmiştir (Şekil 4.2B ve 4.2C).



Şekil 4.2. *Fusarium graminearum* [PDA üzerindeki koloni pigmentasyonu (A), makrokonidiler (B), makrokonidiler (C)].

4.1.2.3 *Fusarium pseudograminearum*

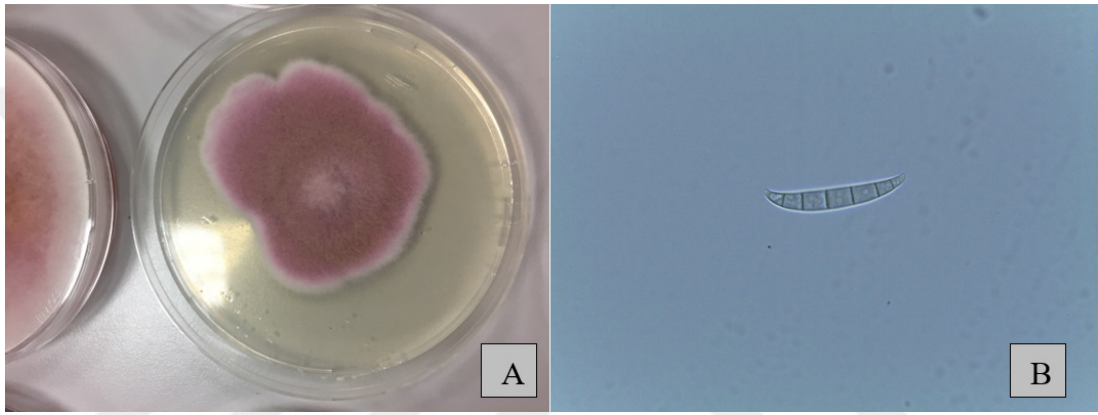
F. pseudograminearum izolatları, PDA'da benzer koloni özellikleri göstermişlerdir. İzolatların hızla büyüdüğü gözlemlenmiş ve 72 saatlik büyüme oranlarının 25 ila 39 mm arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Çevresinde beyaz ve merkezde sarıya yakın olan bol miktarda misel oluşturmuşlardır. *F. pseudograminearum* izolatları PDA'da pembe pigment üretmiştir (Şekil 4.3A). *F. pseudograminearum* orta-uzun (47-59 µm), nispeten ince (6-8 µm) makrokonidiler (Çizelge 4.4) üretmiştir ve bu makrokonidilerin neredeyse düz ila orta derecede kavisli, ayak şeklinde bazal hücreler ve kavisli apikal hücreli olduğu tespit edilmiştir. Makrokonidilerin 5 ila 6 bölme sayısına sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3B).



Şekil 4.3. *Fusarium pseudograminearum* [PDA üzerindeki koloni pigmentasyonu (A), macroconodia (B)].

4.1.2.4 *Fusarium acuminatum*

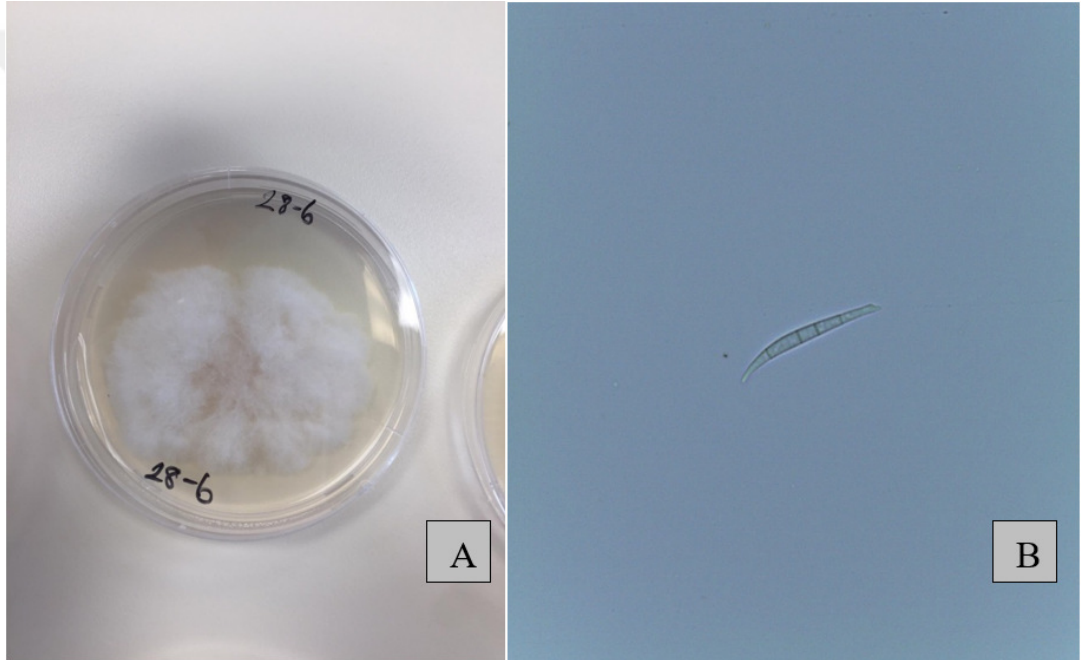
Fusarium acuminatum izolatları, 20-30 mm büyüme oranları ile orta derecede bir hızla büyümeye göre nispeten daha yavaştır (Çizelge 4.3). Üretilen izolatlar gül renginde bordo rengine değişen miselyum şeklinde gelişmiştir (Şekil 4.4A). *F. acuminatum*, sırasıyla 25-55 µm uzunluk ve 4-5 µm genişliğe sahip kalın duvarlı makrokonidiler üretmiştir (Çizelge 4.4). Makrokonidiler, belirgin ayak şeklinde bazal hücre ve uzun tepeli apikal hücre ile orta derecede kavisli ve 3 ila 5 bölme şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.4B).



