

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BUĞDAY YAPRAK LEKE HASTALIĞI [*Zymoseptoria tritici* (Desm.  
Quaedvlieg & Crous)] PATOJENİNİN FARKLI İZOLATLARININ  
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Nevzat KILINÇ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2018**



Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ danışmanlığında, Nevzat KILINÇ'ın hazırladığı “**Buğday Yaprak Leke Hastalığı** [*Zymoseptoria tritici* (Desm. Quaedvlieg & Crous)] **Patojeninin Farklı İzolatlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**” konulu bu çalışma 04/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ

Üye : Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR

Üye : Prof. Dr. Sibel DERVİŞ

**Bu Tezin Bitki Koruma Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım .**

**Prof. Dr. Halil Murat ALĞIN**

**Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.**

**Proje No: 17030**

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

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	v
SİMGELER DİZİNİ .....	vi
1-GİRİŞ .....	1
2-ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	9
3.MATERYAL ve YÖNTEM .....	15
3.1. Materyal .....	15
3.2. Yöntem .....	15
3.2.1. Fungusların Çoğaltılması .....	15
3.2.2. Fungusların Gelişimi ve Canlılık Testi .....	17
3.2.3. Spor Sayısı ve Spor Yoğunluğu .....	18
3.2.4. Patojenin Renk Değişiminin Belirlenmesi .....	18
3.2.5. Fungal Etmenin Protein İçeriğinin Belirlenmesi .....	18
3.2.6. Proteaz Aktivitesi .....	21
3.2.7. Proline Ölçümü .....	21
3.2.8. Malonadialdehit (MDA) Analizi .....	22
3.2.9. Melanin Analizi .....	22
3.2.10. Verilerin Değerlendirilmesi ve Analizlerin Yapılması .....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....	24
4.1. Fungusların Gelişimi ve Canlılık Testi .....	24
4.2. Spor Sayısı ve Spor Yoğunluğu .....	28
4.3. Patojenin Renk Değişiminin Belirlenmesi .....	34
4.4.Fungal Etmenin Protein İçeriğinin Belirlenmesi .....	38
4.5. Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	39
4.6. Proline Değerlerinin Ölçümü .....	40
4.7. Malonadialdehit (MDA) Değerlerinin Ölçümü .....	42
4.8. Fungal Etmenin Melanin Değerleri .....	43
4.9. Patojene Ait Fiziksel Ve Biyokimyasal Parametrelerin Korelasyonu .....	45
4.10. Probit analizi ve Fenogram Grafiği .....	46
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....	48
5.1. Sonuçlar .....	48
5.2 Öneriler .....	51
KAYNAKLAR .....	52
ÖZ GEÇMİŞ .....	58

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BUĞDAY LEKE HASTALIĞI [*Zymoseptoria tritici* (Desm. Quaedvlieg & Crous)] PATOJENİNİN FARKLI İZOLATLARININ BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Nevzat KILINÇ

Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ  
Yıl: 2018, Sayfa: 68

Bu araştırma, 2016-2017 yılları arasında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Patojenin sıcaklık stresi altındaki fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Gelecekte sıcaklığa karşı geliştirilecek dayanıklı buğdaylar için patojenin virülenslik durumu ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada materyal olarak buğday septoria yaprak leke hastalığı [*Zymoseptoria tritici* (Desm. Quaedvlieg & Crous)] fungusuna ait 4 izolat ve farklı sıcaklık değerleri (4-, 15-, 25-, 30-, 35°C) kullanılmıştır. Denemeler PDA ortamları kullanılarak 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Kontrol grubu olarak 25°C deki sıcaklık değeri kabul edilmiştir. Fungusa ait fiziksel parametre olarak, birim alandaki spor yoğunluğu, miselyal gelişim, renk değişimi ve birim hacimdeki spor sayısı incelenmiştir. Biyokimyasal parametre olarak protein, prolin, proteaz, melanin ve malonadialdehit (MDA) ölçülmüştür. Farklı sıcaklık değerlerine maruz bırakılan fungus izolatları sıcaklık değişimlerinden etkilenmiştir. Sıcaklık optimum değerlerden uzaklaştıkça patojenin birim alandaki spor yoğunluğu, ortalama büyüme çapı ve birim hacimdeki spor sayısında azalma olmuştur ( $P \leq 0.05$ ). Yüksek sıcaklıkta (30-, 35°C) patojene ait protein miktarı azalmış, prolin, proteaz, melanin ve malonadialdehit (MDA) değerlerinde ise artış olmuştur ( $P \leq 0.05$ ). Buna bağlı olarak fungusu izolatları arasında gelişme farklılıkları olduğu saptanmıştır. Patojenin CU100StA4 nolu izolatu birim alandaki spor yoğunluğu, ortalama büyüme çapı, birim hacimdeki spor sayısı ve ürettiği proteaz miktarı diğer izolatlardan yüksek çıkmıştır. Patojenin CU107StH110 nolu izolatu prolin, melanin ve malonadialdehit değerleri, diğer izolatlardan daha yüksek çıkmıştır. Bu çalışma ile fungusun proteaz enzim üretimi ile misel uzunluğu, protein ve prolin değerleri arasında pozitif bir ilişki olduğu değerlendirilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Zymoseptoria tritici*, sıcaklık, proteaz, melanin, malonadialdehit (MDA)

## ABSTRACT

MSc Thesis

### DETERMINATION OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF DIFFERENT ISOLATES OF WHEAT BLOTCH DISEASE [*Zymoseptoria tritici* (Desm. Quaedvlieg & Crous)]

Nevzat KILINÇ

Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat DİKİLİTAŞ  
Year:2018, Page:68

This research was conducted in Laboratory of Faculty of Agriculture in Harran University between 2016-2017. The physiological and biochemical characteristics of the pathogen under heat stress were investigated. The virulence of the pathogen was revealed for durable wheat generation at global warming conditions. In this work, 4 isolates which belong to *Zymoseptoria tritici* and different temperature values (4-, 15-, 25-, 30-, 35°C) were used as materials and methods. Trails were established with 4 replicates at PDA culture conditions. Spore density in a unit area, mycelial development, color change and spore number in a unit volume were observed as physical parameters. Protein, proline, protease, melanin and malondialdehyde (MDA) were measured as biochemical parameters. The fungal isolates, exposed to different temperature regimes, were affected by temperature changes. When the temperature value were away from the optimal degree, e.g. a significant reduction in the spore density in a unit area, the average mycelial growth and the spore number in a unit volume of the pathogen ( $P \leq 0.05$ ) were evident. At high temperature, the amount of protein of the pathogen was decreased and the amount of proline, protease, melanin and MDA of the pathogen had increased ( $P \leq 0.05$ ). Therefore, differences in the development were evident between the fungal isolates. The spore density in a unit area, the average mycelial diameter, the spore number in a unit volume, and the protease activity of the CU100StA4 isolate of the pathogen was higher than those of values in other isolates. The proline, melanin and MDA values of the CU107StH110 isolate of the pathogen was higher than those of other isolates. The positive relation between the enzyme activity and protein, proline and mycelial growth were established.

**KEY WORDS:** *Zymoseptoria tritici*, temperature, protease, melanin, malondialdehyde (MDA)

## TEŐEKKÖR

Tezimin her aşamasında değerli zamanımı ayırıp ilgisini esirgemeyen danışman hocam saygı değer Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ'a; bu çalışmanın kayda geçmesinde pay sahibi olan Prof. Dr. Mukkades KAYIM'a; Prof. Dr. Rıdvan SIVACI'ya; Yük. Zir Müh. Gülsüm ÜNAL'a; Yük. Zir. Müh. Ela KÖSE TOHUMCU'ya ve her zaman maddi, manevi yanımda olup destek olan aileme teŐekkörü borç bilirim.

Ayrıca tezimin maddi olarak destekleyen HÜBAK'a teşekkür ederim.



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1.1. <i>Z. tritici</i> 'nin buğday yaprağında ve başaktaki görünümü.....	5
Şekil 1.2. <i>Z. tritici</i> yaşam döngüsü ve biyolojisi .....	6
Şekil 3.1. Biyokimyasal parametrelerin araştırılması öncesi yapılan hazırlıklar.....	20
Şekil 4.1. <i>Z. tritici</i> fungusunun miselyal gelişimi, .....	25
Şekil 4.2. <i>Z. tritici</i> izolatlarının ortalama koloni büyüme çapları.....	27
Şekil 4.3. <i>Z. tritici</i> izolatlarının spor sayıları (10-, 20 ve 30. gün) .....	30
Şekil 4.4. Fungus izolatlarının birim alandaki spor yoğunluğu.....	33
Şekil 4.5. Patojenin farklı gün ve sıcaklıklardaki genel renk görünümü .....	35
Şekil 4.6. RGB kodları ve renk paleti üzerindeki karşılığı olan renkler.....	36
Şekil 4.7. İzolatlara ait fenogram grafiği.....	47



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

Çizelge 1.1. <i>Septoria</i> 'ya ait türler vekonukçuları.....	6
Çizelge 3.1. Patates dekstroz agar (PDA).....	19
Çizelge 3.2. Czapekdox ortamı (Değiştirilmiş).....	20
Çizelge 4.1. Patojen izolatlerinin RGB değerleri.....	31
Çizelge 4.2. Farklı sıcaklıklara maruz kalan patojenini protein değerleri.....	41
Çizelge 4.3. Farklı sıcaklıklara maruz kalan patojenini proteaz değerleri.....	44
Çizelge 4.4. Farklı sıcaklıklara maruz kalan patojenini prolin değerleri.....	45
Çizelge 4.5. Farklı sıcaklıklara maruz kalan patojenin MDA değerleri.....	46
Çizelge 4.6. Patojeninin melanin değerleri.....	48
Çizelge 4.7. Patojene ait fiziksel ve biyokimyasal parametrelerin korelasyonu.....	50

## SİMGELER DİZİNİ

Spp.	Türler
sp.	Tür
°C	Santigrat Derece
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
ml	Millilitre
MYB	Malt-Maya Suyu
YMDA	Maya özü, Malt özü, Dextros, Agar
PDA	Patates Dextrose Agar
SOD	Süperoksitdismütaz
CAT	Katalaz
POX	Peroksidaz
GST	Glutation-S-Transferaz
APX	Askorbat Peroksidaz
GR	Glutasyonredüktaz
GPX	Glutasyonperoksidaz
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
MDA	Malondialdehit
EL	Elektrolit Sızıntısı
RGB	Red Blue Green
BSA	Bovin Serum Albumin
TBA	Thiobarbutik Asit
TCA	Trichloro Acetic Asid
SYL	Septoria Yaprak Lekesi
SYLH	Septoria Yaprak Leke Hastalığı

## 1. GİRİŞ

Önemli kültür bitkilerinden olan buğday, tek yıllık bir bitki olup, her türlü iklim ve toprak koşullarında yetişebilecek çok sayıda çeşitlere sahip olması nedeniyle, dünyanın hemen her tarafında yetiştirilmektedir. Dünyada en fazla üretimi yapılan ve tüketilen tarımsal ürün ve dünya üzerindeki milyarlarca insanın gıda güvenliği için en temel kaynaklardan biri konumundadır. Dünyada buğday açısından en büyük üretimi AB ülkeleri ile Çin, Hindistan, ABD, Rusya, Pakistan, Mısır ve İran gibi ülkeler gerçekleştirmektedir. Dünyadaki buğday üretimi 2015/2016 sezonu için 736 milyon ton olmuş ve 2016/2017 sezonunda 754 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (Anonim, 2017). Türkiye’de yaklaşık 2.9 milyon işletme, buğday üretimi yapmaktadır. Türkiye’nin hemen her yerinde yetiştirilen buğday, toplam tarım alanlarının % 26.5’ini oluşturmakta, 2006’da 8.49 milyon hektar olan buğday alanı, 2014’te 7.91 milyon hektar olmuştur. Türkiye’nin yıllık buğday tüketimi 2014 yılında 17.5 milyon ton iken, bu miktar 2016 yılında 18 milyon ton düzeyine ulaşmıştır (Anonim, 2017).

Buğdaylarda ürün kayıplarına neden olan fungal hastalıklar vardır. Bunlar; sürme hastalığı (*Tilletia foetida*), tahıl küllemesi (*Erysiphe graminis*), septorya yaprak lekesi (*Zymoseptoria tritici*), kahverengi pas (*Puccinia recondita*), buğday kara pası (*Puccinia graminis f. Sp. tritici*), sarı pas (*Puccinia striiformis*), buğday راستığı (*Ustilago nuda*), kök ve kökboğazı çürüklüğü (*Fusarium spp.*, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.), *Rhizoctonia spp.*, *Pseudocercospora herpotrichoides* Ggt.) şeklindedir (Allioui ve ark., 2014).

Buğdaylarda ürün kayıplarına neden olan septoria yaprak lekesi hastalığının Afrika, Avrupa, Yakın Doğu, Asya, Avustralya ve Orta Amerika’da yaygın olduğu ve zaman zaman epidemiy yaptığı bildirilmektedir. Hastalığın fazla görülmesi yağış, ağır gece çiğleri, büyüme mevsiminde uzun sis periyotlarında hastalık şiddeti artmaktadır. Bu koşullarda ağır enfeksiyonların ve ürün kayıpları meydana

gelmektedir. Yüksek nemin yanında hastalığın salgın hale geçmesinde, monokültür halinde entensif buğday üretiminin yapılması, kısa saplı ve yüksek verimli buğday varyetelerinin kullanılması etkili olmaktadır. *Z. tritici*, buğday verim oranını % 30 ila 50 azaltmakta, (Goodwin ve ark., 2011) ve bu nedenle, küresel gıda güvenliği için bir tehdit olarak görülmektedir (Sidhu ve ark., 2015).

*Zymoseptoria tritici* hastalığının Türkiye'de yaygın olduğu, Bremer ve ark. (1948), İren (1962) tarafından açıklanmıştır. Ülkemizin bütün bölgelerinde yaygın olduğunu saptayan Bora ve Karaca (1974) söz konusu hastalığın, uygun koşullarda, duyarlı çeşitlerde önemli kayıplar yapabilecek potansiyele sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yabancı kökenli buğday çeşitlerinde bu hastalığın önemli olduğu Saydam ve ark. (1974) tarafından belirlenmiştir. Son yıllarda yabancı kökenli buğday çeşitlerinin üretimi ile hastalık önemini daha da arttırmıştır.

Buğday septoria yaprak lekesi hastalığı (SYLH) kışlık buğdaylarda %40'lara varan düzeylerde ürün kayıplarına neden olur. Bu hastalık ile mücadelede birçok koruyucu fungusit önerilmesine karşın, pratikte ekonomik değildir. Bu nedenle kültürel önlemlerin yanı sıra dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesi en etkili yöntemdir (Torriani ve ark., 2009).

Markevičius (1996), *Septoria* cinsine ait 2000'den fazla türün dünya geneline yayılmış olduğunu bildirmesine rağmen, Kirk ve ark. (2001) bu sayının 1000 olduğunu bildirmiştir (Çizelge 1.1). *Septoria* ile ilgili ilk veriler 1950 yıllarında parça parça mikoloji dökümanlarında yer almıştır (Bremer, 1948). Ülkemizde ilk olarak 1953 yılında iki türü (*S. adanensis* ve *S. falcariicola*) belirlenmiştir (Punithalingam ve ark., 1965).

Çizelge 1.1. Septoria'ya ait türler ve konukçuları (Selçuk ve ark., 2009)

Fungus	Konukçu	
<i>Septoria aciculosa</i> Ellis & Everh.	<i>Fragaria</i> sp.	Çilekgiller
<i>S. adanensis</i> Petr.	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.	Kasımpatı
<i>S. alliicola</i> Bäumler	<i>Ilium scorodoprasum</i> L. subsp. <i>rotundum</i> (L.) Stearn.	Yılan sarmısağı
<i>S. alhaginis</i> Szemb.	<i>Alhagi camelorum</i> Fisch.	Devedikeni
<i>S. ampelina</i> Berk. & M.A. Curtis	<i>Vitis vinifera</i> L.	Asma
<i>S. anchusae</i> Syd.	<i>Anchusa arvensis</i> (L.) Bieb., <i>A. azurea</i> Miller	Tarla Sığırdili
<i>S. anemones</i> Desm.	<i>Anemone narcissiflora</i> L.	Düğün çiçeği
<i>S. apiicola</i> Speg.	<i>Apium graveolens</i> L.	Kereviz
<i>S. berberidis</i> Niessl	<i>Berberis crataegina</i> DC., <i>B. vulgaris</i> L.	Karamuk
<i>S. bromi</i> Sacc.	<i>Bromus racemosus</i> L.	Salkım Kılcan
<i>S. cannabis</i> (Lasch) Sacc.	<i>Cannabis sativa</i> L.	Kenevir
<i>S. carthami</i> Murashk.	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	Aspir
<i>S. castaneicola</i> Desm.	<i>Castanea sativa</i> Miller	Kestane
<i>S. catariae</i> Bubák	<i>Nepeta cataria</i> L.	Kedinanesi
<i>S. cercidis</i> Fr.	<i>Cercis siliquastrum</i> L.	Erguvan
<i>S. chelidonii</i> Desm.	<i>Chelidonium majus</i> L.	Kırlangıçotu
<i>S. cirsii</i> Niessl	<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	Köygöçüren
<i>S. clematidis</i> Roberge ex Desm.	<i>Clematis cirrhosa</i> L.	Bahar sarmaşığı
<i>S. clematidis-flammulae</i> Roum.	<i>Clematis flammula</i> L.	Hamilmiskin
<i>S. convolvuli</i> Desm.	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Tarla sarmaşığı
<i>S. cornicola</i> var. <i>cornicola</i> Desm.	<i>Cornus sanguinea</i> L.	Kiren
<i>S. cucurbitacearum</i> Sacc.	<i>Cucurbita</i> sp.	Kabakgiller
<i>S. cyclaminis</i> Durieu & Mont.	<i>Cyclamen hederifolium</i> Aiton	Kandilkökü
<i>S. dianthi</i> Desm.	<i>Dianthus</i> sp.	Karanfilgiller
<i>S. didyma</i> Fuckel	<i>Salix alba</i> L.	Aksöğüt
<i>S. dimera</i> Sacc.	<i>Silene dichotoma</i> Ehrh.	Çatalakıl
<i>S. dulcamarae</i> Desm.	<i>Solanum dulcamara</i> L.	Sofur
<i>S. ebuli</i> Roberge ex Desm.	<i>Sambucus ebulus</i> L.	Mürver otu
<i>S. elaeagni</i> (Chevall.) Desm.	<i>Elaeagnus angustifolia</i> L.	İğde
<i>S. euphorbiae</i> Kalchbr.	<i>Euphorbia macroclada</i> Boiss.	Neblül
<i>S. gladioli</i> Pass.	<i>Gladiolus</i> sp.	Kılıçotu
<i>S. guepini</i> Moesz	<i>Euphorbia</i> sp.	Sütleğen
<i>S. hederæ</i> Desm.	<i>Hedera helix</i> L.	Duvar sarmaşığı
<i>S. intybi</i> Pass.	<i>Cichorium intybus</i> L.	Hindiba
<i>S. lactucae</i> Pass.	<i>Lactuca serriola</i> L.	Eşekhelvası
<i>S. lamii</i> Pass.	<i>Lamium amplexicaule</i> L.	Baltutan
<i>S. linariae</i> H. C. Greene	<i>Linaria</i> sp.	Nevruzotu

Buğdayda septoria yaprak leke hastalığının (*Z. tritici*) taksonomik sınıflandırması aşağıdaki gibidir.