Şekil 4.4. *Fusarium acuminatum* [PDA üzerindeki koloni pigmentasyonu (A), macroconodia (B)].

4.1.2.5 *Fusarium equiseti*

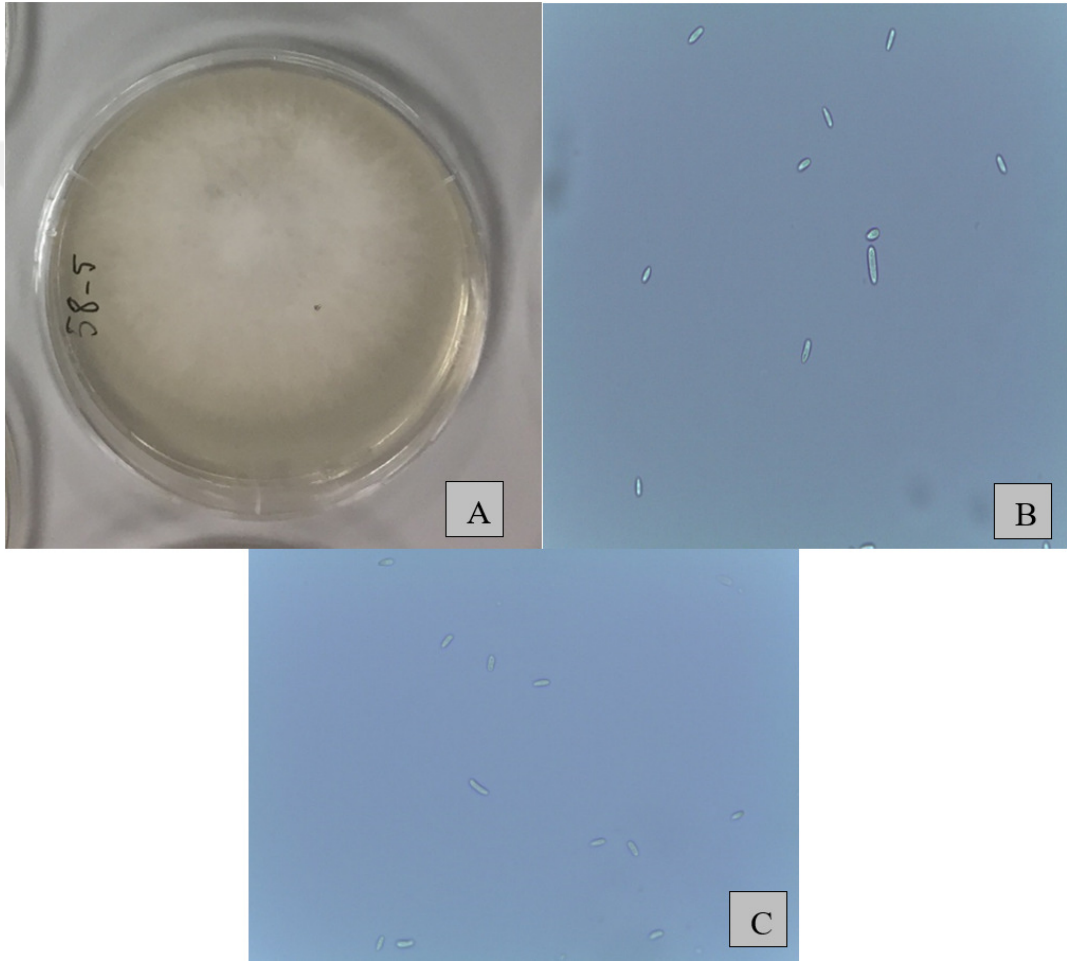
Fusarium equiseti'nin izolatları, 25 ila 45 mm arasında değişen büyüme oranları ile orta derece bir hızla büyümüştür (Çizelge 4.3). Başlangıçta beyazdan açık grimsi renge dönüşen renkte misel oluşturmuşlardır (Şekil 4.5A). İzolatların çoğu PDA üzerinde pigment oluşturmamıştır (Şekil 4.5A). *F. equiseti*, belirgin bir şekilde ayak şeklinde bir bazal hücreli ve sivri uzun apikal hücreli dorsiventral eğriliğe sahip kalın duvarlı 3 ila 5 bölme makrokonidiler üretmiştir (Şekil 4.5B). Üretilen makrokonidiler, ince (4-6 µm genişliğinde), orta ila uzun (38-57 µm uzunluğunda) şeklinde gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4).



Şekil 4.5. *Fusarium equiseti* [PDA üzerindeki koloni pigmentasyonu (A), macroconidia (B)].

4.1.2.6 *Fusarium oxysporum*

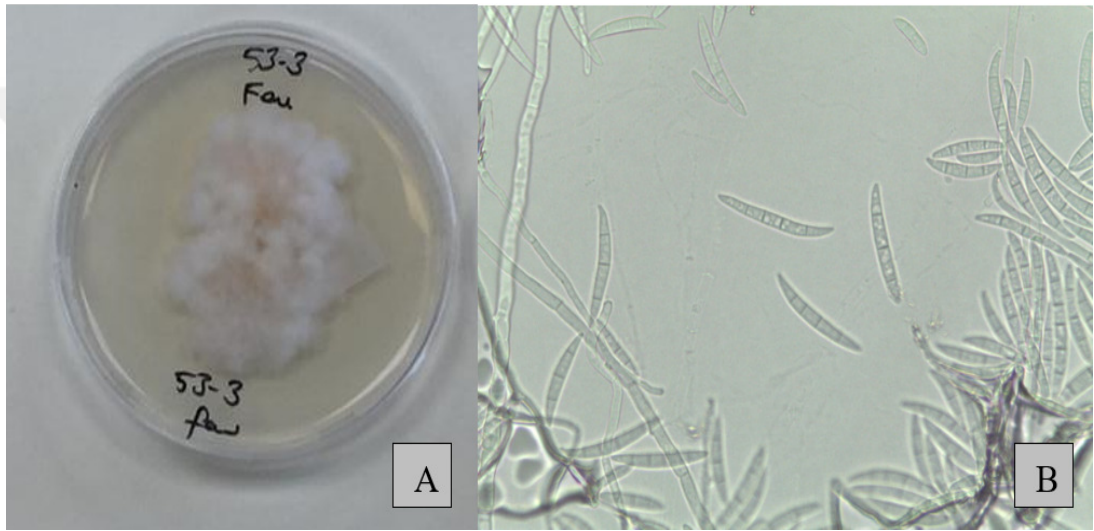
Fusarium oxysporum izolatları, PDA'da çok çeşitli koloni karakteristikleri göstermiştir. Büyüme oranları 25 ila 35 mm arasında değişmiştir ve bu büyüme oranları yavaştan orta dereceye doğru olmuştur (Çizelge 4.3). İzolatlar gelişmesiyle orantılı olmakla birlikte, seyrek beyaz miselyum üretmiştir ve hiç pigment üretmemiştir (Şekil 4.6A). *Fusarium oxysporum*, SNA'da kısa fiyalidler üzerinde 0 ila 1 bölme olan bol miktarda mikrokonidiler üretmiştir (Şekil 4.6B, 4.6C).



Şekil 4.6. *Fusarium oxysporum* [PDA üzerindeki koloni pigmentasyonu (A), microconodia (B), microconidia (C)].

4.1.2.7 *Fusarium proliferatum*

Fusarium proliferatum izolatları yavaş bir hızla gelişme göstermişlerdir (25-32 mm) (Çizelge 4.3). Başlangıçta beyaz olan ve geliştikçe hafif açık pembeye bakan bir renk veren bol miktarda miselyum üretmişlerdir (Şekil 4.7A). Sırasıyla 25-38 um ve 2-4 um uzunluğa ve genişliğe sahip ince duvarlı ince makrokonidiler üretmiştir (Çizelge 4.4). Ürettiği makrokonidiler, eğri apikal hücre ve 3-5 bölme ile nispeten düz görülmüştür (Şekil 4.7B). Mikrokonidiler ise kısa fiyalidler üzerinde bazen zincir şeklinde oluşmuştur.



Şekil 4.7. *Fusarium proliferatum* [PDA üzerindeki koloni pigmentasyonu (A), macroconodia (B)].

Çizelge 4.3. Buğday köklerinden izole edilen *Fusarium* türlerinin büyüme oranları

Türler	Büyüme oranları (mm)¹
<i>F. culmorum</i>	40-48
<i>F. graminearum</i>	40-45
<i>F. pseudograminearum</i>	25-39
<i>F. equiseti</i>	25-45
<i>F. acuminatum</i>	20-30
<i>F. oxysporum</i>	25-35
<i>F. proliferatum</i>	25-32

¹Büyüme oranları, PDA' da 25 °C' de 72 saat boyunca karanlıkta geliştirildikten sonra ölçülmüştür.

Çizelge 4.4. Buğday köklerinden izole edilen *Fusarium* türlerinin makrokonidiler boyutları

Türler	Uzunluk (µm)*	Genişlik (µm)*
<i>F. graminearum</i>	50-60	5-8
<i>F. pseudograminearum</i>	47-59	6-8
<i>F. equiseti</i>	38-57	4-6
<i>F. acuminatum</i>	25-55	4-5
<i>F. culmorum</i>	25-29	4-6
<i>F. oxysporum</i>	-	-
<i>F. proliferatum</i>	25-38	2-4

*Makrokonidiler uzunluk ve genişlik ölçüleri SNA ortamında 7-10 gün boyunca gündüz 25 °C/ gece 20 °C sıcaklıkları altında geliştirildikten sonra mikroskop ile 400x büyütmede ölçülmüştür.

Elde edilen makrokonidi boyutları, şekilleri, bölme sayıları gibi morfolojik kriterler *Fusarium* spp. izolatlarının tür teşhisinde kullanılan referans olarak kabul edilen Burgess vd., (1994), Summerell vd. (2003) ve Leslie ve Summerell (2006) de tarif edilen değerlerle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