Alem: *Eumycota*

Şube: *Ascomycota*

Sınıf: *Loculoascomycetes*

Takım: *Dothideales*

Familya: *Mycosphaerellaceae*

Cins: *Mycosphaerella*

Tür: *Zymoseptoria tritici*

Eşeyli dönemi *Zymoseptoria tritici* [(Desm.) Quaedvlieg & Crous 2011]'dir. Eşeysiz dönemi *Septoria tritici*'dir (Cunfer ve ark., 1999).

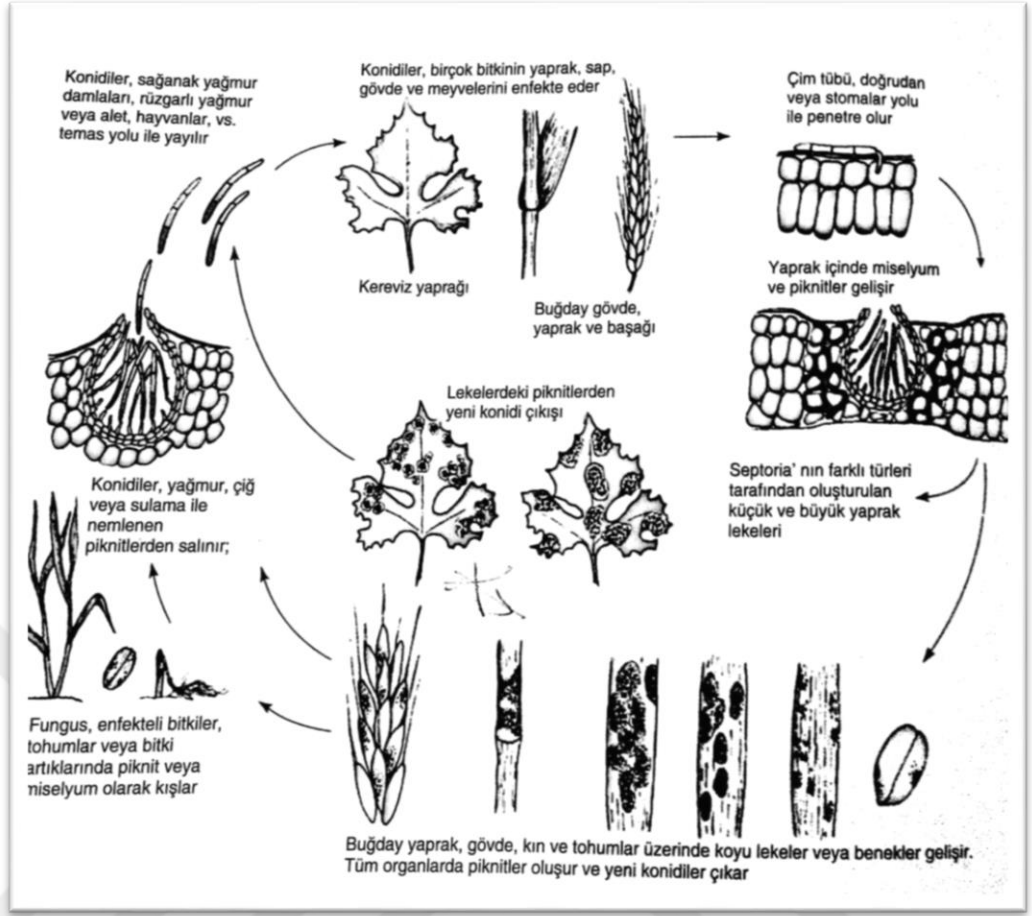
*Z. tritici*'nin buğdaydaki ilk belirtileri genellikle toprağa temas eden alt yapraklarda klorotik lekeler oluşması şeklindedir (Şekil 1.1). Bu lekeler daha sonra düzensiz lezyonlara dönüşür. Bu lezyonlar içerisinde piknitler oluşur. Nemli koşullarda piknitlerden jelatinimsi yapıda spor kitleleri çıkar ve etrafa dağılır. Piknitler genellikle kahverengi küresel ve 100-200 µm çapındadır. Uygun koşullarda hastalık üst yaprak, sap ve başaklarda da belirti göstermeye başlar (Medini ve Hamza, 2008).



Şekil 1.1. *Z. tritici*'nin buğday yaprağında ve başaktaki görünümü (Agrios, 2005)

Hastalık etmeni, aşırı gübreleme yapılan ve geniş yaprak oluşturan çeşitlerin yetiştirildiği yerlerde önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Ana konukçusu buğday olmakla beraber arpa ve çayır bitkilerinde de görülmektedir. Anız, tohum, kendigelen buğday ve buğdaygil yabancı otlar fungal etmenin inokulum kaynaklarını oluşturmaktadır (Kurt, 2016).

*Z. tritici*'nin yaşam döngüsü Şekil 1.2.'te görüldüğü gibi ilkbaharda pikniosporlar yağmur, çiş ve sulama suyu ile nemlenen piknitlerden dışarı çıkar. Pikniosporlar ya doğrudan ya da çim tütü bazende stomalardan bitkinin yaprak sap ve başaklarını enfekte etmeye başlar. Daha sonra nekrotik lekelerin oluşması ile toplu iğne başı büyüklüğünde piknitler meydana getirirler. Piknitlerden çıkan pikniosporlar tekrar etrafa dağılarak ikincil enfeksiyonları oluştururlar. Yaz sonu ve sonbaharda peritesyumlarda oluşan askosporlar hava ile etrafa dağılırlar. Kışı hastalıklı bitki artıkları, tohum veya enfekteli bitkiler üzerinde piknit veya miselyum halinde geçirirler (Agrios, 2005).



Şekil 1.2. *Z. tritici* yaşam döngüsü ve biyolojisi (Eyal ve ark., 1987)

*Z. tritici*'nin vejetatif büyüme biçimleri üç kategoriye ayrılır. Bunlar, makropiknidiosporlar, mikropiknidiosporlar ve tek hücreli yapılarıdır.

Makropiknidiosporlar, laboratuvar koşullarında yetiştirilen en yaygın hücre tipidir. Makropiknidiosporlar, 4-8 uzun hücreden oluşan çok hücreli yapılardır. Bu çok hücreli yapı içindeki bireysel hücrelerde, 1.5-3.5  $\mu\text{m}$  genişliğinde ve 40-100  $\mu\text{m}$  uzunluğa kadar morfolojik varyasyon görülür. Makropiknidiosporlar, polar uç büyümesi ile ince hifleri oluşturmak için çimlenirler (Wiese, 1987). Bu morfojenik geçiş, besin yoksunluğu ve sıcaklık artışını takiben sıvı kültürde tetiklenebilmektedir (Motteram ve ark., 2011).

Mikro-piknidiosporlar 1-110  $\mu\text{m}$  genişliğinde ve 5-10  $\mu\text{m}$  uzunluğunda hücrelerden oluşmaktadır. Tek hücreli yapılar ise, hif veya makro-piknidiosporlardan lateral tomurcuklanma ile oluşur. Bu nedenle, "maya benzeri" büyüme biçimi



tanımına uyarlar. Hem makro, hem de mikro piknidiosporlar dormant halde piknidlerde oluşur. Nemli ve yağışlı havalarda etrafa dağılırlar (Mehrabi ve ark., 2006).

Birkaç büyüme formunda vejetatif olarak büyüme kabiliyeti, birçok patojenik fungusun karakteristik özelliğidir ve hifsel büyümesi konukçu dokusunun istilası için ön şart teşkil etmektedir (Guo ve ark., 2008).

*Z. tritici*, 21 kromozom taşır (Goodwin ve ark., 2011). Bu kromozomlardan en küçük yapıda olan 8 tanesi mayoz bölünme safhasında dağılmakta ya da kayıp edilmektedir. Bu duruma 'dağılabilir, gereksiz veya elzem olmayan kromozomlar' denilmektedir. Bazı vahşi ırklarında söz konusu dağılabilir kromozomlar yer almamaktadır. Diğer patojen mantarlarda, dağılabilir kromozomlar, patojenisite ile ilgili genleri taşır (Han ve ark., 2001; Hatta ve ark., 2002). *Z. tritici*'deki dağılabilir kromozomlar, tekrar eden elementlerin sayısını arttırmakta (Dhillon ve ark., 2014) ve daha hızlı bir evrimsel değişim oranı göstermektedir (Stukenbrock ve ark., 2011). Böylece, dağılabilir kromozomlar fungusit direnci ve stres gibi koşullara karşı hızlı bir adaptasyon sağlar (Torriani ve ark., 2009). Bununla birlikte *Z. tritici*'deki dağılabilir kromozomların biyolojik rolü hala tamamen açıklanamamıştır (Steinberg, 2015).

Küresel ısınmanın, tarım üzerindeki kötü etkileri her yıl biraz daha artmaktadır. Değişen sıcaklık değerleri tarım ürünleri üzerinde bir stres faktörü olarak kendini göstermekte ve oluşan yeni koşullara karşı daha dayanıklı bitkilerin geliştirilmesini kaçınılmaz kılmaktadır. Benzer şekilde bitki patojenleri de değişen sıcaklık değerlerinden etkilenmekte ve bir şekilde adaptasyon sağlayıp bitkileri hastalandırmaya devam etmektedirler. Bitkilerle aynı stres koşullarına maruz kalan bitki patojenlerinin yapılarında ne tür biyokimyasal değişimler geçirdiği önem kazanmaktadır.

Dünyada ve ülkemizde önemli bir besin kaynağı olan buğday bitkisinde hastalığa neden olan söz konusu patojenin bütün yönleriyle ele alınması ve çeşitli

stres faktörleri karşısındaki biyokimyasal tepkilerinin belirlenmesi, ileride hastalıkla mücadelede kullanılacak yöntemlerin belirlenmesinde kolaylaştırıcı bir etkisi düşünüldüğünden bu araştırma yapılmıştır.

Bu çalışmada patojen sıcaklık stresine maruz bırakılarak, fizyolojik gelişiminin yanı sıra biyokimyasal tepkileri incelenmiş, patojenin sıcaklık stresinde gösterebileceği tepkiler belirlenmiştir. Bu çalışma ile ileride sıcaklık stresine dayanıklı buğday bitkileri geliştirildiğinde, patojenin sıcaklık koşullarında sergilediği davranışlar belirlenmiş olup patojenin virülenslik durumu ortaya konmuştur. Dolayısı ile patojen ırkları ile mücadelede önemli veriler elde edilmiştir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kema ve Annone (1991), *Z. tritici*'ye ait 26 tane izolat ile patojenin farklı ortamlar üzerindeki gelişmelerini incelemişlerdir. *In vitro* koşullarda, ortamlar üzerinde maya benzeri büyüme gösteren izolatlar piknit oluşturmamasına rağmen misel büyüme gösteren izolatlarda piknit üretiminin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. İzolatları sürekli karanlık ortamda gelişmeye bıraktıklarında da benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bununla birlikte PDA ortamında gelişmeye bırakılan izolatların V-8 Agar ortamı ve Buğday Yaprağı Özütü ortamlarına göre de iyi bir misel gelişim ve piknit üretimi sağladığını bildirmişlerdir.

Cooke ve Gareth (2009), *Septoria nodorum* ve *Z. tritici* etmenleri ile ilgili Czapek Dox V8 agar ortamında, sürekli ultraviyole ışınlarına ve sürekli karanlık peryot olmak üzere iki koşuldaki sporulasyonlarını incelemişlerdir. Her iki patojenin UV altında sporulasyonunda artış olduğunu ve her iki patojenin Czapek Dox V8 agar ortamında seçkin koloniler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu da hem agar alt kültürlerinin hem de hastalıklı materyal izolatlarının kolay tanımlanmasını sağladığını bildirmişlerdir.

Chungu ve ark. (2001), iki ekmeklik (Katepwa ve Lacos-78) ve iki makarnalık (ACMelita ve Kyle) buğdayın çimlenme aşamasında, *Z. tritici*'nin inkübasyon sıcaklığı, inokulum, spor yoğunluğu ve yaprak ıslaklık süresi üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda günlük buğdaylardaki *Z. tritici* için inkübasyon sıcaklığının 15-22 santigrat derece ve inokulum konsantrasyonu olarak  $1 \times 10^7$  spor  $ml^{-1}$  yeterli olduğunu ve piknit oluşumu için 72 saat yaprak ıslaklık süresinin gerekli olduğunu önermişlerdir. Bu nem içeren sürenin uzaması fungal enzimlerin üretilmesi için kritik bir aşama olarak tespit edilmiştir. Fungal etmenler ürettikleri enzimler ile konukçular üzerinde doku bozulmalarına ve hasara yol açarlar. Bu enzimlerden en önemlisi proteazlardır.

Valueva, ve ark. (2004), *Pyrenopeziza brassicae*'nin patojenik ve patojenik olmayan izolatları üzerinde yapılan çalışmalarda hücre dışı proteaz aktivitesinin patojenisite derecesi üzerinde belirleyici olduğunu bildirmişlerdir.

Redman ve Rodriguez (2002) ekstrasellüler enzimler, fitopatogenik fungusların patojenisite ve virülensinde önemli bir rol oynadığını belirtip *Colletotrichum coccodes*'in çeşitli izolatlarının, domates üzerinde antraknoza neden olduğunu belirtmişlerdir. Etmenin proteaz aktivitesi ve virülensliği arasındaki ilişkiyi belirlemeye çalışmışlardır. Ekstrasellüler proteaz aktivitesi ile bitkilerde meyve ve ölüm hastalıklarının simptomlarının başlaması arasında doğrudan bir ilişki olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar, ekstrasellüler proteaz aktivitesinin, *Colletotrichum coccodes*'in patojenisite ve virülens için gerekli olduğunu ve proteaz aktivitesinin ortadan kaldırılmasının öldürücü bir patojeni, patojenik olmayan bir etmene dönüştürdüğünü ileri sürmüşlerdir.

Maccheroni ve ark. (2000) bitkilerde antraknoza neden olan *Colletotrichum*'un çeşitli türlerine ait izolatlarını içeren endofitik, fitopatogenik ve entomapatogenik izolatlarını farklı pH değerlerinde amilaz, selülaz, lipaz, pektinaz ve proteaz salgılanması üzerindeki değişimlerini incelemişlerdir. Endofit ve fitopatogenlerin sırasıyla asit ve alkali ortamlarda diğer enzimlere göre proteaz desende daha fazla artış gözlemlemişlerdir. Funguslarda genetik bir sistemin konukçu-patojen ilişkisinde ortamdaki pH'sı kontrol ederek ortam pH derecesine göre optimum proteaz salgılaması yapabildiğini bildirmişlerdir.

Bois ve ark. (2006), tuz stresine karşı dirençlerini belirlemek için mikorizal fungus olan *Suillus tomentosus*, *Hymenoscyphus* sp., *Phialocephala* sp., *Laccaria bicolor* ve *Hebeloma crustuliniforme*'yi kullanmışlardır. Tuz stresine karşı daha dirençli olan *Hymenoscyphus* sp. ve *Phialocephala* sp.'nin strese karşı koymak için karbonhidrat birikiminden farklı mekanizmalar kullandığını belirtmişlerdir. Yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, *Hymenoscyphus* sp. yapısında prolini depolama suretiyle tuzlara karşı direnç gösterdiğini buna karşın *Phialocephala* sp.'nin melanin oluşturarak stresle başa çıktığını bildirmişlerdir.

Dunaevskii ve ark. (2007) saprofit funguslarda olmayan ancak fitopatojenik funguslarda söz konusu olan tripsin aktivitesini dikkate alarak fitopatojenik olan *Fusarium*'un farklı türü olan *F. heterosporum* ve *F. sporotrichioides* üzerinde çalışmışlardır. Her iki türün patojenitesi ve tripsin benzeri proteaz aktivitesinde açık bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Patojenitesi yüksek olan *F. sporotrichioides* diğer etmene göre daha yüksek miktarda hücre dışı tripsin aktivitesi göstermiştir. Bu durum tripsin aktivitesinin saprofit ve patojen arasında fungusun patojenitesi açısından bir gösterge olabileceğini belirtmişlerdir. Tripsin benzeri proteazlar fitopatojenlerin patojenite süreci ile direkt ilgili olup fungusların dayanıklılık geni tarafından sentezleniyor olabileceğini bildirmişlerdir.

Hao ve ark. (2007) *Glomusetu nicatum* ile *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*'un çimlenme aşamasındaki salatalık bitkilerine inokulasyonunun bitki verimi, hastalık oranı üzerindeki etkisini araştırmak için bir çalışma yapmışlardır. Buna göre *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*'u, deney başlangıcından 28 gün sonra inoküle etmişler. Çalışma sonucunda AM (Arbuskuler Mikoriza) mantarların aşılандığı fidelerde hastalık oranını ve hastalık endeksini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Mikorizalı salatalık fidanları, prolin, polifenoloksidaz ve fosfor aktivitesinde daha yüksek konsantrasyonlara sahipken, düşük malondialdehit konsantrasyonları gösterdiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak, mikorizal mantarın, bitkinin ikincil metabolitlerini etkileyebileceğini ve salatalık fidelerindeki solgunluk hastalığına karşı direnci arttırdığını ve dolayısıyla biyolojik kontrol maddesi olarak bazı potansiyelleri olabileceğini bildirmişlerdir.