4.1.3 Moleküler Karakterizasyon

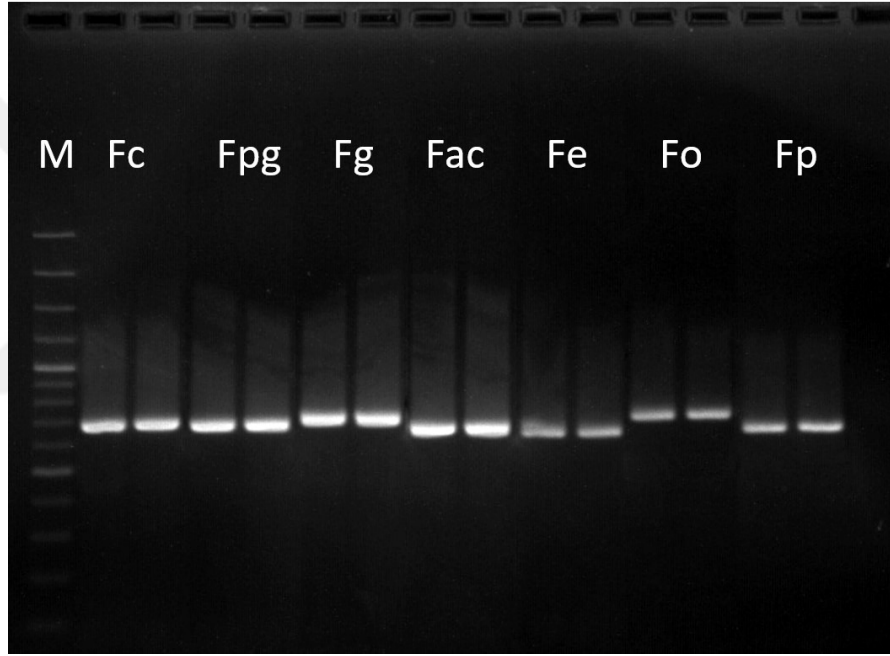
4.1.3.1 DNA İzolasyonu

Bitki örneklerinden tür tespiti yapılması amacıyla kesin sonuç veren DArT DNA izolasyon protokolü uygulanmış ve patojenlerin DNA'sı bu protokole uygun şekilde izole edilmiştir. Elde edilmiş olan DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri PCR çalışmaları için uygun olduğunu göstermiştir.

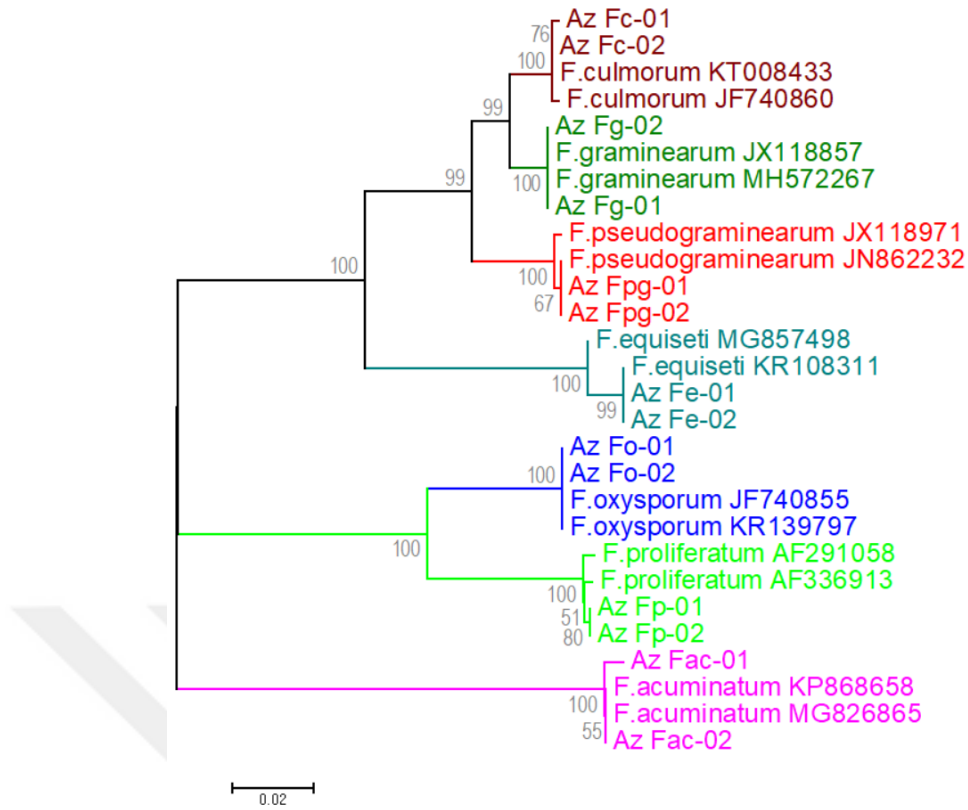
4.1.3.2 PCR Reaksiyonu ve Jel Elektrofrezisi ile Türlerin Belirlenmesi

Referans izolatların Ef-1α gen bölgeleri ef1 ve ef2 primerleri ile başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünü jel elektrofrezisinde görüntülenmiştir (Şekil 4.8) ve örneklerin çalıştığı doğrulanarak sekansa gönderilmiştir. Sekans sonuçları Mega7 programında işlenerek NCBI Blast yardımıyla tür düzeyinde teşhisler yapılmıştır. Sekans datalarının işlenmesinden sonra elde edilen sekans büyüklükleri sırasıyla *F. culmorum* için 681 bp, *F. graminearum* için 696 bp, *F. pseudograminearum* için 679 bp, *F. equiseti* için 677 bp, *F. acuminatum* için 676 bp,

F. oxysporum için 745 bp ve *F. proliferatum* için 705 bp olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya elde edilen türlere ait referans sekanslar NCBI GenBank elde edilerek eklenmiştir. Tüm sekanslar ClustalW program kullanılarak alignment analizi gerçekleştirilmiştir (Thompson vd., 1994). *Fusarium* türlerine ait izolatlar ait sekanslar ile referans izolatların sekansları Mega7 programı kullanılarak filogenetik ağacı çizilmiştir. Neighbor-joining dendrogramı Tamura ve Nei (1993) modeli kullanılarak 1000 bootstrap tekrarı ile çizilmiştir. Dendrogramda morfolojik olarak tanımlaması yapılmış olan türlere ait izolatlar referans izolatlar ile aynı gruplarda yer aldığı görülmüştür (Şekil 4.9). *Ef-1 α* gen bölgesinin *Fusarium* türlerinin teşhisinde oldukça yararlı bilgiler sağladığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.8. İzolatlar ait *Ef-1 α* gen bölgelerinin elektroforezde elde edilmiş jelin UV cihazıyla çekilmiş görüntüsü. DNA marker (M) is GeneRuler 100 bp plus (Thermo Scientific, USA) Fc *F. culmorum*, Fpg *F. pseudograminearum*, Fg *F. graminearum*, Fac *F. acuminatum*, Fe *F. equiseti*, Fo *F. oxysporum*, Fp *F. proliferatum*



Şekil 4.9. *Fusarium* spp. izolatlarına ait *Ef-1α* gen bölgesinin sekansına dayalı Neighbour joining filogenetik ağacı.

Bu konuda O'Donnell (1998) ve Gebremariam (2018)'da yaptıkları çalışmalarda izolatların moleküler tanımlamalarını, translasyon uzama faktörü- *Ef-1α* gen bölgesine dayandırarak tespit etmişlerdir.

4.1.4 Patojenisite Testi

Patojenisite testi sonucunda en agresif izolatların *F. culmorum* türüne ait olduklarını, bunu sırasıyla *F. pseudograminearum* ve *F. graminearum* izolatları izlemiştir. *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* ve *F. proliferatum* izolatları ise Seri 82 buğday çeşidinde patojen olarak bulunmamıştır. Patojenisite testi ile ilgili skor değerleri ve istatistiksel değerler çizelge 4.5' te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Patojenisite sonuçları

İzolatlar	Fungus						
	Fc	Fpg	Fg	Fac ^d	Fe ^d	Fo ^d	Fp ^d
1	3.80 ^b a ^c	3.77 a	3.33 a	1.43 a	1.30 a	1.33 a	1.40 a
2	3.63 a	3.70 a	3.13 a	1.40 a	1.23 a	1.30 a	1.40 a
3	3.57 ab	3.40 b		1.40 a	1.21 a	1.20 a	1.36 a
4	3.33 bc	3.33 b		1.37 a	1.20 a		1.33 a
5	3.27 c	3.27 b		1.17 a	1.17 a		
Kontrol	1.14 d	1.14 c	1.14 b	1.14 a	1.14 a	1.14 a	1.14 a
LSD _{0,05}	0.25	0.28	0.22	0.37	0.20	0.27	0.35
Mean	3.52	3.49	3.23	1.35	1.22	1.28	1.38

^a Fc *F. culmorum*, Fpg *F. pseudograminearum*, Fg *F. graminearum*, Fac *F. acuminatum*, Fe *F. equiseti*, Fo *F. oxysporum*, Fp-*F. proliferatum*

^b 1-5 skalasına dayalı patojenisite testinde elde edilen hastalık şiddeti

^c Herbir sütun içindeki aynı harf istatistiki olarak önemli bir fark olmayan grupları temsil etmektedir (P = 0.05 Fisher's least significant difference test).

^d Kontrole göre istatistiki bir fark bulunamamıştır.

Benzer şekilde Dyer vd. (2009) 2005 ve 2006 yıllarında Montana'dan elde ettiği *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* ve *F. graminearum* türlerine ait izolatlar içerisinde en agresif izolatların *F. culmorum* türüne ait olduğunu bulmuştur.

Çalışmalarımıza benzer şekilde Hekimhan (2010) ise Trakya Bölgesi buğday ekim alanlarında yürüttüğü çalışmada ve kök ve kök boğazı hastalığına sebep olan patojenler olarak *Fusarium sp.*, *Pseudocercospora sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Cochliobolus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Cephalosporium sp.*, *Gaeumannomyces sp.*, *Pythium sp.*, ve *Alternaria sp.* olarak tespit etmiştir. En yaygın olan patojenin ise *F. culmorum* olduğunu bildirmiştir.

Dolar vd. (2019), Kırşehir ve Kırıkkale illerindeki buğday ve arpa tarlalarında bulunan kök ve kök boğazı hastalıklarının tespit edilmesi için benzer olarak 2011 yılında sörvey çalışması yapmış ve hastalıklı bitki örnekleri toplamıştır. İzolasyon çalışmaları sonucunda *Fusarium oxysporum*, *F. Chlamydosporum*, *F. acuminatum*, *F. redolens*, *F. incarnatum*, *F. equiseti*, *F. tricinctum*, *Microdochium nivale*, *R. solani* AG4, *R. Solani* AG3, binükleat AGI, *Waitea circinata* var. *circinata*, *Alternaria alternata*, *Bipolaris sorokiniana*, *Embellisia spp.*, *Curvularia inaequalis*, *Ophiosphaerella herpotricha* ve *Phaeosphaeria pontiformis* etmenlerini tespit ettiğini bildirmiştir.

Bulduğumuz sonuçlara yakın olarak Özer ve Soran (1991), bu kapsamda yaptıkları çalışmada; Türkiye'de buğday, arpa, çavdar ve yulafta *Fusarium*

oxysporum, *F. equiseti* ve *F. culmorum* etmenlerinin kök ve kök boğazı hastalığına sebep olduğunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir.



5. SONUÇ ve ÖNERİ

Yürütülen çalışma sonucunda funguslarda tür düzeyinde yapılan tespitler için geliştirilen kültürün meydana getirdiği rengin, makrokonidi varlığı ve yapısının önemli bir kriter olduğu ortaya konmuştur.