Guo ve Verreet (2008) *Z. tritici*'nin izolatları üzerine ortam, ışık ve pH'nın etkilerini *in vitro* koşullarda test etmişlerdir. Test edilen izolatların konidi üretiminde farklı yetenekler gösterdiğini, malt-maya özütü ortamından  $1.82 \times 10^9$  konidi plaka<sup>-1</sup> üretildiğini ve karanlık koşullarda ortamdaki konidi oluşumun önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Konidinin çimlenme ve çim tüpü büyümesinin, 30°C'de önemli bir şekilde azaldığını göstermişlerdir. Malt-maya suyu (MYB) içinde konidyal tomurcuklanma için uygun pH'nın 5 ile 9 arasında olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca pH 2-, 10 ve 11'de hemen hemen hiç yeni konidi

oluşmayıp, konidi sayısı, patates dekstroz et suyu, buğday yaprağı ekstraktı ve H<sub>2</sub>O'dan önemli derecede fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Hatta ve ark., (2002) fasulye (*Phaseolus vulgaris*) de dâhil olmak üzere birçok sebze bitkisinde beyaz çürüklüğe neden olan *Sclerotinia sclerotiorum* kültürlerinde proteaz aktivitesi üzerine çalışmalar yürütmüşlerdir. Yapmış oldukları çalışmada proteaz üretiminde glukoz, pektin ve hücre duvarının farklı karbon kaynaklarının etkisini araştırmışlardır. *In vivo* koşullarda bu proteazları enfekte edilmiş *P. vulgaris* bitkisi üzerinde de denemişlerdir. Bütün karbon kaynaklarında proteaz seviyesinde artış olmasıyla birlikte en çok pektin ilavesi ile kültürlerdeki proteaz aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca yapmış oldukları PCR analizleriyle Proteaz aktivitesini başlatma sürecinde genlerin kilit rol oynadığını bildirmişlerdir. Patojen tarafından enfekte edilmiş *P. vulgaris* bitkilerinde asit fosfataz-1 ve aspartil proteazın artmış olmasının bu enzimlerin patojenin konukçu istilası sürecindeki rolünü desteklediğini bildirmişlerdir.

Saidi ve ark. (2012) katı ve sıvı ortamlarda *Z. tritici*'nin oluşturduğu spor miktarını verimlilik açısından değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada inokule edilmiş kültür ortamlarını 18-, 20°C'de ve 12'şer saat karanlık/ışık ortamında 4-6 gün kaldıktan sonra araştırmışlardır. Katı ortamı YMDA (maya özü, malt özü, dextros, agar) ve sıvı ortam YMB (maya özü, malt özü, glukoz, 1 litre saf su) olarak hazırlamışlardır. Ortaya çıkan spor oranları YMDA ortamında  $1.7 \times 10^9$  spor ml<sup>-1</sup> YMB ortamında ise  $2.3 \times 10^9$  spor ml<sup>-1</sup> olarak saptamışlardır. Ayrıca PDA ve YMDA ortamların da üretilen hastalık etmeninin YMB sıvı ortamında kültüre alındığında daha fazla spor ürettiğini belirtmişlerdir. YMB ortamının ileride buğday bitkisine yapılacak inokulasyon için gerekli spor kaynağının oluşturulması bakımından katı ortamlara göre daha fazla avantaj sağlayacağını bildirmişlerdir.

Debona ve ark. (2012) buğdaylarda hastalığa neden olan *Pyricularia oryzae*'nin inokule edildiği BR18 (duyarlı) ve BRS229 (kısmen duyarlı) buğday çeşitleri üzerinde farklı enzimlerin etkinliklerini incelemişlerdir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), glutation-S-transferaz (GST), askorbat

peroksidaz (APX), glutatyonredüktaz (GR), glutatyonperoksidaz (GPX), süperoksit ( $O_2^-$ ), Hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ), malondialdehit (MDA) ve elektrolit sızıntısı (EL) için yaptıkları çalışmada SOD, POX, APX ve GST seviyesinin kontrol grubuna göre yüksek çıktığını bildirmişlerdir. BRS 229 çeşidinde ise GR ve CAT aktiviteleri yüksek çıkmıştır. BR18 çeşidinde  $H_2O_2$  ve MDA oranlarında artış gözlemlemişlerdir.

Chand ve ark. (2014) buğday ve arpada kök ve kökbağazı çürüklüğüne neden olan *Bipolaris sorokiniana*'nın hücre dışı enzimleri (selüloz, pektinaz, amilaz, proteaz) ile içerdiği melanin miktarıyla ilgili çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında *Bipolaris sorokiniana*'nın alt popülasyonlarına ait siyah, melez ve beyaz tipteki izolatlarını kullanmışlardır. Buna göre elde edilen enzimlerin büyük çoğunluğunu selüloz ve pektinaz enzimlerinin oluşturduğunu ve melanin miktarının düşük olduğu ya da hiç olmadığı izolatlarda, hücre dışı enzim miktarının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Melanin içeriği ile ekstraselüler enzimler ve izolatların virülensliği arasında negatif bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak melanin varlığı, ekstraselüler enzimlerin miktarı ve izolatların virülensliğinin seçiminde önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir.

Arun ve ark. (2015) bir mantar türü olan *Schizophyllum commune*'dan ekstraselüler melanini izole etmişlerdir. *Schizophyllum commune*'nin ürettiği hücre dışı koyu renk pigment, 21 günlük inkübasyon ve sıcak asit-alkali işlemlerle ortaya çıkarılıp, çeşitli biyokimyasal testlerle karakterize etmişlerdir. Melanin dozu 100  $\mu\text{g/ml}$  olarak kullanıldığında *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas fluorescens*'a karşı antibakteriyel etki gösterdiği ve *Trichophyton simii* ve *T. rubum*'a karşı antifungal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Melaninin (50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  doz ) serbest radikalleri ortadan kaldıran antioksidant bir potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Kalteh ve ark. (2014), mikorizal mantar türü olan *Glomus intraradices* ve *Glomus mosseae*'nin tuzlu koşullarda fesleğen (*Ocimum basilicum* L) bitkisi üzerindeki etkilerini incelediklerinde, artan tuz stresine karşı prolin miktarının arttığını belirtmişlerdir. Fungus ile enfekteli bitkilerde enfekteli olmayanlara göre tuz

stresi altında prolin miktarını arttırdığını ve bitkinin absorbiyon oranının daha yüksek çıktığını belirlemişlerdir. Bu da tuz stresi altında söz konusu fungusların artan prolin miktarları ile bitkinin stres gerilimini ayarlayarak besin alımı şartlarını artırarak fesleğen bitkisinin büyüme ve diğer işlevlerini yerine getirmesine olanak sağladığını tespit etmişlerdir.

Zhan ve ark. (2016) çalışmalarında, dört ayrı buğday tarlasından örneklenen 141 adet genetik olarak farklı *Z. tritici*'ye ait izolatin büyüme oranları ve patojenisitesini araştırmışlardır. Buna göre patojenisite, lezyonlar ve piknid ile kaplı yaprak alanı yüzdeleri kullanılarak serada iki buğday çeşidi (Toronit ve Greina) üzerinde değerlendirme yapmışlardır. İki patolojideki patojen ırklarının saldırganlığı arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır. Ayrıca, iki sıcaklıkta (15 ve 22°C) saldırganlık ve ortalama büyüme oranı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. *In vitro* koşullarda patojen büyüme oranının patojen virülensliğine önemli bir katkı yapabileceğini bildirmişlerdir.

Kubo ve Furusawa (1991) bitkilerde antraknoza neden olan *Colletotrichum* türlerinde appressoryum oluşumu ve penetrasyonu üzerine yaptıkları çalışmada appressoryal melanin sentezleyen ırkların daha dayanıklı olduğunu ve penetrasyon oluşturabildiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar *C. lagenarium*'un albino mutantlarıyla yaptıkları çalışmada melanin içermeyen appressoryumların konukçu bitkiye nüfuz edemediğini bildirmişlerdir.

Howard ve Valent (1996) pirinç bitkisinde hastalığa neden olan *Magnaporthe grisea*'nın bitkiye penetrasyonu ile ilgili çalışma yapmışlardır. Çalışmalarına göre appressoryumun aseksüel sporun bir germ tüpünden tek bir hücre olarak oluştuğunu ve konukçu bitkiye teması sağlayan uç kısmı haricinde tamamen melanize bir yapıda olduğunu bildirmişlerdir. Appressoryumun konukçu dokusuna temas eden kısmında melanin bulunmamasının, hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin salınmasına ve besinlerin alınmasına izin verdiğini bildirmişlerdir. Patojenik fungusların sentezlediği melanin, konukçu dokusunu istila etmek için gerekli olan turgor basıncının oluşmasına yardımcı olmaktadır.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Bu çalışma, 2016-2017 yıllarında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Laboratuvarında yürütülmüş ve çalışmada fungal materyal olarak Adana, K.Maraş, Hatay ve Mersin illerinden elde edilen *Zymoseptoria tritici* patojeni kullanılmıştır. İzolatlar, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim Görevlisi Prof. Dr. Mukkades KAYIM ve Adana Biyolojik Araştırmalar Enstitüsü'nde Görevli Yüksek Ziraat Mühendisi Gülsüm ÜNAL'ın katkıları ile morfolojik yapının mikroskopik gözlemlerine göre ve moleküler analiz yöntemleri yardımıyla tanımlanmış ve temin edilmiştir. İzolatlar, Adana: CU10StA4, K.Maraş: CU112StK239, Hatay: CU107StH110 ve Mersin: CU102StM34 olarak adlandırılmıştır. İzolat adları tez içerisinde sırasıyla A4, K239, H110 ve M34 şeklinde kısaltılmıştır. Söz konusu patojen için 4 patojen izolatu, 5 sıcaklık değeri, 4 tekerrür olacak şekilde değerlendirilip, sıcaklık değerleri ise; 4-, 15-, 25-,30 ve 35°C olacak şekilde oluşturulmuştur.

Çalışmada incelenen fiziksel parametreler; fungusun Petri kaplarındaki miselyal gelişim değerleri, birim alandaki spor yoğunluğu, spor sayısı ve renk değişimi olarak ölçülmüştür. Biyokimyasal parametreler ise protein, proteaz, prolin, melanin ve malonadialdehit (MDA) olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrürlü olarak ölçülmüştür.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Fungusların Çoğaltılması

Gelişmeye bırakılan fungus kolonilerinden, 10 mm çapında bir fungal disk, ortamdan bir cork-borer yardımıyla kesilerek, yeni hazırlanan PDA ortamlarına aseptik koşullarda aktarılmıştır. Bu şekilde deneme süresince kullanılan PDA

ortamları elde edilmiştir. Birkaç gün kontaminasyon olup olmadığı gözlemlendikten sonra 4-, 15-, 25-, 30 ve 35°C sıcaklıklarda inkubasyona bırakılmıştır. Çalışmada kullanılan fungal kültürün gelişme ortamına adaptasyonu ve gelişiminin oldukça yavaş olmasından dolayı daha önceki çalışma ve tecrübelerden yola çıkılarak inkubasyon süresi 90 gün olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Patates dekstroz agar (PDA)

İçerik	Konsantrasyon (g/l)
Kabuğu soyulmuş, doğranmış patates	200
Glukoz	15
OxoidAgar No:3	25

200 g soyulmuş patates küçük parçalara dilimlenmiş ve 1000 ml'lik saf su ile 30 dakika kaynatılmıştır. Elde edilen püre mira bezinden (Calbiochem) süzülükten sonra ve 15 g glukoz eklenmiştir (Çizelge 3.1). Bu ortam 250 ml hacime 6.25 g agar içerecek şekilde (%2.5 w/v) 8 adet 500 ml'lik konikal flasklara aktarılmıştır. Ortam 121°C'de 20 dakika (2.68 kg/cm<sup>2</sup> basınçta) otoklavlanmış ve Petri kaplarına aktarılmıştır.

Çizelge 3.2. Czapek dox ortamı (Modifiye edilmiş)

İçerik	Konsantrasyon (g/l)
Sukroz	30
NaNO <sub>3</sub>	2
KCl	0.5
Magnezyum gliserofosfat	0.5
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.01
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.35
DifcoAgar	25

Czapek Dox ortamınının içeriğinde bulunan bu maddeler damıtılmış az hacimli bir suda çözdürülmüş ve bu hacim 1 L'ye tamamlanmıştır (Çizelge 3.2). Hazırlanan bu ortam 250 ml'lik 6.25 g difco agar içeren 8 adet 500 ml'lik konikal flasklara

aktarılmıştır. Ortam 121°C’de 20 dakika (2.68 kg/cm<sup>2</sup> basınçta) otoklav edilmiş ve Petri kaplarına aktarılmıştır.

### 3.2.2. Fungusların Gelişimi ve Canlılık Testi

Hastalık etmeni PDA ortamında yetiştirildikten sonra 10 mm çapında bir fungal disk, ortamdan bir cork-borer yardımıyla kesilerek, yeni hazırlanan PDA ortamlarına aseptik koşullarda aktarılmıştır. Sıcaklık değerleriyle ilgili daha önce yapılan çalışmalar gözönünde bulundurularak, sıcaklıklar 4-, 15-, 25-, 30 ve 35°C olarak belirlenmiş olup her bir sıcaklık değeri için patojen izolatlarından 16 Petri hazırlanıp söz konusu sıcaklıklarda inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyon ortamlarının bağıl nem oranı %35-45 civarında tutulmuştur (dijital higrometre).

Petri kapları karanlık ortamda inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyondan sonra deneme süresince, fungal etmenin PDA ortamlarındaki büyüme çapları 1.gün ve her 10 günde bir, cetvel yardımıyla iki yönlü mm olarak ölçülmüş ve ortalama değerler fungusun miselyal gelişimi olarak kayıdedilmiştir. Daha sonra miselyal gelişim değerleri aşağıdaki formülden yararlanılarak % miselyal inhibisyon değerleri elde edilmiştir.

$$MGI(\%) = \left[ \frac{dc-dt}{dc} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

dc= Kontrol grubu

dt= Muamele grubu

Deneme boyunca farklı sıcaklıklara maruz kalan ve etkisinde kaldığı sıcaklık değerlerinden dolayı gelişimi duran patojenin canlılığı test edilmiştir. Petri kaplarından kazınan 3 mm fungal disk önceden hazırlanmış PDA ortamlarına aktarılmıştır. Oda sıcaklığında 4 gün süre ile inkubasyona bırakılmış ve fungal gelişim gösteren izolatlar Petri kaplarında cetvel yardımıyla iki yönlü ölçülerek kayıt edilmiştir.

### 3.2.3. Spor Sayısı ve Spor Yoğunluğu

Spor sayımı için, 10, 20 ve 30. günlerde olmak üzere 3 defa, farklı sıcaklıklara maruz bırakılan fungus kolonisinden birer adet fungal disk (5 mm çapında) alınarak tüplere konmuş ve 1 ml su içinde sporlar ayrıştıktan sonra tüpler vibratörde çalkalanarak sporların homojen bir şekilde suda dağılması sağlanmıştır. Elde edilen spor süspansiyonundan 10 µl'lik hacim alınarak heamocytometre üzerinde fungal sporlar sayılarak spor sayısı spor ml<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.

Ayrıca çapı belirlenen 5mm'lik disk ortamında heamocytometre yardımıyla hesaplanan spor sayısı birim alana (5 mm çapındaki dairesel alana) bölünerek spor yoğunluğu spor mm<sup>-2</sup> olarak belirlenmiştir.

### 3.2.4. Patojenin Renk Değişiminin Belirlenmesi

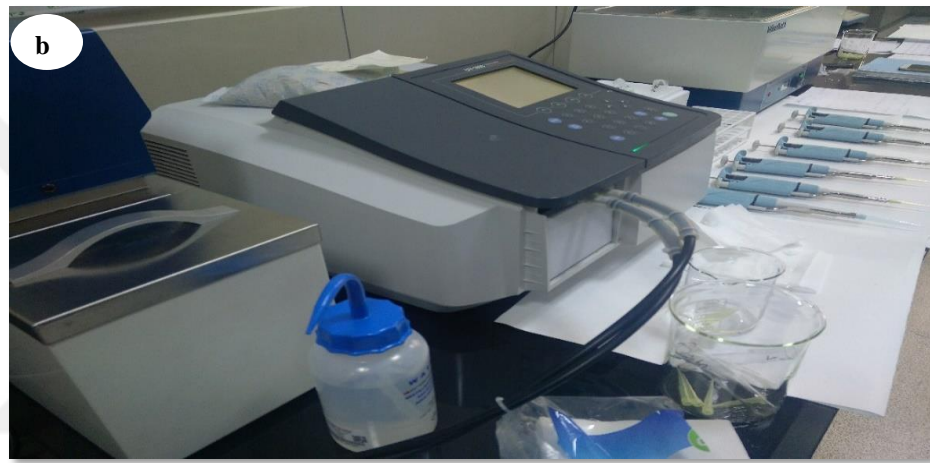
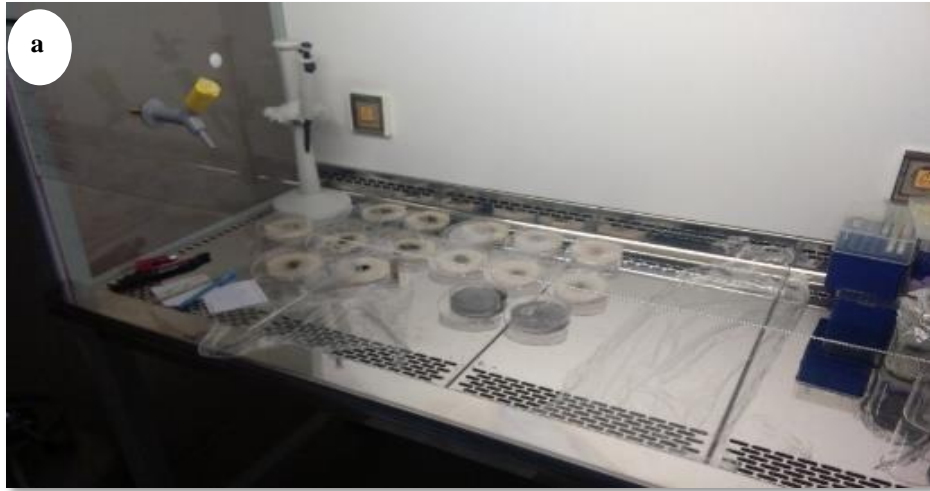
Farklı sıcaklık derecelerine maruz bırakılan patojenin renk değişimi dijital olarak belirlenmiştir. Buna göre her 10 günde bir PDA ortamlarındaki patojenin aynı kamera ve megapiksel (General Mobile 13 pixel) özellikte olacak şekilde fotoğrafları kaydedilmiştir. PDA ortamında gelişmeye bırakılan patojenin üzerinde doğrusal bir hat boyunca 5x5 megapiksel alan kaplayan 7 ayrı nokta belirlenmiştir. Jcpicker (A color picker utility) programı kullanılarak belirlenen noktaların RGB (Red, Blue, Green) kodları ortaya çıkarılmıştır. Daha sonra bu RGB kodları sayesinde renk paleti üzerindeki karşılığı olan renk, meydana getirilip söz konusu sıcaklık stresinin patojenin gelişimi boyunca patojenin rengi üzerindeki etkileri belirlenerek bir renk skalası oluşturulmuştur. Patojene ait fotoğraflar ImageJ2x programı kullanılarak ortalama RGB (Red, Blue, Green) değerleri belirlenmiştir.