Türlerin doğrulamak için daha öncede kullanılmış olan Translation Elongation Factor 1- α (*Ef-1 α*) gen bölgesinin tür teşhisinde kesin sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Elde edilen filogenetik ağacın izolatları tür düzeyinde ayırdığı görülmektedir.

Azerbaycan buğday ve arpa ekiliş alanlarında bulunan kök ve kök boğazı hastalığına neden olan *Fusarium* türlerinin bulunma oranları; *F. culmorum* %40, *F. acuminatum* %34, *F. pseudograminearum* %8,5, *F. equiseti* %7, *F. proliferatum* %4,5, *F. oxysporum* %3,5 ve *F. graminearum* %3 olarak tespit edilmiştir. Bu oranlara bakılarak daha önce de yapılmış olan kök ve kök boğazı hastalığına sebep olan *Fusarium* türlerinin benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmanın sonuçları Azerbaycan topraklarında gerçekleştirilecek olan daha kapsamlı çalışmalarla doğrulanmalı ve diğer toprak kökenli patojenlerde dikkate alınarak karşılaşılabilecek bu hastalıklara karşı entegre bir mücadele stratejisinin belirlenmesi önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Akgül DS (2008) “Çukurova Bölgesi Buğday Ekim Alanlarında Kök, Kök boğazı ve Sap Çürüklüğü Hastalığının Durumu, Bazı Buğday Çeşitlerinin Hastalığa Karşı Reaksiyonları, Farklı Gübreleme Pratikleri ve Fungusit Uygulamalarının Hastalık Gelişimine Etkileri”, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, 94 s, Adana.
- Aktaş H (2001) “Önemli Hububat Hastalıkları ve Sürvey Yöntemleri”, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Yayını, 74 s., Ankara.
- Aktaş H, Bostancıoğlu H, Tunalı B ve Bayram E (1996) “Sakarya Yöresinde Buğday Kök ve Kökboğazı Çürüklüğüne Neden Olan Hastalık Etmenlerinin Belirlenmesi ve Bu Etmenlerin Buğday Yetiştirme Teknikleri İle İlişkileri Üzerine Araştırmalar”. Bitki Koruma Bülteni, 36 (3–4), 151–167, ISSN 0406–3597.
- Aktaş H, Kınacı E, Yıldırım AF, Sayın L ve Kural A (1997) “Konya Yöresinde Hububatta Sorun Olan Kök ve Kök boğazı Çürüklüğü Etmenlerinin Saptanması ve Çözüm Yollarının Araştırılması”, TOGTAG-1254 No’lu Proje, Ankara, 54 s.
- Aktaş H, Kınacı E, Yıldırım AF, Sayın L ve Kural A (1999) “Konya Yöresinde Hububatta Sorun Olan Kök ve Kök boğazı Çürüklüğü Etmenlerinin Hububatta Verim Komponentlerine Etkileri ve Mücadelesi Üzerine Araştırmalar”. Hububat Sempozyumu, 8–11 Haziran 1999, 392–403, Konya.
- Aktaş H, Yıldırım AF ve Sayın L (1995) “Konya İli Arpa Ekiliş Alanlarında Arpa Verimini ve Kalitesini Etkileyen Kök ve Kökboğazı Çürüklüğü Hastalık Etmenlerinin Saptanması Üzerinde Araştırmalar”. Arpa Malt Sempozyumu, Konya, 243–259 s.
- Arıcı ŞE ve Koç NK (2004) “Çukurova Bölgesi Buğday Ekim Alanlarında *Fusarium* Türlerinin Saptanması”. Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 8–10 Eylül 2004, Samsun, 184 s.
- Arslan Ü (1999) “Bursa İli Buğday Alanlarındaki Kök ve Kökboğazı Fungal Hastalıkları Üzerinde Araştırmalar”, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 112 s.
- Bentley AR, Tunalı B, Nicol J, Burgess LW ve Summerell BA (2004) “A Preliminary Survey of *Fusarium* Species Associated with Wheat Stem Bases in Northern Turkey”, Proceedings of the Third Australasian Soilborne Disease Symposium, South Australia, February 2004. Ophel-Keller et al. (eds.) 180– 181 p.

- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP ve Backhouse D (1994) “Laboratory Manual for *Fusarium* Research (Third Ed.)”, *Fusarium* Research Laboratory, Department of Crop Sciences, University of Sydney. Sydney, 133 s.
- Burgess LW, Backhouse D, Summerell BA ve Swan LJ (2001) “Crown Rot of Wheat. Chapter 20 in *Fusarium* Paul E Nelson Memorial Symposium”, The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota United States of America ISBN 0-89054-268-6, 271-295 pp.
- Cook RJ (1968) “*Fusarium* Root and Foot Rot of Cereals in the Pacific Northwest. Phytopathology” Vo.58, No.2, 127–131 pp.
- Demirci F (2003) “Bazı Buğday Çeşitlerinin Önemli Kök ve Kök Boğazı Hastalık Etmenleri (*Fusarium* spp., *Bipolaris sorokiniana*)'ne Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi”, Tarım Bilimleri Dergisi, 9 (4): 460–466,
- Diehl JA, Tinline RD, Kochhann RA, Shipton PJ ve Rovira AD (1982) “The Effect of Fallow Periods on Common Root Rot of Wheat in Rio Grande do Sul, Brazil”. *Phytopathology*, 72: 1297–1301.
- Dolar SF, YEĞİN N, ÜNAL F (2019) “Kırşehir ve Kırıkkale İllerinde Buğday ve Arpa Ekim Alanlarında Görülen Kök ve Kök Boğazı Hastalıklarının Belirlenmesi”. *Bitki Koruma Bülteni*, 59 (1): 71-84. DOI: 10.16955/bitkorb.424930.
- Dyer AT, Johnston RH, Hogg AC ve Johnston JA (2009) ”Comparison of Pathogenicity of the *Fusarium* Crown Rot (FCR) Complex (*F. culmorum*, *F. pseudograminearum* and *F. graminearum*) on Hard Red Spring and Durum Wheat”. *European Journal of Plant Pathology*, 125(3), 387-395.
- FAOSTAT (2019) FAOSTAT Crops Data, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim tarihi:11.08.2019
- Finci S (1979) “Buğdayın Kök ve Kökboğazı Hastalıkları ve Korunma Çareleri”, ZKM, Çiftçi Broşürü No: 21, 15 s.
- Gargouri-Kammoun L, Gargouri S, Rezgui S, Trifi M, Bahri N ve Hajlaoui MR (2009) “Pathogenicity and Aggressiveness of *Fusarium* And *Microdochium* on Wheat Seedlings Under Controlled Conditions”, *Tunisian Journal of Plant Protection* 4: 135–144.
- Gebremariam ES, Sharma-Poudyal D, Paulitz TC, Erginbas-Orakci G, Karakaya A, ve Dababat AA (2018) “Identity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey” *European Journal of Plant Pathology*, 150: 387-399.
- Göbelez M (1952) “Tohumla Geçen Hastalıklar ve Bunlara Karşı Mücadele Şekilleri”, *Bitki Koruma Bülteni* 1(3): 57-64.

- Hekimhan H, Bağcı SA, Nicol J ve Tunalı B (2005) “Kök ve Kökboğazı Çürüklüğü Hastalık Etmenlerinin Bazı Kışlık Hububat Verimleri Üzerine Etkileri”, Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, 5–9 Eylül 2005, Antalya, Araştırma Sunusu, Cilt I, 201–206 s.
- Hill J, Fernandez JA ve Mcshane MS (1983) “Fungi Associated with Common Root Rot of Winter Wheat in Colorado and Wyoming”, *Plant Disease*, 67: 795-797.
- Huber DM ve Mccay-Buis TS (1993) “A Multiple Component Analysis of The Take-All Diseases of Cereals”, *Plant Dis.*, 77(5): 437-447.
- Kurowski TP (2002) “Studies on Root and Foot-Rot Diseases of Cereals Grown in Long-Term Monoculture”, *Rozprawy-i-Monografie-Dissertations and Monographs*, No:56 Poland, 86 p.
- Leslie FJ ve Summerell AA (2006) “The *Fusarium* Laboratory Manual”, Blackwell Publishing Professional, 388p, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA.
- Mathre DE (1992) “Compendium of Barley Diseases” *American Phytopathology*, St. Paul, Minnesota, USA. 78 p.
- Mishra CBP (1973) “Untersuchungen über *Fusarium*-Arten an weizen-karyopen und Nachweis ihrer Pathogenitet Fusskrankheitserreger”, *Arch Phytopath. PflSchutz.*, 9(2): 123-132.
- Mitter V, Zhang MC, Liu CJ, Ghosg R, Ghosh M ve Chakraborty S (2006) “A High-Throughput Greenhouse Bioassay to Detect Crown Rot Resistance In Wheat Germplasm”. *Plant Pathology*, 55: 433-441.
- Murat Çavuşoğlu N ve Hancıoğlu Ö (1995) “Ankara İli Buğday Ekim Alanlarında Kök ve Kökboğazı Hastalıklarına Neden Olan *Fusarium* Türlerinin Tespiti Üzerine Araştırmalar”, VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi (Bildiriler), 26-29 Eylül 1995, Adana, 174-177 s.
- Nicol JM, Rivoal R, Trethowan RM, van Ginkel M, Mergoum M ve Singh RP (2001) “CIMMYT’s Approach to Identify And Use Resistance to Nematodes and Soilborne Fungi, in Developing Superior Wheat Germplasm”, pp. 381-389. In: “Wheat in a Global Environment. Bedo Z and Lang L (eds)”, *Proceedings of the 6th International Wheat Conference*, 5-9th June 2000, Budapest, Hungary.
- O’Donnell K, Cigelnik E ve Nirenberg HI (1998) “Molecular Systematics and Phylogeography of The *Gibberella Fujikuroi* Species Complex”, *Mycologia*, 90: 465-493.
- Orakçı GE (2009) “Buğdaylarda Kökboğazı Çürüklüğü’nün Patojenisitesi ve Bunun Genetik Dayanıklılık Yoluyla Kontrolü”, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 95 s, Eskişehir.