### 3.2.5. Fungal Etmenin Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Çözünabilir protein ölçümü; Petri ortamında gelişmeye bırakılan fungal kültürlerden Petri kaplarına dökülen 10 ml steril su ile miseller yüzeyden kazınarak yaklaşık 0.1 g ağırlığında misel elde edilip, bu kütle fosfat buffer çözeltisinde (pH 7.0) havan ve havaneli ile homejenize edilerek, 10000 g de 10 dakika süre ile 4°C'de santrifuj edilmiştir (Dikilitas ve ark., 2010). Elde edilen supernatant'tan Bradford (1976)'a göre protein okuması yapılmıştır.

Bradford protein ölçümü, Coomassie Brilliant Blue G-250 metoduna göre yapılmıştır (Bradford, 1976). Bu metoda göre, 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml 95%lik ethanol içinde çözüldükten sonra solusyon 100 ml 85% lik w/v fosforik asit ile ( $H_3PO_4$ ) karıştırılıp ve saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 10-100  $\mu$ g arasında protein içeren örnekler (100  $\mu$ l), 5 ml hacminde Coomassie Brilliant Blue reagent ile karıştırılarak 10 dakika ila 1 saat arasında değişen süre içinde ölçülmüştür.

Protein ölçümünde Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V standart protein olarak kullanılmış ve 10-100  $\mu$ g arasında değişen protein konsantrasyonları (stok solusyon, 1 mg ml<sup>-1</sup>) 595 nm'de ölçülerek elde edilen linear grafiğe göre örneklerin protein değerleri belirlenmiştir. Örnek okumaları spektrofotometrede (Shimadzu: UV-1800) gerçekleştirilip, sonuçlar mg protein/g misel ağırlık olarak ifade edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Biyokimyasal parametrelerin araştırılması öncesi yapılan hazırlıklar (a:kültürlerin hazırlanması, b: spektrofotmetre ölçümleri, c: santrifüj aşaması)

### 3.2.6. Proteaz Aktivitesi

Proteaz enzim ölçümü; hücre dışı protease aktivitesi azocasein tabanlı amino asitlerin ve küçük peptitlerin fungal kültürde açığa çıkması esasına dayanarak yapılmıştır. Bunun için, PDA ortamında geliştirilen funguslardan alınan 3 mm çapında bir fungal disk, ortamdan bir cork-borer yardımı ile kesilerek ve kesilen disk bir pipet ucu ile alınarak, 1.5 ml hacmindeki Eppendorf tüplerine yerleştirilmiştir. Bu tüplere 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) içinde hazırlanan, 1% lik (w/v) azocasein ilave edilmiştir (hacim, 120 µl).

Fungal gelişim ve azocasein hidrolizi, tüplerin oda sıcaklığında 1 saat inkubasyonu ile gerçekleştirilmiş olup proteolysis yani protein parçalanması ortama 300µl (10%, w/v) soğuk trichloro acetik asit (TCA) ilavesi ile sonlandırılmıştır. Daha sonra 15000g de 10 dakika santrifuj işleminden sonra, 350 µl supernatant alınarak 30µl 1M NaOH ile karıştırılıp ve bir kez daha yukarıda bahsedildiği gibi santrifuj işlemi sonrası proteaz aktivitesi 440 nm spektrofotometrede (Shimadzu: UV-1800) ölçülmüştür. Sonuçlar,  $A_{440} \text{ dak}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$  olarak ifade edilmiştir (Girard ve Michaud, 2002; Dikilitaş ve ark., 2018).

### 3.2.7. Proline Ölçümü

Protein aşamasında elde edilen protein solüsyonu prolin analizi için de kullanılmıştır. Elde edilen supernatant ve 2 ml ninhidrin test tüpüne konulup ve 100°C'de 1 saat kaynatılmıştır. Sonra buzlu ortama alınıp 5ml toluene eklenerek tüpler çalkalanmış (15-20 sn), 20 dakika bekletildikten sonra tüplerdeki karışımın iki tabakaya ayrılması sağlanmıştır ve 515 nm toluen kontrolüne karşı okutulmuştur. Standart olarak önceden hazırlanmış olan L-prolin solüsyonu kullanılmıştır. Ninhidrin Solüsyonu için; 1.25 g Ninhidrin, 30 ml Glacial asetik asit, 20 ml 6M fosforik asit olacak şekilde hazırlanmıştır (Bates ve ark., 1973).

### 3.2.8. Malonadialdehit (MDA) Analizi

Malonadialdehit analizi için Sariam ve Saxena (2000) tarafından düzenlenen yöntem kullanılmıştır. Buna göre 3 adet fungal disk (5 mm) PDA ortamından alınıp, 2 ml trichloro asetik asit (%1 TCA) içinde homojenize edilmiş ve 10000-12000 g'de 10-12 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant 1ml olunca, %20'lik TCA ayrıca hazırlanmış ve bu karışıma 5 g TBA eklenmiştir. Daha sonra bu karışımdan 4 ml alınıp ve 1 ml supernatant ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 95°C'de 30 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra hızla buz banyosu yapılarak soğutulmuştur. MDA sonuçları 532 ve 600 nm'de spektrofotometrede (Shimadzu: UV-1800) cihazında absorbans okumaları yapılarak elde edilen değerlerin MDA miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{MDA}(\text{nmol g}^{-1} \text{ misel}) = \frac{\text{ekstrakt hacmi}(\text{ml}) \times [(A_{532} - A_{600}) / (155 \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1})]}{\text{örnek miktarı}(\text{g})} \times 10^3 \quad (3.2)$$

### 3.2.9. Melanin Analizi

Melaninin ekstraksiyonu ve analizi Gadd (1982)'a göre gerçekleştirilmiştir. Bir gram miselyum, 60 günlük Petri kaplarından kazınarak, 5 ml damıtılmış su içinde 5 dakika kaynatılıp ve santrifüj edilmiştir (5 000 g, 5 dakika). Daha sonra miseller yıkanıp, tekrar santrifüje tabi tutularak ardından, 120°C'de 20 dakika süreyle 3 ml (1 M) NaOH ile otoklav edilmiştir. Bunu takiben, alkalın pigment ekstraktının konsantre HCl ile asitlendirilmesi (pH) ile melanin çökertilmiştir. Çökelti damıtılmış suda üç kez yıkanıp daha ileri analiz için nemden arındırılmış koşulda bir gece boyunca 20°C'de kurutulmuştur. Spektrofotometrik analiz için kurutulmuş pellet 1 ml (1M) NaOH içerisinde 80 °C'de 2 saat süreyle çözündürülüp ardından 12,000 g'da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüplere aktarılmış ve absorbans 405 nm'de ölçülmüştür.



### 3.2.10. Verilerin Değerlendirilmesi ve Analizlerin Yapılması

Veriler bir yönlü varyans analiz yöntemi (ANOVA) kullanarak Tukey's Test Yöntemi ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki farklar  $P < 0.050$  den düşük olduğu zaman önemli bulunmuştur. Veriler ayrıca Ortalama  $\pm$  Standart hata (SH) olarak ifade edilmiş, istatistik analizler SPSS veri analiz paket programı (2013 IBM Statics for Windows Version 22.0 ) yardımı ile yapılmıştır.



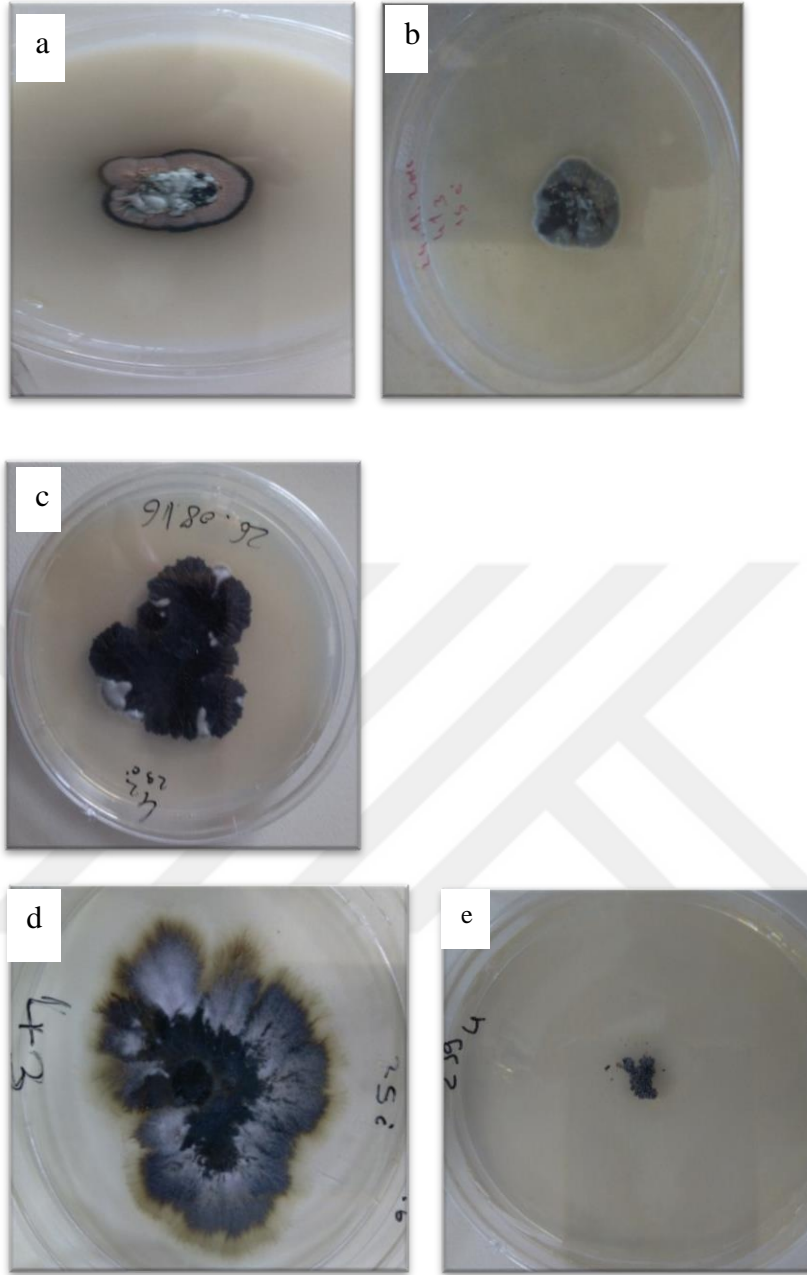
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Fungusların Gelişimi ve Canlılık Testi

*Zymoseptoria tritici* söz konusu sıcaklıklarda genellikle küçük koloni oluşturmuş ve koloni genişleme hızı oldukça yavaş olmakla birlikte 4-,15-,25 ve 30°C’de gelişimini sürdürmüştür. İnkubasyonun 80. Gününde K239 izolatu ancak 70 mm’lik bir çapa ulaşmıştır. Patojenin denemeye tabi tutulan izolatlarından hiçbirisi 35°C’de gelişmemiştir, inkubasyonun 10. gününden itibaren gelişmeleri tamamen durmuştur. Bütün sıcaklıklar değerlendirildiğinde, A4 izolatu yüksek bir gelişim göstermiştir. Bununla birlikte en az gelişen fungus ise K239 izolatu olmuştur (Şekil 4.1).

İzolatların ortalama büyüme çapları karşılaştırıldığında M34 izolatu en yüksek büyüme 15°C’de ulaşmıştır. A4 izolatu en yüksek büyüme 25°C’de sağlamıştır (Şekil 4.2). İzolat K239 en yüksek ortalama büyüme 15°C’de ulaşmış (Şekil 4.2). Son olarak H110 izolatu ise en yüksek ortalama büyüme sağladığı sıcaklık 15°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4). Genel olarak patojenin en yüksek ortalama büyüme 15°C ve 25°C’de gerçekleştirdiği (M34, K239, H110 nolu izolatlar) görülmekle beraber 4-, 25-, 30 ve 35°C’de en yüksek ortalama büyüme A4 izolatında görülmüştür.

Finci ve Yılmaz Demir (1982) *S. tritici* ile PDA ortamında 21 günde 25.19 mm’lik ortalama koloni çapı oluşturmuşlar aynı araştırmacılar denedikleri birçok değişik katı ortamda dahi aynı sürede ancak 30 mm’lik bir koloni gelişmesi sağlandığını belirtmişlerdir.



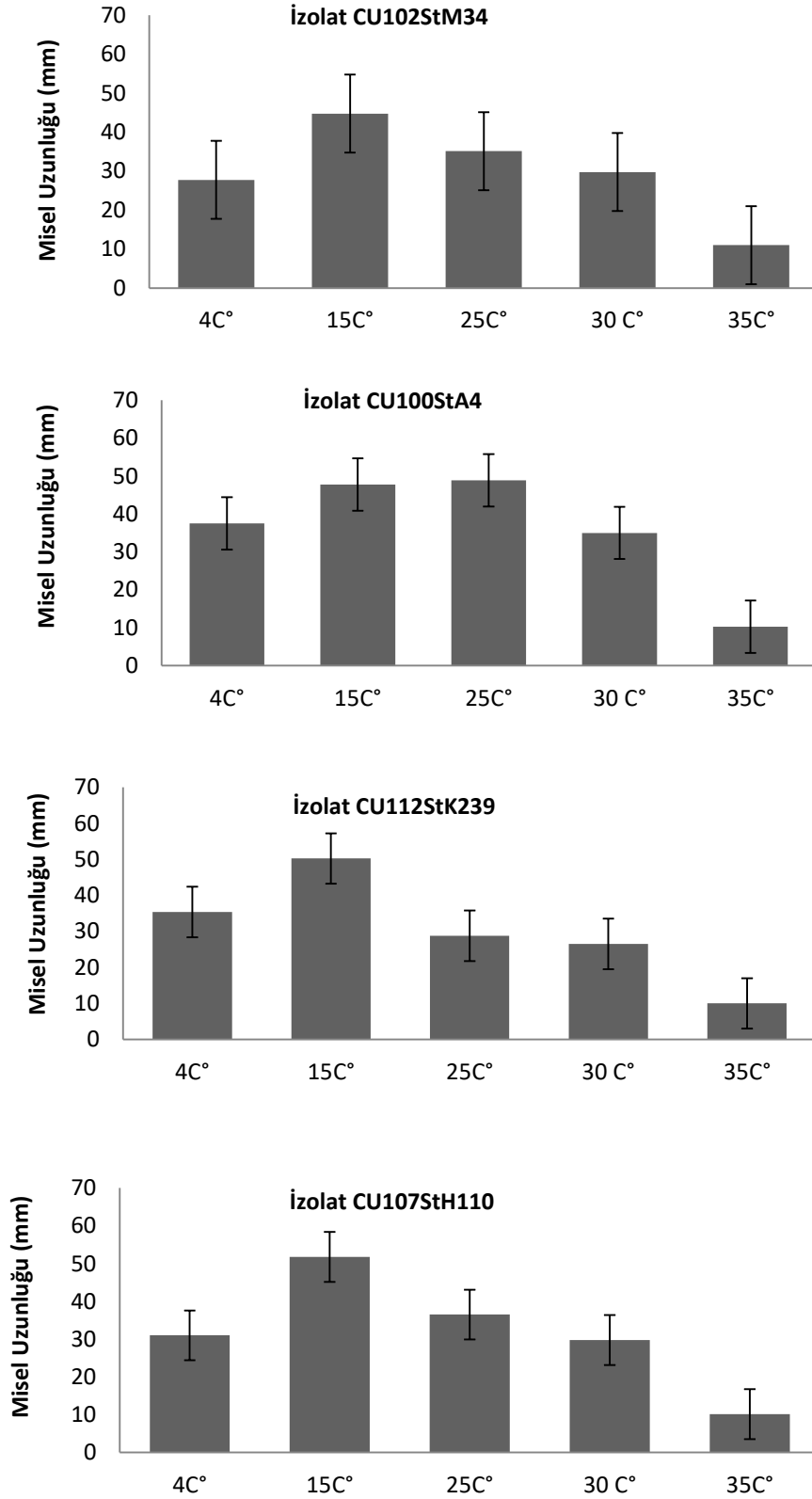
Şekil 4.1. *Z. tritici* fungusunun miselyal gelişimi (a:4°C, b:15°C, c:25°C, d:30°C, e:35°C)

Guo ve ark. (2008) *Z. tritici*'de konidilerin çimlenebilmesi için gerekli sıcaklıkların minimum 2-3°C maksimum 33-37°C ve optimum sıcaklığın 20-25°C olması gerektiğini vurgulamıştır. Ayrıca sıcaklıkların 2°C altına düşmesi durumunda patojenin enfeksiyon yapmasının ertelenebileceğini belirtmişlerdir. Düşük sıcaklık derecelerinin (4°C) spor çimlenmesi, miselyal gelişim ve piknit oluşumu için gereken süreyi uzatabileceğini gözlemlemişlerdir.

Hess ve Shaner (1987) dört nemli peryot ve üç sıcaklık derecesi (11-, 18-, 25°C) ile yaptıkları çalışmada yüksek sıcaklık değerlerine çıkıldıkça çimlenme penetrasyon ve miselyal gelişimin devam edip enfeksiyon yapabilmesi için uzun ve yüksek nemli peryotların olması gerektiğini belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda kullanılan sıcaklık değerleri diğer çalışmalarla ile paralellik göstermektedir. Düşük nem oranı, zamanla PDA ortamının özelliklerini kaybetmesi ve yüksek sıcaklıktan dolayı patojenin çeşitli enzim reaksiyonlarını gerçekleştirememesinden dolayı 35°C de etmenin gelişiminin tamamen durduğu gözlemlenmiştir.

Fungusların canlılığını test etmek için 35°C'de inkübasyona bırakılan fungal etmeden 3 mm'lik bir kesit alınıp, daha önceden hazırlanmış olan PDA ortamına aktarılmıştır. Patojen 4 gün süre ile oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmış ve bu canlandırma testi sonucunda fungus gelişmeye başlamıştır. Sadece sıcaklığın etkisini belirlemek için nem oranı sabit tutulmuştur. Aksi halde yüksek ve uzun nem peryotlarının uygulanması durumunda 35°C'de de gelişimin sağlanacağı öngörülmüştür. Bu durum yüksek sıcaklıklarda bulunan fungusların uygun sıcaklık ve nem ortamında patojenik etki yapabileğini göstermiştir. Dolayısı ile hastalık etmeninin sıcak ve kurak bölgeler için geliştirilen buğday çeşitlerinin uygun koşullar olduğunda, buğday kültürünü olumsuz etkileyebileceği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. *Z. tritici* izolatlarının ortalama koloni büyüme çapları

## 4.2. Spor Sayısı ve Spor Yoğunluğu

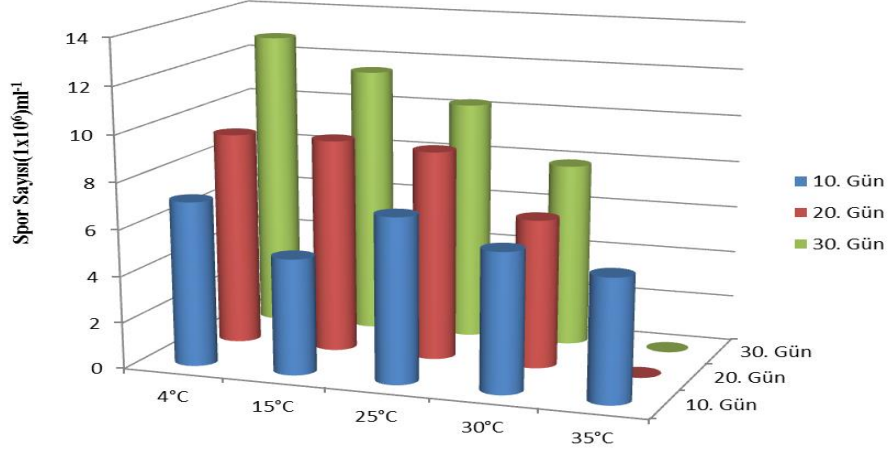
Fungusun spor sayısı sıcaklık artışından etkilenmiştir. Sıcaklık değerlerinin artmasıyla spor sayısında azalma meydana gelmiştir. En yüksek spor eldesi 15 ve 25°C elde edilmiştir. Ayrıca düşük sıcaklıklardaki (4°C) spor sayısı yüksek sıcaklıktaki (30-, 35°C) spor sayısından daha fazla çıkmıştır. Fungus spor sayısı kendisi için uygun olan optimum sıcaklık koşullardan (15-, 25 °C) uzaklaştıkça etkilenmekte fakat bu olumsuz etkinin, düşük sıcaklıklara göre yüksek sıcaklıklarda daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Fungus kolonileri 35°C'de 10. günden sonra gelişme gösteremediğinden yalnız bir defa sayım yapılmıştır. Fungus izolatları karşılaştırıldığında, 10. gün için en yüksek spor miktarı ( $7.9 \times 10^6$  spor ml<sup>-1</sup>) 25°C'de, K239 izolatından elde edilmiştir. Patojen izolatlarının 20. gün yapılan sayımlarında en yüksek spor miktarı 15°C'de,  $10.0 \times 10^6$  spor ml<sup>-1</sup> ile izolat CU100StA4'ten elde edilmiştir. Son olarak 30. gün yapılan sayımlarda ise 4°C'de  $13.8 \times 10^6$  spor ml<sup>-1</sup> ile yine A4 izolatu en yüksek oranda spor üretmiştir (Şekil 4.3).

Patojen izolatları sıcaklık değişimlerinden birbinden farklı tepkiler vermeye beraber sıcaklık artışından olumsuz etkilenmişlerdir. M34 izolatu ve A4 izolatu sıcaklık artışına rağmen diğer izolatlardan daha fazla sporulasyon sağlamışlardır. M34 izolatu ve A4 izolatu, düşük sıcaklıklarda (4°C) yapılan bütün sayımlarda da yüksek bir sporulasyon sağlamışlardır. Benzer şekilde Saidi ve ark. (2012) katı ortam olan YMDA (maya özü, malt özü, dextrose agar) 18°C ve 20°C yapmış oldukları sayımlarda 1 ml'de  $1 \times 10^7$  spor elde etmişlerdir.

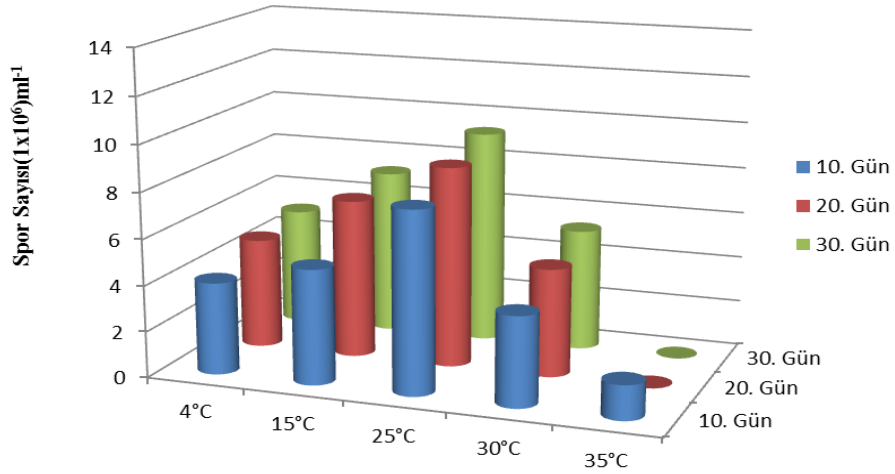
Chungu ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada nemli periyod süresini uzatıp sıcaklıkları 18°C'den 20°C'ye çıkardıklarında elde ettikleri spor miktarı  $1 \times 10^6$  spor/ml'den  $1 \times 10^7$  spor/ml'ye çıkarmışlardır. Kültür ortamlarındaki katkı maddeleri *Z. tritici*'de spor üretimi üzerinde etkili bir faktördür. Kültür ortamlarının içeriklerine ek olarak sıcaklık, ışık, pH gibi diğer ajanlar da spor üretimini etkilemektedir (Guo ve ark., 2008).

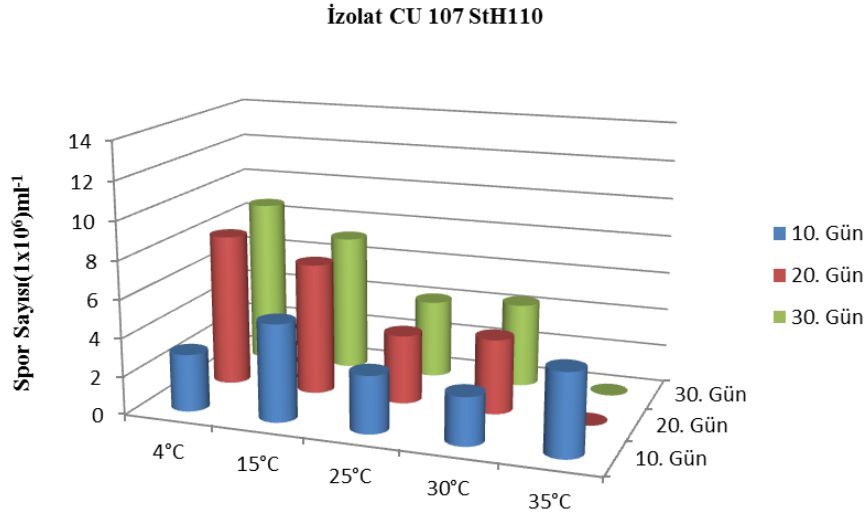
Patojen izolatlarının sıcaklıklara farklı tepkiler verebilmesi, patojene karşı alınacak kültürel önlemler için önemlidir. Ayrıca geliştirilecek dayanıklı buğday çeşitleri üzerinde, infekte etme potansiyeli olduğu gözlemlenmiştir.

İzolat CU 102 StM34

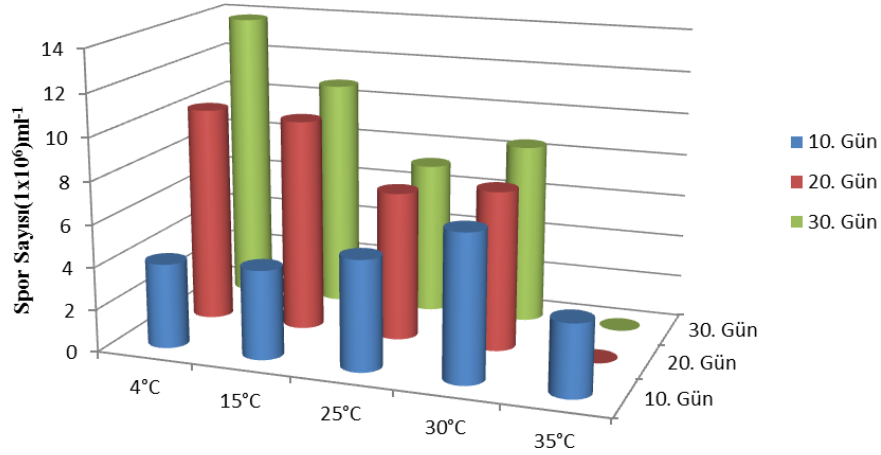


İzolat CU 112 StK239





**İzolat CU 100 StA4**



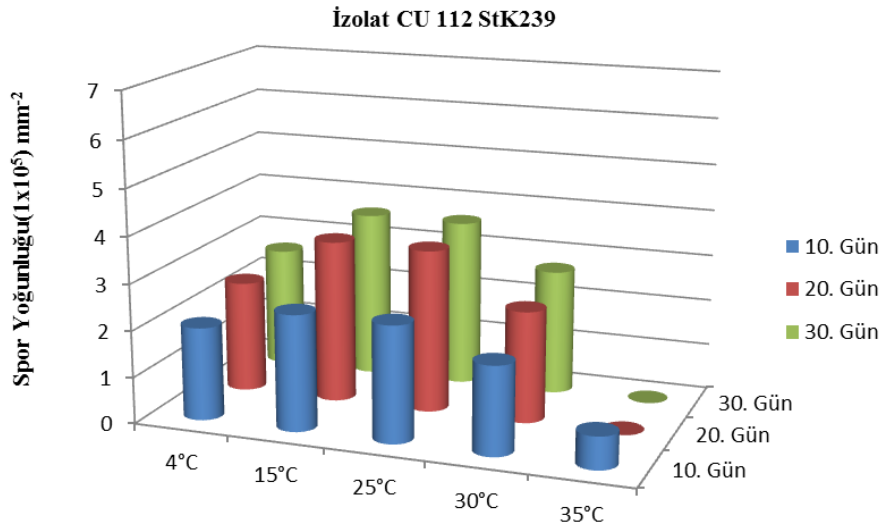
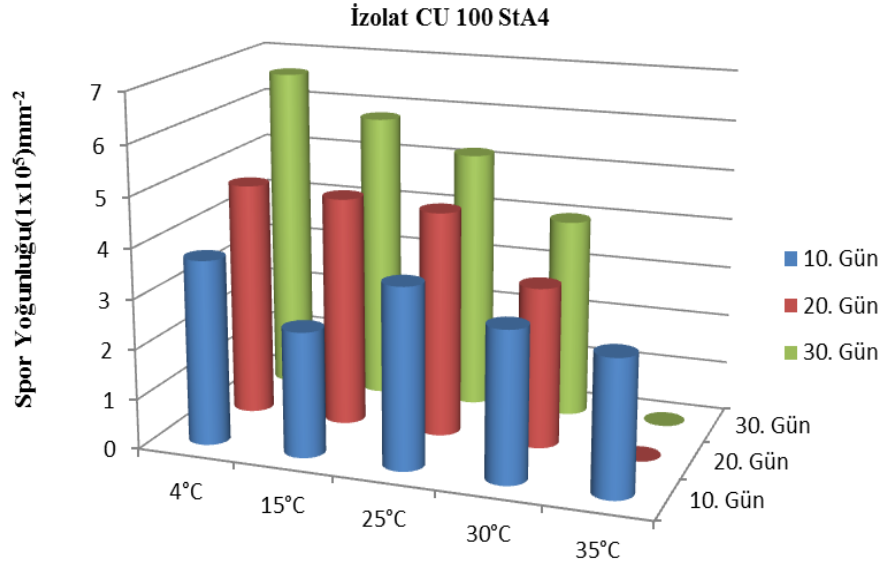
Şekil 4.3. *Z.tirritici* izolatlarının spor sayıları (10, 20 ve 30. gün)

Patojenin spor yoğunluğu sıcaklık değişimlerinden etkilenmiştir. Farklı sıcaklıklar altında 10-, 20 ve 30. gün yapılan ölçümlerde patojenin spor yoğunluğu zaman içerisinde değişiklik göstermiştir ve patojene ait izolatların spor yoğunlukları farklılık göstermiştir. İzolatlar karşılaştırıldığında, 10. gün yapılan ölçümlerde M34 izolatu birim alanda en yüksek spor sayısına ( $3.7 \text{ mm}^2$ ) ulaşmıştır. A4 izolatu ise 20 ve 30. Gün yapılan ölçümlerde en yüksek yoğunluğa ( $5.1 \text{ mm}^2$  ve  $7.0 \text{ mm}^2$ )

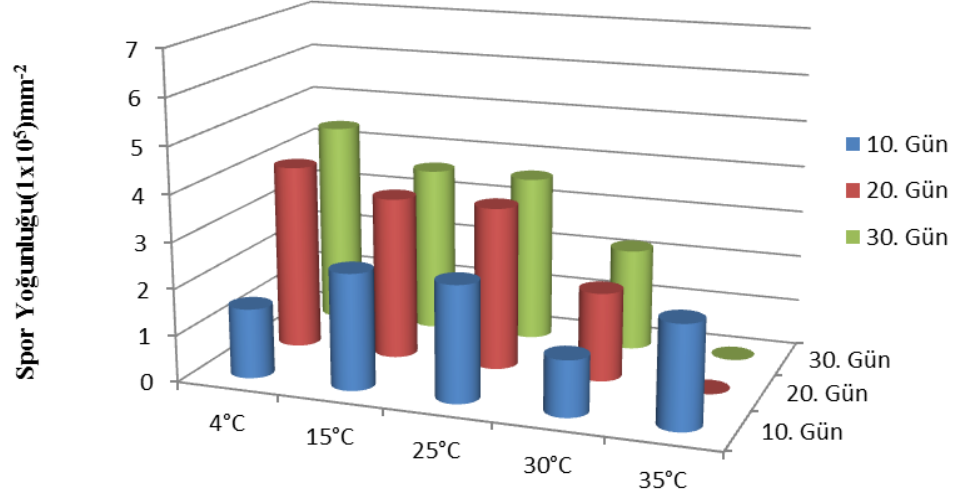


ulaşmıştır. Ayrıca A4 izolatu, yüksek sıcaklıklarda (25-, 30-, 35°C), 20 ve 30. gün yapılan sayımlarda spor yoğunluğunun diğer izolatlara göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (şekil 4.4). İzolat A4'n sıcaklıkların yükselmesine rağmen birim alanda meydana getirdiği spor sayısındaki artış, izolatu yüksek sıcaklıklarda hastalık yapma potansiyelinin daha fazla olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

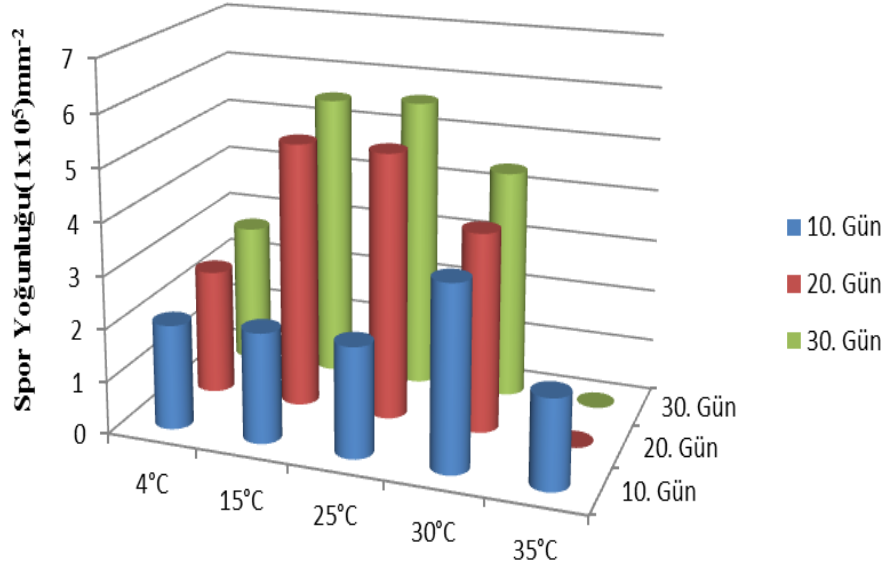
Zhan ve ark. (2016) *Z. tritici* 'ye ait izolatları (izolat 141) 15°C ve 22°C'de *in vitro* koşullarda büyüme oranlarını 15°C'de ortalama 0.49 mm<sup>2</sup> gün<sup>-1</sup> olarak tespit edip aynı şekilde 22°C'de ise ortalama 1.02 mm<sup>2</sup> gün<sup>-1</sup> olarak belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar fungus gelişim hızı olarak 22°C'deki günlük büyüme hızınının 15°C'den daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir.



## İzolat CU 107 StH110



## İzolat CU 102 StM34



Şekil 4.4. Fungus izolatlarının birim alandaki spor yoğunluğu

### 4.3. Patojenin Renk Değişiminin Belirlenmesi

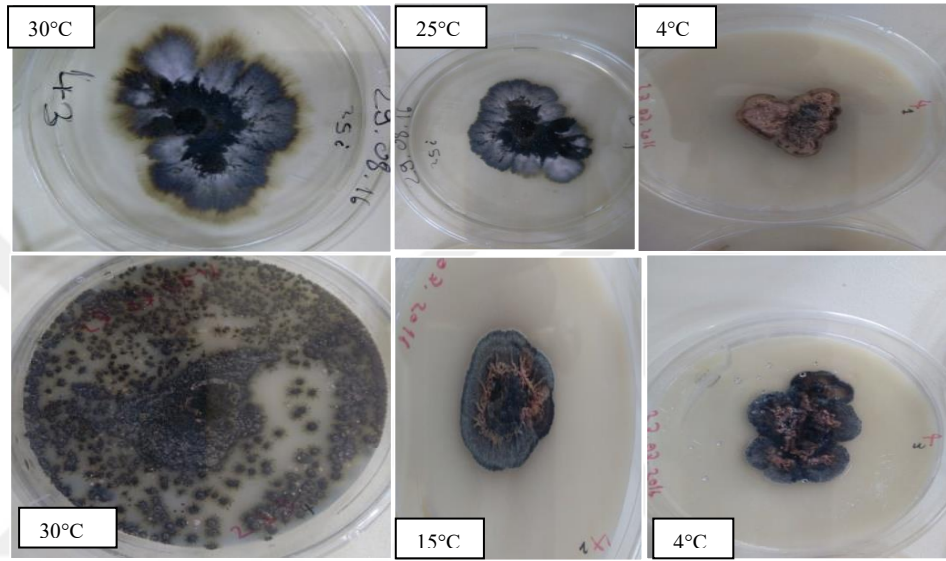
Fungal etmenin *in vitro*'da düşük sıcaklıklarda açık renkli tonlar meydana getirirken sıcaklık değerlerinin artmasıyla daha yüzeysel ve koyu renkler oluşturduğu gözlenmiştir. Bu durum fungusun sıcaklık değişimleri karşısında biyokimyasal yapılarında meydana getirdiği değişimler ile strese karşı oluşturduğu savunma mekanizmalarının bir sonucu olarak düşünülmektedir. Düşük sıcaklıklar da (4°C ve 15°C) fungus miselyal bir büyüme oluştururken, sıcaklığın artmasıyla iğne benzeri koyu makro ve mikrosporlar oluşturarak geliştiği düşünülmektedir (Şekil 4.5).