- Özer N ve Soran H. (1991) “*Fusarium* species of Turkey”, H. Ü. Eğitim Fak. Dergisi sayı 6, 259 – 271 s.
- Pettitt TR, Xu X ve Parry D (2003) “Association of *Fusarium* Species in the Wheat Stem Rot Complex”, European Journal of Plant Pathology, Kluwer Academic Publishers. 109: 769-774.
- Pettitt TR ve Parry DW (1996) “Effects of Climate Change on *Fusarium* Foot Rot of Winter ;Wheat in The Uited Kingdom”, University Press Cambridge 20-31 pp.
- Rossi V, Cervi C, Chiusa G ve Languasco L (1995) “Fungi Associated With Foot Rots on Winter Wheat in Northwest Italy”, Review of Plant Pathology, 74 (9): 5577.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JS ve Filtenborg O (2002) “Introduction To Food- And Airborne Fungi, Sixth Edition”, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands, 389 p.
- Sencar Ö, Gökmen S, Yıldırım A ve Kandemir N (1994) “Tarla Bitkileri Üretimi” Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, 302 s, Tokat.
- Smiley RW ve Patterson LM (1996) “Pathogenic Fungi associated with *Fusarium* Foot Rot of Winter Wheat in the Semiarid Pacific Northwest”, Plant Disease, 80: 944– 949.
- Soran H ve Damgaci E (1980) “Ankara İli Buğday Ekim Alanlarında Kök Ve Kökboğazı Hastalığına Neden Olan Fungal Etmenlerin Saptanması Üzerinde Araştırmalar” TUBİTAK VII. Bilim Kongresi, TOAG Grubu. Bildiri kitabı, 119-128 s.
- Stubbs RW, Prescott JM, Saari EE ve Dubin HJ (1992) “Tahıl Hastalıkları Metodları Kılavuzu”, 120 s.
- Sturz AV and Bernier CC (1989) “Influence of Crop Rotations on Winter Wheat Growth and Yield in Relation to the Dynamics of Pathogenic Crown and Root Rot Fungal Complexes”, Canadian Journal of Plant Pathology, Vol.11:2, 114-121 pp.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994). “CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice.”, Nucleic acids research, 22, 4673-4680.
- Tamura K. and Nei M (1993) “Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees.” Molecular Biology and Evolution, 10, 512-526.

- Tunalı B, Nicol JM., Hodson, D, Uçkun Z., Büyük O, Erdurmuş D, Hekimhan H, Aktaş H, Akbudak MA and Bağcı SA (2008) “Root and Crown Rot Fungi Associated with Spring, Facultative and Winter Wheat in Turkey.” *Plant Disease*, 92, 1299-1306.
- Uçkun Z (2001) “İzmir, Aydın ve Denizli illeri buğday alanlarında kök ve kökboğazı hastalıklarının yoğunluğu ve neden olan etmenler üzerinde araştırmalar”, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi FBE, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 63 s, İzmir.
- Uyanık E (2009) “Adana Yöresi Buğday Ekilişlerinde Kök Hastalıkları Nedenlerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi FBE, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 60 s, Adana.
- Wiese MV (1987) “Compendium of Wheat Disease. 2nd ed”, American Phytopathological Society, St. Paul MN. 53-55 pp.
- Wildermuth GB and McNamara RB (1994) “Testing wheat seedlings for resistance to crown rot caused by *Fusarium graminearum* Group 1”, *Plant Disease*, 78: 949- 953.
- Windels CE and Hohen C (1989) “Association of *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum* Group 2, and *F. culmorum* on Spring Wheat Differing in Severity of Common Root Rot”, *Plant Disease*, 73: 953–956.
- Yıldırım AF, Kınacı E, Çeri S ve Hekimhan H (1998) “Konya, Karaman, Niğde Ve Aksaray İllerinde Tahıllarda Önemli Hastalıkların Durumu Ve Bunlara Dayanıklılık Kaynaklarının Araştırılması”, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Bahri Dağdaş Milletlerarası Kışlık Hububat Araştırma Merkezi Müdürlüğü TAGEM/IY/96/01/04/022 nolu proje sonuç raporu, Konya, 37 s.
- Yıldırım AF, Araz A, Turgay BE, Ünal F ve Büyük O (2016) “Serin İklim Tahıllarında Kök ve Kökboğazı Hastalıklarının Dünü, Bugünü ve Mücadelesi”, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, Bitki Hastalıkları Bölümü, Hububat Hastalıkları Birimi, 978-605-9175-47-0 Yenimahalle-ANKARA, 8 s.
- Yılmazdemir FY (1976) “Edirne, Tekirdağ, Kırklareli İllerinde Buğday Kök Hastalıklarının Fungal Etmenleri ve Bu Hastalıkların Dağılımına Toprak pH ve Neminin Etkisi Üzerinde Araştırmalar” Uzmanlık Tezi, İstanbul, 107 s.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Damla ŞEN ONSEKİZ

Doğum Yeri ve Tarihi : Bolu 26/10/1988

Lisans Üniversitesi : Akdeniz Üniversitesi

Elektronik posta : ndamlasen@hotmail.com

İletişim Adresi : Bolu, Türkiye

Yayın Listesi :

Özer G, Bayraktar H, Baloch FS, Şen D ve Tekin F (2016) "Inter primer binding sites (iPBS), a novel source of genetic diversity in fungus." 2nd International Conference on Engineering and Natural Sciences (Sözlü Bildiri)

Bayraktar H, Özer G, Palacıoğlu G ve Şen D (2016) "Detection of Resistance Sources to Anthracnose in Some Bean Cultivars and Genotypes in Turkey." 2nd International Conference on Engineering and Natural Sciences (Sözlü Bildiri)

Palacıoğlu G, Özer G, Şen D, Aydoğan A ve Bayraktar H (2016) "Determination of the Reaction of Some Promising Chickpea Genotypes to *Ascochyta rabiei*." Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi (Sözlü Bildiri)

Özer G, Palacıoğlu G, Şen D, Çamlıca M, Yeken MZ, Baloch FS, Çiftçi V, Çancı H, Kantar F ve Bayraktar H (2016) "Investigation of Anthracnose Disease Resistance in Some Turkish Dry Bean Genotypes with Molecular Markers." International Congress on Applied Biological Sciences'2016 (Sözlü Bildiri)