Bu şekilde fungus ortamdaki ve bünyesindeki suyu daha etkin bir şekilde kullanarak geliştiği öngörülmektedir. Patojenin renk değişim skalasına bakıldığında açık kahverenginden koyu kahverengine kadar olan alanlar daha çok etmenin miselyal büyüme gösterdiğini ortaya koymaktadır. Aynı şekilde RGB renk kodlarıyla oluşturulan diğer alanlarda miselyal büyüme veya yeni bir misel katmanın oluşmadığı görülmektedir. Ayrıca RGB renk kodlarıyla elde edilen renkler göz önünde bulundurulduğunda optimum sıcaklıklarda da fungusun nasıl bir renk değişimi gösterdiği ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.7). Patojene ait fotoğraflar ImageJ2x programı kullanılarak ortalama RGB (Red, Blue, Green) değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Fungal patojen 4°C'de pembe parlak bir misel tabaka oluşturmuştur. Zaman içerisinde kolonin merkezi koyu kahverengiye dönüşmüş bu merkezin etrafı yine parlak pembe renkte yeni misel tabakası oluşturmuştur. Koloni alanın kenar kısımları iğne benzeri koyu kahverengi veya füme renklerde kendini göstermiştir. Fungal miselyum PDA ortamının derinliklerine doğru da gelişim göstererek yayılmıştır (Şekil 4.6).

Bu durum bütün izolatlarda görülmekle beraber K239 nolu izolat bu sıcaklık değerinde daha yüzeysel bir yayılma gösterip denemenin sonuna kadar küçük kolonicikler halinde gelişip daha sonra bu koloniler birleşmiştir. Bu izolat sürekli olarak koyu yeşilimsi ve koyu kahve renk meydana getirmiştir. Aynı durum 15°C'deki fungus izolatları için de geçerlidir.

Fungusun 25°C ve 30°C'deki renkleri fark edilebilir seviyede 4°C'deki izolatlardan farklı olmuştur, Bu sıcaklık değerlerinde (25°C ve 30°C) etmenin izolatları merkezi koyu siyah ve etli, üzeri yer yer beyaz bir alan oluştururken, kolonin kenar kısımları genellikle yeşilimsi, siyah veya füme renklerinden oluşmaktadır. Patojenin K239 nolu izolatı bu sıcaklık değerlerinde küçük koloniler oluşturmayıp aynı merkez etrafına büyüme göstermiştir.



Şekil 4.5. Patojenin farklı gün ve sıcaklıklardaki genel renk görünümü

KONTROL GRUBU(PDA)	Sıcaklıklar(°C)	RGB kodları	134 129 123	132 128 122	119 115 109	122 117 109	134 129 123	132 128 122	119 115 109	122 117 109	135 129 123	133 128 122
		Renk										
CU100StA4	4°C	RGB kodları	97 93 95	121 114 119	45 36 36	78 60 57	77 58 56	49 45 51	114 82 81	51 51 52	39 30 28	46 50 55
		Renk										
	15°C	RGB kodları	85 69 58	43 33 30	60 58 58	52 55 59	71 76 73	45 51 51	63 73 78	41 39 45	68 70 67	94 94 87
		Renk										
	25°C	RGB kodları	9 11 14	9 9 11	24 24 26	36 36 40	135 137 152	145 146 163	131 136 154	142 142 163	133 130 158	139 141 162
		Renk										
	35°C	RGB kodları	50 48 58	60 55 54	64 59 58	69 62 60	70 64 63	72 66 75	86 70 61	89 80 88	103 89 84	120 110 94
		Renk										
CU102StM34	4°C	RGB kodları	80 69 66	40 32 29	23 31 35	70 66 65	9 12 17	114 95 91	41 42 41	99 82 79	104 88 83	101 85 82
		Renk										
	15°C	RGB kodları	111 99 85	100 85 66	70 64 59	29 32 36	46 46 46	36 38 37	58 58 58	64 71 67	98 101 103	89 92 79
		Renk										
	25°C	RGB kodları	82 87 101	104 110 128	75 82 93	68 71 78	11 14 15	123 125 142	53 53 57	48 48 53	24 29 32	141 145 170
		Renk										
	35°C	RGB kodları	50 48 58	60 55 54	64 59 58	69 62 60	70 64 63	72 66 75	86 70 61	89 80 88	103 89 84	120 110 94
		Renk										
CU112StK239	4°C	RGB kodları	82 74 73	8 9 11	9 9 11	13 14 17	69 61 60	78 67 63	52 34 27	40 44 47	99 84 78	105 94 91
		Renk										
	15°C	RGB kodları	142 147 153	133 136 140	63 66 69	116 117 121	94 93 88	145 156 170	134 143 157	143 149 161	55 61 65	
		Renk										
	25°C	RGB kodları	11 11 14	9 11 16	13 15 19	93 103 118	88 99 113	8 10 14	9 14 20	12 19 26	17 26 40	11 18 31
		Renk										
	35°C	RGB kodları	50 48 58	60 55 54	64 59 58	69 62 60	70 64 63	72 66 75	86 70 61	89 80 88	103 89 84	120 110 94
		Renk										
CU1075StH110	4°C	RGB kodları	97 93 95	121 114 119	45 36 36	78 60 57	77 58 56	49 45 51	114 82 81	51 51 52	39 30 28	46 50 55
		Renk										
	15°C	RGB kodları	85 69 58	43 33 30	60 58 58	52 55 59	71 76 73	45 51 51	63 73 78	41 39 45	68 70 67	94 94 87
		Renk										
	25°C	RGB kodları	9 11 14	9 9 11	24 24 26	36 36 40	135 137 152	145 146 163	131 136 154	142 142 163	133 130 158	139 141 162
		Renk										
	35°C	RGB kodları	50 48 58	60 55 54	64 59 58	69 62 60	70 64 63	72 66 75	86 70 61	89 80 88	103 89 84	120 110 94
		Renk										

Şekil 4.6. RGB kodları ve renk paleti üzerindeki karşılığı olan renkler

Çizelge 4.1. İzolatların RGB değerleri

Sıcaklık(°C)	İzolatlar	Red	Green	Blue	(R, G, B)/3
4	CU100StA4	161.3	161.1	161.3	161.2
	CU107StH110	149.4	147.6	146.3	147.8
	CU112StK239	124.9	123.8	124.0	124.3
	CU102StM34	130.8	128.8	126.8	128.8
15	CU100StA4	114.5	113.2	107.9	111.9
	CU107StH110	121.1	120.0	113.3	118.2
	CU112StK239	127.8	128.2	117.0	124.3
	CU102StM34	123.2	123.4	111.5	119.4
25	CU100StA4	126.9	125.6	128.3	126.9
	CU107StH110	128.8	126.6	125.8	127.1
	CU112StK239	128.9	127.0	125.3	127.1
	CU102StM34	128.4	126.9	124.0	126.4
30	CU100StA4	127.2	130.4	132.2	129.9
	CU107StH110	128.5	129.3	131.9	129.9
	CU112StK239	130.3	129.9	128.7	129.7
	CU102StM34	127.4	126.3	123.9	125.8
35	CU100StA4	126.9	126.8	128.3	127.3
	CU107StH110	137.9	135.3	130.7	134.6
	CU112StK239	126.2	126.8	125.8	126.3
	CU102StM34	133.6	132.9	130.7	132.4

#### 4.4. Fungal Etmenin Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Fungusun farklı sıcaklıklar altındaki protein değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.2). Patojenin protein içeriği sıcaklık değişimlerinden etkilenmiştir ( $P<0.05$ ). Sıcaklıkların yükselmesi patojenin protein içeriğinde azalmaya neden olmuştur. Fungus, en yüksek protein içeriğine  $15^{\circ}\text{C}$ 'de ulaşmıştır. En düşük protein miktarı ise  $30^{\circ}\text{C}$ 'de gözlemlenmiştir. Bununla birlikte gruplar karşılaştırıldığında (Tukey's Testi),  $4^{\circ}\text{C}$  ve  $15^{\circ}\text{C}$ 'deki gruplarda bulunan protein miktarları  $25^{\circ}\text{C}$  ve  $30^{\circ}\text{C}$ 'de bulunan gruplardan daha yüksek çıkmıştır. Fungus izolatlarından, M34 izolatının protein miktarı diğer izolatlardan daha yüksek çıkmıştır. İzolat M34 bu yüksek değerlere  $15^{\circ}\text{C}$ 'de ulaşmıştır.

Çizelge 4.2. Farklı sıcaklıklara maruz kalan patojenini protein değerleri

<b>Z.tritici</b> <b>İzolatları</b>	<b>g Protein ( g Misel<sup>-1</sup>)</b>				
	<b>4C°</b>	<b>15C°</b>	<b>25C°</b>	<b>30C°</b>	<b>35C°</b>
CU112StK239	0.60 ± 001 <sup>c</sup>	0.83 ± 006 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.02 <sup>b</sup>	0
CU102StM34	0.69 ± 001 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.02 <sup>b</sup>	0
CU107StH110	0.71 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>b</sup>	0
CU100StA4	0.85 ± 001 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.02 <sup>a</sup>	0

<sup>a</sup>Aynı harf grubu içinde yer alan değerler  $P<0.05$  seviyesinde istatistik olarak birbirlerinden farklı bulunmamıştır. <sup>b</sup>Veriler üç tekerrürün ortalaması olarak düzenlenmiştir

Fungal patojenlerin yapısında bulunan proteinler, genetik yapının içinde yer alarak veya hücre duvarı ve enzimlerin yapısında yer alarak birçok görev üstlenmiştir. Proteinler stres altında kalan patojenin savunma mekanizması ve virülenslik derecesi üzerinde de etkili bir rol oynadığı bilinmektedir (Paper ve ark. 2007). Patojen funguslarda bulunan proteinler, farklı gelişim ve enfeksiyon süreçlerinin başlatılması, konukçu-patojen ilişkisinin kurulması hastalık, şiddetinin belirlenmesinde ve oluşan birçok reksiyonda anahtar rol oynamaktadır (Wawra ve



ark. 2013). Çalışmamızda sıcaklık gibi abiotik stres faktörüne karşı patojenin protein miktarındaki değişim incelenmiştir. Patojenin düşük sıcaklıklarda (15°C ve 25°C) nemli periyotların uzun sürmesi durumunda yüksek ürün kayıplarına neden olacağı öngörülmektedir. Yüksek sıcaklıklarda (25°C ve 30°C) patojenin protein içeriği azalmakla beraber *in vitro* ortamda gelişimini sürdürmüştür. İleride kuraklığa ve sıcaklığa karşı geliştirilecek dayanıklı bitkiler için patojenin bu yönünün dikkate alınması gerektiği düşünülmektedir.

#### 4.5. Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Patojen funguslar enfeksiyon stratejisi olarak bitkinin hücre duvarlarını tahrip edebilen enzimler salgılamaktadır. Yalnızca canlılar tarafından sentezlenebilen protein yapısında olan enzimler, hücre içerisinde meydana gelen tepkimeleri düzenleyen biyolojik katalizörlerdir (Dikilitaş ve ark., 2018). Fungusların gelişimi ve savunma mekanizmaları üzerinde önemli bir etkiye sahiptirler (Poussereau ve ark., 2001). Bu enzimler endopolygalakturonazlar, selülazlar, pektin liyaz, ksilanaz,  $\beta$ -galaktosidaz ve proteazlardır. Patojen salgıladığı bu enzimler sayesinde bitki dokuları arasında gelişimini kolaylaştırır (Hegedus ve Rimmer, 2005).

Proteazlar bitki-patojen etkileşiminde önemli bir konuma sahiptir. Birçok enfekteli bitki dokularında proteaz enzimleri tespit edilmiştir. Proteazların önemli virülens faktörleri arasında yer aldığı bilinmektedir (Rollins, 2003). Başka bir yönüyle de proteazlar, bitkilerdeki savunma mekanizmasını harekete geçiren bir sinyal görevi gördüğü düşünülmektedir. Bu bakımdan normal değerlerinin altında ya da üstünde çıkan sonuçlar fungusun savunma ve virülenslik mekanizması hakkında önemli bir değere sahiptir (Dikilitaş ve ark., 2010).

Patojenin proteaz miktarını belirlemek için yapılan analiz sonucunda  $P < 0.05$  düzeyinde anlamlı bulunamamıştır. Proteaz miktarı sıcaklık değişimlerinden genel anlamda etkilenmiştir. Sıcaklık grupları karşılaştırıldığında ise fungus 15°C ve 30°C derecede daha yüksek proteaz üretmiştir. İzolatlar kıyaslandığında A4 izolatu proteaz aktivitesi bakımından (25°C-, 30°C) diğer izolatları geçmiştir. Aynı İzolat sıcaklıklar arttıkça proteaz seviyesi de artmış fakat 35°C' tamamen durmuştur. Farklı

sıcaklıklara maruz kalan patojenin proteaz değerlerindeki farklılıklar, patojen izolatlarının farklı sıcaklık değerlerine farklı tepkiler verdiğini ve proteazın bundan etkilendiğini göstermiştir (Çizelge 4.3). Patojenlerden salgılanan proteaz miktarı *in vitro* koşullarda ortam içeriğine pH ve sıcaklık değerlerine göre değişiklik göstermektedir (Cotton ve ark., 2002).

Yüksek sıcaklıklarda (30°C) patojen izolatlarının proteaz aktivitesinin olması patojen virülensliği hakkında önemli ipuçları vermektedir. Bu durum patojene ait bazı ırkların sıcaklığa adaptasyon yeteneği göstererek bitkileri enfekte edebilme potansiyeli olduğunu göstermektedir. Bu durum ileride geliştirilecek dayanıklı bitkiler ve alınacak kültürel önlemlerde değişiklikler yapılmasına ve uygulanacak pestisitlerin sıcaklık-doza kalibrasyonları için önemli bir gösterge olacağı gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı sıcaklıklara maruz kalan patojenin proteaz değerleri

<i>Z.tritici</i> İzolatları	A440 dak <sup>-1</sup> g protein <sup>-1</sup>				
	4C°	15C°	25C°	30C°	35C°
CU112StK239	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0
CU102StM34	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0
CU107StH110	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0
CU100StA4	0.10 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0

Veriler üç tekrerrün ortalaması olarak düzenlenmiştir

#### 4.6. Proline Değerlerinin Ölçümü

Farklı sıcaklık değerlerine maruz kalan fungusun biyokimyasal değişiklikleri izlemek amacı ile çeşitli parametreler alınmış, bu parametrelerden en önemlilerinden biri olan prolin ölçümü yapılmıştır. Bir amino asit olan prolin fungusta önemli bir stres göstergesi olduğundan, fungusun etkisinde kaldığı sıcaklık faktörüne karşı doğrudan belirleyici olmasa bile stresin seviyesi hakkında önemli ipuçları vermektedir (Karakaş Dikilitaş., 2013).

Patojen 4°C ve 30°C’de yüksek prolin seviyesi göstermekle beraber en yüksek oran 30°C’de ölçülmüştür. Söz konusu fungus 15°C ve 25°C’de ise düşük prolin seviyesi göstermiştir. Genel olarak patojenin, optimum sıcaklık değerlerinden uzaklaştıkça prolin miktarlarında artış meydana gelmiştir (Çizelge 4.4). İzolat A4, en düşük prolin değerini 25°C’de gösterirken, H110 izolatu, 30°C en yüksek prolin değerine ulaşılmıştır. Serbest bir amino asit olan prolin, stress koşullarında sitolojik pH’a etki ederek NAD/NADH oranının düzenlenmesini sağlar (Zhu ve ark., 2010). Fungal patojenler ozmatik dengeyi sağlayabilmek için daha fazla prolin biriktirirler (Kishor ve ark., 2005). Prolin osmotik ayarlamalar sağlayarak hücresel zarı sıcaklık stresine karşı koruyabilir. Hücresel asitliği azaltıp düşük sıcaklıkların verdiği hasarı azaltabilir (Sharma ve ark., 2006). Çalışmamızda prolin miktarındaki artışlar yukarıda sayılan prolinin özelliklerinden kaynaklandığı öngörülmektedir. Bu nedenle patojene ait prolin değerleri hem düşük hemde yüksek sıcaklıklarda artış gösterdiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı sıcaklıklara maruz kalan patojenin prolin değerleri

<i>Z. tritici</i>	$\mu\text{molg}^{-1}$				
	4C°	15C°	25C°	30C°	15C°
CU112StK239	5.40 ± 0.02	5.58 ± 0.03	5.22 ± 0.04	7.74 ± 0.03	0
CU102StM34	7.02 ± 0.03	5.04 ± 0.02	5.40 ± 0.03	7.56± 0.04	0
CU107StH110	13.5 ± 0.04	4.68 ± 0.03	5.40 ± 0.02	13.86 ± 0.03	0
CU100StA4	5.04 ± 0.04	4.68 ± 0.03	4.50 ± 0.02	6.66 ± 0.03	0

Veriler üç tekrerrün ortalaması olarak düzenlenmiştir

#### 4.7. Malonadialdehit (MDA) Değerlerinin Ölçümü

*Z. tritici*'nin MDA değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak ( $P<0.05$ ) anlamlı bulunmuştur. Fungus en yüksek MDA değerine 30°C ulaşmış, daha sonraki en yüksek değere 4°C'de ulaşmıştır. En düşük MDA değerlerine ise 25°C'de ulaşmıştır. Patojenin gelişimi için uygun olan sıcaklıklarda düşük çıkarken sıcaklık değerlerinin optimal değerlerden uzaklaşması durumunda MDA değerlerinde yükselme görülmüştür. Patojen izolatları arasında da MDA değerleri bakımından anlamlı bir fark oluşmuştur. H110 izolatı en yüksek MDA değerine 30°C ulaşmış en düşük değeri yine aynı izolat 25°C gerçekleştirmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı sıcaklıklara maruz kalan patojenin MDA değerleri

<i>Z.tritici</i> İzolatları	nmol g <sup>-1</sup>				
	4 °C	15 °C	25 °C	30 °C	35 °C
CU112StK239	4.28 ± 0.04 <sup>b</sup>	14.62 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.68 ± 0.01 <sup>a</sup>	5.14 ± 0.01 <sup>b</sup>	0
CU102StM34	10.80 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.37 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.02 <sup>a</sup>	12.25 ± 0.01 <sup>b</sup>	0
CU107StH110	5.72 ± 0.03 <sup>b</sup>	2.77 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.03 <sup>a</sup>	13.40 ± 0.02 <sup>b</sup>	0
CU100StA4	10.52 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.56 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.02 ± 0.02 <sup>a</sup>	7.74 ± 0.03 <sup>a</sup>	0

<sup>a</sup>Aynı harf grubu içinde yer alan değerler  $P<0.05$  seviyesinde istatistik olarak birbirlerinden farklı bulunmamıştır. <sup>b</sup>Veriler üç tekrerrün ortalaması olarak düzenlenmiştir

Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA, yağların bileşimlerindeki doymamış moleküllerin oksijenle yükseltgenmesi ile oluşan aldehit, keton, hidroksi asitler, keto asitler, alkoller gibi nihai bir üründür (Mittova ve ark., 2004). Lipid peroksidasyonu sıcaklık, ışık, nem gibi faktörler tarafından tetiklenebildiği gibi serbest radikaller de bu süreci başlatabilir (Thakur ve ark., 2005). Bu faktörlerin etkisinin artması daha fazla MDA sentezlenmesine neden olur (Yakıt ve Tuna, 2006). Bunlardan dolayı MDA seviyesi genellikle bir stres göstergesi olarak bilinir. MDA içeriği membran lipid peroksidasyonu hasarının bir göstergesidir. Çalışmamızda MDA seviyesinde oluşan değişim, patojenin sıcaklık değişimlerinden etkilendiğini gösteren önemli metabolitlerden biri olmuştur. Bu durum söz konusu patojenin

sıcaklıktan kaynaklanan stresin etkisini tolere etmek için biyokimyasal metabolitlerinde değişiklik meydana getirmekle MDA değerlerinde artış sağladığı şeklinde yorumlanmıştır (Çizelge 4.5).

#### 4.8. Fungal Etmenin Melanin Değerleri

Birçok organizmada önemli koruyucu roller üstlenen melanin ekstraksiyonu ve analizi Gadd (1982)'a göre gerçekleştirilmiştir. Çoğu mantar, fenolik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu ile oluşan koyu kahverengi ve siyah pigmentlerden oluşan melaninleri üretir. Melaninler bir örtü görevi görerek organizmayı sıcak-soğuk ve kuraklık stresi gibi çevresel faktörlere karşı korumada rol oynayabilen önemli bir pigmenttir. Ayrıca serbest radikaller, UV ve solar radyasyon gibi fiziksel etkilere karşı koruyucu bir görev üstlendiği bilinmektedir (Geng ve ark., 2008).

Melaninin bu özelliklerinden dolayı *Z. tritici*'nin farklı sıcaklık değerleri altında yapısında bulunan melanin miktarındaki değişim, analiz edilmiştir (Çizelge 4.6.). Melanin değerleri 15°C'de en düşük seviyede oluşmuştur ( $P \leq 0.05$ ). En yüksek melanin sentezi ise 30°C'de oluşmuştur. İzolatlar karşılaştırıldığında en yüksek melaninin 30°C'de H110 izolatu tarafından sentezlendiği görülmektedir. Düşük melanin sentezi 15°C'de A4 izolatu tarafından gerçekleştirilmiştir. Fungus kendisi için uygun sıcaklık değerlerinden uzaklaştıkça oluşan sıcaklık stresinden korunmak için yapısındaki melanin miktarını arttırma yoluna gittiği gözlemlenmiştir.

Kubo ve Furusawa (1991) bitkilerde antraknoza neden olan *Colletotrichum* türlerinde appressorium oluşumu ve penetrasyonu üzerine yaptıkları çalışmada appresoryal melanin sentezleyen ırkların daha dayanıklı olduğunu ve penetrasyon oluşturabildiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar *C. lagenarium*'un albino mutantlarıyla yaptıkları çalışmada melanin içermeyen appresoryanın konukçu bitkiye nüfuz edemediğini bildirmişlerdir.

Howard ve Valent (1996) pirinç bitkisinde hastalığa neden olan *Magnaporthe grisea*'nın bitkiye penetrasyonu ile ilgili çalışma yapmışlardır. Çalışmalarına göre appressoryumun aseksüel sporun bir germ tüpünden tek bir hücre olarak oluştuğunu

konukçu bitkiye teması sağlayan uç kısmı haricinde tamamen melanize bir yapıda olduğunu bildirmişlerdir.

Appressoryumun konukçu dokusuna temas eden kısmında melanin bulunmamasının, hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin salınmasına ve besinlerin alınmasına izin verdiği bildirilmiştir. Patojenik fungusların sentezlediği melanin, konukçu dokusunu istila etmek için gerekli olan turgor basıncının oluşmasına yardımcı olmaktadır (Tsuji ve ark., 2003).

Patojenin melanin sentezleyebilmesi, etmenin sıcaklık değişimlerine karşı adaptasyon sağlayarak virülenslik şiddetini sürdürebileceği öngörülmektedir. Patojen bu yönüyle 25°C'den yüksek sıcaklıklarda uygun nem periyotları oluştuğunda bu koşullara dayanıklı olarak geliştirilen bitkilerde enfeksiyon oluşturma potansiyeli olduğunu göstermektedir. Patojen yüksek sıcaklıklarda uygun nem koşullarının oluşmasını beklerken melanin sentezleyebilmesi yönüyle sıcaklık stresini azaltıp söz konusu bitkiler için tehlike oluşturmaya devam edeceği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4. 6. Patojeninin melanin değerleri

<i>Z.tritici</i> İzolatları	Δ Absorbans				
	4 °C	15° C	25°C	30 °C	35°C
CU112StK239	0.382 ± 0.06	0.354 ± 0.08	0.345 ± 0.01	0.401 ± 0.09	0
CU102StM34	0.502 ± 0.06	0.462 ± 0.08	0.334 ± 0.01	0.572 ± 0.09	0
CU107StH110	0.480 ± 0.06	0.403 ± 0.08	0.548 ± 0.01	0.578 ± 0.09	0
CU100StA4	0.392 ± 0.06	0.265 ± 0.08	0.331 ± 0.01	0.413 ± 0.09	0

Veriler üç tekrerrün ortalaması olarak düzenlenmiştir

#### 4.9. Patojene Ait Fiziksel Ve Biyokimyasal Parametrelerin Korelasyonu

*Z. tritici*'ye ait izolatlarının deneme boyunca uygulanan sıcaklık değerleri sonucunda yapısındaki fiziksel ve biyokimyasal değişimler arasındaki ilişki tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Buna göre patojenin fiziksel parametreleri ile biyokimyasal yapıları arasında anlamlı bir korelasyon ortaya çıkmıştır ( $P \leq 0.05$ ).

Genel olarak patojenisite ile sporulasyon, protein ve proteaz arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon elde edilmiştir. Patojenin sporulasyonu ile protein, prolin ve MDA değerleri arasında da pozitif korelasyon elde edilmiştir.

İzolatların patojenisitesi ile sporulasyonu arasında pozitif korelasyon ( $r=0.04$ ) oluşmuştur. Benzer şekilde etmenin patojenisite ile araştırılan biyokimyasal parametreleri arasında da pozitif yönde anlamlı korelasyon elde edilmiş ve en yüksek korelasyon patojenisite ile protein değerleri arasında oluşmuştur ( $r=0.8$ ). Patojene ait RGB/3 değerleri ile patojenisite arasında negatif yönde korelasyon elde edilmiştir ( $r = - 0.05$ ).

Melanin birçok fitopatojen mantarda, melanin, konidi ve hiflerin kalıcılığı ve appresoria ve perithecia oluşumunda rol oynar (Butler ve ark., 1998). Çalışmamızda, *Z. tritici* sporulasyon ile melanin içeriği arasında pozitif yönde korelasyon ( $r=0.14$ ) bulunmuştur, fakat ( $P \leq 0.05$ ) istatistiksel olarak bu değer anlamlı bulunmamıştır. Son zamanlarda, Bashyal ve ark. (2010) *B. sorokiniana*'ya bulaşan arpada melanin içeriğinin konidyogenez ile ilişkisini bildirmiştir. Dahası, konukçu patojen etkileşiminde melaninin rolü araştırılmasına ve biyosentetik yolunda yer alan genlerin tanımlanmasına ihtiyaç olduğunu öne sürmüşlerdir.

Benzer şekilde, Aggarwal ve ark. (2011) buğdayda kök çürüklüğüne neden olan *Bipolaris sorokiniana* izolatları ile yapmış oldukları çalışmada sporulasyon ile melanin içeriği arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir ( $r=0.7$ ). Patojenin farklı sıcaklık değerlerinde oluşan stresi azaltmak için biyokimyasal ve fiziksel parametrelerinde değişiklik yapmak suretiyle gelişimini sürdürdüğü gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.7. Patojene ait fiziksel ve biyokimyasal parametrelerin korelasyonu

Korelasyon	Patojenisie	Sporulasyon	(R,G,B)/3	Protein	Prolin	Proteaz	MDA	Melanin
Sporulasyon	0.04*							
(R-,G-,B)/3	-0.05*	-0.13						
Protein	0.76*	0.79*	-0.28					
Prolin	0.26	0.54*	0.13	0.03				
Proteaz	0.55*	0.59	0.10	0.58*	0.70*			
MDA	0.36	0.50*	0.05	0.43	0.84*	0.80*		
Melanin	0.40	0.14	-0.02	0.27	0.53*	0.46*	0.70*	

\* P<0.05 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur

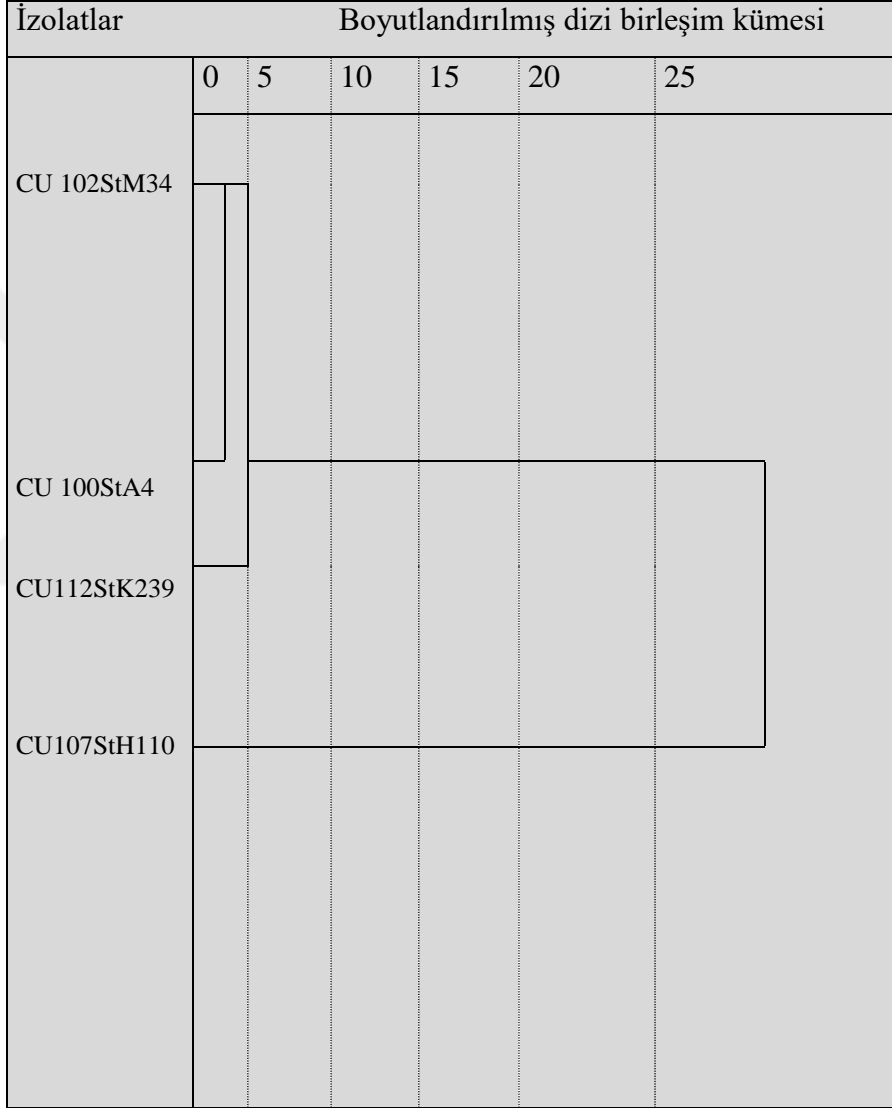
#### 4.10. Probit analizi ve Fenogram Grafiği

Biyolojik çalışmalarda regresyon analizleri her zaman doğrusal olamayacağından probit analizi ile fungus gelişimini engelleyen sıcaklık değerleri bulunmuştur. Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için ya da belli bir bağımlı değişken oranına ulaşmak için gerekli olan bağımsız değişken etkisinin tahmin edilmesine imkân sağlayan probit analizi, bir tür regresyon analiz yöntemidir.

Sıcaklık değerleri bakımından optimum sıcaklık tepkisi funguslar tarafından farklı algılandığından sıcaklık inhibisyonuna bağlı bir probit analizi gerçekleşmemiştir. Ancak bunun yerine fungus izolatlarının bütün kimyasal ve fiziksel özellikleri ele alınarak bir fenogram üretilmiş, bu izolatlardan farklı görünen izolatin biyokimyasal karakterizasyonu çıkarılmıştır. Şekil 4.7’de görüldüğü gibi Adana (A4), Mersin (M34) ve K.Maraş (K239) illerinden alınan izolatlar benzer biyokimyasal tepkiler verdiği için patojenin genetik orjini hakkında bazı bilgiler verebilir. Hatay’dan alınan H110 nolu izolat ele alınan özellikler bakımından diğer



izolatlardan ayrılmıştır. Bu izolatlardan genetik farklılığı ve orijinlerini doğru saptamak için daha fazla gen düzeyinde varyasyonlarına bakılması gerekmektedir (Ünal ve ark., 2017). İzolat H110'un fenogram grafiğinde diğer izolatlardan farklı konumda yer alması stres koşullarına karşı farklı bir virülenslik derecesine sahip olduğuna işaret edebilmektedir.



Şekil 4.7. İzolatlara ait fenogram grafiği

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

*Z. tritici* söz konusu sıcaklıklarda genellikle küçük koloni oluşturmuş ve koloni genişleme hızı oldukça yavaş olmuştur. Patojenin denemeye tabi tutulan izolatlarından hiç biri 35°C’de gelişmemiştir, inkubasyonun 10. gününden itibaren gelişmeleri tamamen durmuştur.

Denemelerde kullanılan sıcaklık değerleri araştırmacıların verileri ile paralellik göstermektedir. Düşük nem oranı, zamanla PDA ortamının özelliklerini kaybetmesi ve yüksek sıcaklıktan dolayı patojenin çeşitli enzim reaksiyonlarını gerçekleştirememesinden dolayı 35°C de etmenin gelişiminin durduğu düşünülmektedir. Canlandırma testi sonucunda fungus gelişmeye başlamıştır. Sadece sıcaklığın etkisini belirlemek için nem oranı sabit tutulmuştur. Aksi halde yüksek ve uzun nem peryotlarının uygulanması durumunda 35°C’de de gelişimin sağlanacağı öngörülmektedir.

Kültür ortamlarındaki katkı maddeleri *Z. tritici*’de spor üretimi üzerinde etkili bir faktördür. Kültür ortamlarının içeriklerine ek olarak sıcaklık, ışık, pH gibi diğer etkenlerde spor üretiminden etkilenmektedir.

Patojenin farklı izolatlarının kapladığı alan ile içerdiği konidi sayısında farklılıklar olmakla beraber. Genel olarak yayıldığı alan arttıkça konidi içeriği de artmaktadır. İzolatlar karşılaştırıldığında ise en yüksek yayılma alanı sağlayan A4 izolatu en fazla miselyal gelişim oluşturmuştur.

Fungal etmenin *in vitro*’da düşük sıcaklıklarda açık renkli tonlar meydana getirirken sıcaklık değerlerinin artmasıyla daha yüzeysel ve koyu renkler oluşturduğu görülmektedir. Bu durum fungusun sıcaklık değişimleri karşısında biyokimyasal

yapılarında meydana getirdiği değişimler ile strese karşı oluşturduğu savunma mekanizmalarının bir sonucu olarak düşünülmektedir. Düşük sıcaklıklarda (4°C ve 15°C) fungus maya benzeri miselyal bir büyüme oluştururken, sıcaklığın artmasıyla iğne benzeri koyu makro ve mikrosporlar oluşturarak geliştiği gözlenmiştir.

Patojenin, optimum sıcaklık değerlerinden (25°C) uzaklaştıkça söz konusu izolatların prolin miktarlarında artış meydana gelmiştir (Çizelge 4.4). Patojene ait A4 izolatı, en düşük prolin değerini 25°C gösterirken, H110 izolatı tarafından 30°C en yüksek prolin değerine ulaşılmıştır.

Sıcaklıkların yükselmesi patojenin protein içeriğinde azalmaya neden olmuştur. Fungus, en yüksek protein içeriğine 15°C'de ulaşmıştır. En düşük protein miktarı ise 30°C'de gözlemlenmiştir. Bununla birlikte gruplar karşılaştırıldığında (Tukey's Testi), 4°C ve 15°C'deki gruplarda bulunan protein miktarları 25°C ve 30°C'de bulunan gruplardan daha yüksek çıkmıştır. Fungus izolatlarından, M34 izolatının protein miktarı diğer izolatlardan daha yüksek çıkmıştır. M34 izolatı bu yüksek değerlere 15°C'de ulaşmıştır.

Fungus en yüksek MDA değerine 30°C ulaşmış, daha sonraki en yüksek değere 4°C'de ulaşmıştır. En düşük MDA değerlerine ise 25°C'de ulaşmıştır. Patojenin gelişimi için uygun olan sıcaklıklarda düşük çıkarken sıcaklık değerlerinin optimal değerlerden uzaklaşması durumunda MDA değerlerinde yükselme görülmüştür. Patojen izolatları arasında da MDA değerleri bakımından anlamlı bir fark oluşmuştur. M34 izolatı en yüksek MDA değerine 30°C ulaşmış en düşük değeri yine aynı izolat 25°C gerçekleştirmiştir.

Patojenin proteaz miktarı sıcaklık değişimlerinden genel anlamda etkilenmiştir. Sıcaklık grupları karşılaştırıldığında ise fungus 15°C ve 30°C derecede daha yüksek proteaz üretmiştir. İzolatlar kıyaslandığında A4 izolatı proteaz aktivitesi bakımından (25- ve 30°C) diğer izolatları geçmiştir. Aynı İzolat sıcaklıklar arttıkça proteaz seviyesi de artmış fakat 35°C'de tamamen durmuştur. Farklı sıcaklıklara maruz kalan patojenin proteaz değerlerindeki farklılıklar, patojen izolatlarının farklı sıcaklık

değerlerine farklı tepkiler verdiğini ve proteazın bundan etkilendiğini göstermiştir (Çizelge 4.3). Patojenlerden salgılanan proteaz miktarı *in vitro* koşullarda ortam içeriğine pH ve sıcaklık değerlerine göre değişiklik göstermektedir (Zhan ve ark., 2013).

Melanin değerleri 15°C’de en düşük seviyede oluşmuştur ( $P \leq 0.05$ ). En yüksek melanin sentezi ise 30°C’de oluşmuştur. İzolatlar karşılaştırıldığında en yüksek melaninin 30°C’de H110 izolatı tarafından sentezlendiği görülmektedir. Düşük melanin sentezi 15°C’de A4 izolatı tarafından gerçekleştirilmiştir. Fungus kendisi için uygun sıcaklık değerlerinden uzaklaştıkça oluşan sıcaklık stresinden korunmak için yapısındaki melanin miktarını artırma yoluna gittiği gözlemlenmiştir.

Sıcaklık etkilerine maruz kalan fungusun izolatları arasında incelenen parametrelerde farklılıklar oluşmuştur. Oluşan bu farklılıklar patojenin virülensliği üzerinde de etkili olmuştur. Bu çalışmayla paralel olarak *Z. tritici* izolatların hem populasyonlar içinde hem de populasyonlar arasında virulenslik açısından büyük farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (Ahmed ve ark. 1996).

Ortalama fungus gelişimi, birim alandaki spor yoğunluğu ve *in vitro* büyüme hızının, niceleyici konakçı-patojen etkileşiminde agresifliğin bir göstergesi olarak kullanılabilceği, bitki patolojisinde önemle tartışılmaktadır (Belisario ve ark., 2002). Hızlı büyüyen ve gelişen patojen suşları, bitki patolojileri sisteminde daha fazla hastalık üretebileceği bildirilmiştir (Suffert ve ark., 2011).

## 5.2. Öneriler

Bu çalışmanın, buğday alanlarında ürün kayıplarına neden olan *Zymoseptoria tritici* ile ilgili yapılacak yeni çalışmalara kaynak sağlayacağı umulmaktadır. Patojenin laboratuvar ortamında farklı sıcaklık değerlerine karşı tepkisi araştırılmıştır. Söz konusu etmenin bu koşullardaki fizyolojik ve biyolojik yapılarındaki değişimi belirlenmiştir. Ana konukçusu buğday, ikincil konukçuları ise arpa ve çayır bitkileri olan *Z. tritici* için alternatif kontrol mekanizmalarının oluşturulmasına yardımcı olacaktır.

Elde edilen bulgular sunucunda, *Z. tritici*'nin farklı sıcaklık değerlerine göstereceği tepkiler belirlenerek, fungal etmenin abiotik strese karşı dayanıklılığı ortaya konarak ileride sıcaklık ve diğer stress koşullarına karşı dayanıklılığı geliştirilecek bitkilerin potansiyel fungal etmene karşı durumları belirlenmiştir.

Patojenler de bitkilerle aynı stres koşullarına karşı aynı veya benzer savunma mekanizmaları gerçekleştirir. Fizyolojik veya yapılarındaki biyokimyasal değişimler ile bu olumsuz abiotik koşullara karşı koyarak bitkileri enfekte etmeye devam ederler. Bitkilerde strese neden olan koşullar bazen patojenin virülensliğini artırmakta bazen de etkisiz hale getirmektedir.

Söz konusu patojenin bitkilerin maruz kaldığı stres koşullarındaki biyokimyasal yapılarındaki değişimler ileride bu koşullara dayanıklı olarak geliştirilecek bitkiler için kaynak sağlayacaktır. Stres koşullarındaki patojenin göstereceği biyokimyasal davranışlar belirlendiğinde, bu patojene karşı daha etkili koruma metotlarının geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Dolayısı ile bu çalışma ile patojen izolatlarının sıcaklıklara tepkisi biyokimyasal olarak ölçülerek patojenin izolatları arasındaki biyokimyasal farklar ortaya çıkarılmış ve virulenslik derecesi belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- AGGARWAL, R., BANERJEE, S., SHARMA, S., GUPTA, S. and BASHYAL, B. M., 2011. Association of melanin content with conidiogenesis and virulence in *Bipolaris Sorokiniana*. J. Wheat Res. 3(1) : 29-32.
- AGRIOS, G.N., 2005. Plant pathology. Elsevier Academic Press, USA, 922 pp.
- AHMED, H.U., MUNDT, C.C., HOFFER, M.E. and COAKLEY, S.M., 1996. Selective influence of wheat cultivars on pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). Phytopathology, 86:454-458.
- ALLIOUI, N., SIAH, A., BRİNİS, L., REİGNAULT, P. and HALAMA, P., 2014. Mating type distribution provides evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Algeria. Can. J. Plant Pathol., 36:475-481.
- ARUN, G., EYİNİ, M. and GUNASEKARAN, P., 2015. Characterization and biological activities of extracellular melanin produced by *Schizopyllum commune*. Indian Journal of Experimental Biology, 53:380-387.
- BASHYAL, R., CHAND, C., KUSHWAHA, D., SEN, L. PRASAD, C. and JOSHI, A.K., 2010. Association of melanin content with conidiogenesis in *Bipolaris Sorokiniana* of barley (*Hordeum vulgare* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(2): 309-316.
- BELİSARİO, A, MACCARONİ, M., CORAZZA, L., BALMAS, V. and VALİER, A., 2002. Occurrence and Etiology of Brown Apical Necrosis on Persian (English) Walnut Fruit. Plant Dis., 86:599- 602.
- BATES, L.S., WALDREN, R.P. and TEARE, I.D., 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies. Plant Soil. 39:205–207.
- BOIS, G., BERTRAND, A., PİCHÉ, Y., FUNG, M. and KHASA, D. P., 2006. Growth, compatible solute and salt accumulation of five mycorrhizal fungal species grown over a range of NaCl concentrations. Mycorrhiza, 16: 99-109.
- BORA, T. ve KARACA, I., 1970. Bitki Hastalıkları Sürveyi. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı, Yayın No: 167, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova. 43s.
- BUTLER, M.J. and DAY, A.W., 1998. Fungal melanins: a review. Canad. J. Microbiol, 44: 1115-1136.
- BREMER, H., 1938. The Causal Agent of Fusarium Basal Rot of Onion. *Tarım Bilimleri Dergisi (Journal of Agricultural Sciences)*, 19 (2) :178-187.
- BREMER, H., İSMEN, H., KAREL, G., OZKAN, H. and ÖZKAN, M., 1948. Contributions to the knowledge of the parasitic fungi of Turkey Part III. Journal article Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul, 13(1):1-53.
- CHAND, R., YADAV, O.P., BASHYAL, B.M., PRASAD, L.C. and JOSHI, A.K., 2012. Technique for the maintenance of heterokaryotic isolates of *Bipolaris sorokiniana* under ordinary conditions. Indian Phytopath, 65:2-6.
- CHUNGU, C., GİLBERT, J. and TOWNLEY, S.F., 2001. *Septoria tritici* blotch development as affected by temperature, duration of leaf wetness, inoculum concentration, and host. Plant Dis, 85:430-435.

- COOKE, B.M., GARETH, J., 2009. The effect of near ultraviolet irradiation and agar medium on the sporulation of *Septoria nodorum* and *S. tritici*. Transactions of the British Mycological Society, 5:221-226.
- COTTON, P., RASCLE, C. and FEVRE, M., 2002. Characterization of PG2, an early endo PG produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, expressed in yeast. FEMS Microbiology Letters, 213(2): 239-244.
- CUNFER, B. M. and UENG, P.P., (1999). Taxonomy and identification of *Septoria* and *Stagonospora* species on small grain cereals. Annu. Rev. Phytopathol, 37:267-284.
- DEBONA, D., RODRÍGUES, F., Á., RÍOS, J.A. and NASCIMENTO, K.J.T., 2012. Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. Phytopathology, 102:1121-1129.
- DHILLON, B., GILL, N., HAMELİN, R.C. and GOODWIN, S.B., 2014. The landscape of transposable elements in the finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. BMC Genomics, 15:11-32.
- DİKİLİTAŞ, M., OĞUZ, A.Ç. and KARAKAYA, A., 2018. Extracellular protease activity and glucose production in isolates of net blotch pathogens differing in virulence. Zemdirbysite-Agriculture, 105(1): 89-94.
- DİKİLİTAŞ, M. and KARAKAŞ, S., 2012. Behaviour of Plant Pathogens for Crops under Stress during the Determination of Physiological, Biochemical and Molecular Approaches for Salt Stress Tolerance. Crop Production for Agricultural Improvement (Eds. Muhammad Ashraf), Springer Publ., 16: 417-441.
- DİKİLİTAŞ, M. and KARAKAŞ, S., 2010. Salt as Potential Environmental Pollutants, Their Types, Effects on Plants, and Approaches for Their Phytoremediation. Plant Adaptation and Phytoremediation (Edited by M. Ashraf, M. Ozturk, M.S.A. Ahmad). Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 357-383.
- DİKİLİTAŞ, M., 2003. Effect of salinity & its interactions with *Verticillium albo-atrum* on the disease development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Lucerne (*Medicago Sativa* & *M. Media*) Plants. Ph.D. Thesis, University Of Wales, Swansea.
- DUNAEVSKİĬ, Y.A.E., MATVEEVA, A.R., FATKHULLĬNA, G.N., BELYAKOVA, G.A, KOLOMIETS, T.M., KOVALENKO, E.D. and BELOZERSKY, M. A., 2007. Extracellular proteases of mycelial fungi as participants of pathogenic process. Research Institute of Phytopathology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Received July 2-19 July Moscow, Russia 4-34 pp.
- EYAL, Z., SCHAREN, A. L., PRESCOTT, J. M. and VAN GĬNKEL, M., 1987. The Septoria diseases of wheat: Concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico, 52 pp.
- EYAL, Z., SCHAREN, A.L., HUFFMAN, M.D. and PRESCOTT, J.M., 1985. Global in sights into virulence frequencies of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*, 75:1456-1462.
- FİNCİ, S. ve YILMAZ DEMİR, Y., 1982. Buğdaylarda Yaprak leke hastalığı etmeni (*Septoria tritici* Rob.et.Desm.)'nin yapay üretim ve uygun inokulasyon yöntemlerinin saptanması üzerinde çalışmalar. Bitki Koruma Bül., 22 (1): 21-40.

- GADD, G.M., 1982. Effect of media composition and light on colony differentiation and melanin synthesis in *Microdochium bollei*. Trans. Br. Mycol. Soc., 78:115-122.
- GENG, J., YU, S.B., WAN, X., WANG, X.J., SHEN, P., ZHOU, P. and CHEN, X.D., 2008. Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. J Biochem Biophys Methods, 70(6):1151-1155.
- GIRARD, C. and MICHAUD, D., 2001. Validation of methyl malondialdehyde as internal standard for malondialdehyde detection by capillary electrophoresis Analytical Biochemistry, 308 388-391.
- GOODWIN, S.B., BAREK, M.S.B., DHILLON, B., WITTENBERG, A.H., CRANE, C.F. and HANE, J.K., 2011. Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispen some structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. Plos Genetics, 7:1-17.
- GREEN, G.J. and DICKSON, J.G., 1957. Pathological histology and varietal reactions in Septoria leaf blotch of barley growth of two ectomycorrhizal fungi, *Tricholoma caligatum* and *Morchella angusticeps*. Mycologia Balcanica, 5:115-118.
- GUO, J.R. and VERREET, J.A., 2008. Formation and Germination of *Septoria tritici* Secondary Conidia as Affected by Environmental Factors. Journal of Phytopathology, 156: 635-637.
- HAN, Y., LIU, X., BENNY, U., KISTLER, H.C. and VANETTEN, H.D., 2001. Genes determining pathogenicity to pea are clustered on a super numerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca*. Plant J., 25: 305-314.
- HAO, Z., CHRISTIE, P., QIN, L., WANG, C. and LI, X., 2007. Control of *Fusarium* Wilt of Cucumber Seedlings by Inoculation with an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. Journal of Plant Nutrition, 28:1961-1974.
- HATTA, R., ITO, K., HOSAKI, Y., TANAKA, T., TANAKA, A., YAMAMOTO, M., AKIMITSU, K. And TSUGE, T., 2002. A Conditionally Dispensable Chromosome Controls Host-Specific Pathogenicity in the Fungal Plant Pathogen *Alternaria alternata*. Genetics, 161( 1): 59-70.
- HECKMAN, J.R., 1998. Corn stalk rot suppression and grain yield response to chloride. Journal of Plant Nutrition, 21:149-55.
- HEGEDUS, D.D. and RIMMER, S.R., 2005. *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? FEMS Microbiology Letters, 251:177-184.
- HESS, D.E. and SHANER, G., 1987. Effect of moisture and temperature on devolepment of *Septoria tritici* blotch in wheat. Pyhtopatlogy ,77:215-219.
- HOWARD, R.J. and VALENT, B., 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. Annu Rev Microbiol, 50:491-512.
- İREN, S. 1962. Tarla Bitkileri Hastalıkları. Ayyıldız Matbaası, Ankara, 3-94s.
- KALTEH, M., ALIPOUR, Z.T., ASHRAF, S., ALIABADI, M.M. and NOSRATABADI, A.F., 2014. Effect of Silica Nanoparticles on Basil (*Ocimum basilicum*) under Salinity Stress. Journal of Chemical Health Risks, 4:49-55.
- KARAKAŞ DİKİLİTAŞ, S., 2013. Farklı Tuz Seviyelerindeki Topraklarda Yetiştirilen Domatesin Gelişimi Ve Bazı Fizyolojik Özellikleri İle Toprak



- İyileştirilmesi Üzerine Arkadaş Bitkilerin Etkileri. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Şanlıurfa, 315s.
- KEMA, G.H.J. and ANNONE, J.G., 1991. In vitro production of pycnidia by *Septoria tritici*. Neth J PlantPathol, 97:65-72.
- KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C. and STALPERS, J.A., 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi. CABI Publishing, Cambridge.
- KISHOR, K., SANGAM, S., AMRUTHA, R.N., SRİ LAXMİ, P. and NAİDU, K.R., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants. Current Science, 88(3): 424-438.
- KUBO, Y. and FURUSAWA, I., 1991. Melanin Biosynthesis. The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. Springer, Boston. 540pp.
- KURT, Ş., 2016. Bitki Fungal Hastalıkları. Akademisyen Kitap Evi, İstanbul, 214s.
- KURT, Ş. And TOK, F.M., 2006. Influence of inokulum concentration, leaf age, temperature and duration on leaf wetnes on *Septoria Blight* of *parsley*. Crop Protection, 25: 556-561.
- MACCHERONİ, W., WELİNGTON, JR., ARAÚJO, L. and AZEVEDO J.L., 2000. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), 61(3):298-302.
- MARKEVİCIUS, V., 1996. New data on the fungi of *Septoria* Fr. Genus in *Lithuania*. Botanica Lithuanica, 2: 49-63.
- MEDİNİ, M. and HAMZA, S., 2008. Pathotype and Molecular Characterization of *Mycosphaerella graminicola* Isolates Collected from Tunisia, Algeria and Canada. Journal of Plant Pathology, 90 (1): 65-73.
- MEHRABİ, R., BEN M'BAREK, S., VAN DER LEE, T.A., WAALWIJK, C., DEWİT, P.J. and KEMA, G.H., 2009. Proteins regulate the cyclic AMP pathway that is required for development and pathogenicity of the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. Eukaryot. Cell, 8: 1001-1013.
- MITTOVA, V., GUY, M., TAL, M. and VOLOKITA, M., 2004. Salinity up-Regulates the Antioxidative System in Root Mitochondria and Peroxisomes of Wild Salt-Tolerant Tomato Species *Lycopersicon pennellii*. Journal of Experimental Botany, 55(399):1105-1113.
- MOTTERAM, J., LOVEGROVE, A., PİRİE, E., MARSH, J., DEVONSHİRE, J., MEENE, A. and KOSACK, K.H., 2011. Aberrant proteinN-glycosylation impacts upon infection-related growth transitions of the haploid plant-pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. Molecular Microbiology, 81(2): 415-433.
- PAPER, J.M., SCOTT C.J.S., ADHİKARİ, N.D., CUOMO, C.A. and WALTON, J.D., 2007. Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. Proteomics, 7(17):3171-3183.
- PUNİTHALİNGAM, E. and WHEELER, B.E.J.,1965. *Septoria* spp. occurring on species of *Chrysanthemum*. Transactions of the British Mycological Society, 48(3): 423-439.
- POUSSEREAU, N., CRETON, S., GRAND, G.B., RASCLE C. and FEVRE, M., 2001. Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid protease expressed during pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. Microbiology, 147: 717-726.

- RODRÍGUEZ, R.J., REDMAN, R.S. and HENSON, J. M., 2004. The Role of Fungal Symbioses in the Adaptation of Plants to High Stress Environments. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 9( 3): 261-272.
- ROLLİNS, J.A., 2003. The *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* Gene Is Required for Sclerotial Development and Virulence. The American Phytopathological Society, 16(9):785-795.
- SAİDİ, A., ESLAHİ, M.R. and SAFAİE, N., 2012. Efficiency Of Septoria Tritici Sporulation On Different Culture Media. Trakia Journal of Sciences, 10(3):15-18.
- SAYDAM, C., ÖĞÜT, M. ve ÇOPCU, M., 1974. Ege bölgesinde yetiştirilen Meksika kaynaklı buğdayların hastalıklarla ilgisi ve kuru tohum ilaçlamasının sürme gücüne etkisi üzerinde çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni, 14:151-180.
- SELÇUK, F., ERDOĞDU, M., AKGÜL, H. ve HÜSEYİN, E., 2009. The genus *Septoria Sacc.* in Turkey. Mycopath, 7(1): 21-28.
- SAİRAM, R. K. and SAXENA, D. C., 2000. Oxidative Stress and Antioxidants in Wheat Genotypes: Possible Mechanism of Water Stress Tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science, 184(1):55-61.
- SHARMA, S.S. and DİETZ, K.J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress, Journal of Experimental Botany, 57( 4) 711-726.
- SİDHU, Y.S., CHAUDHARİ, Y.K., USHER, J., CAİRNS, T.C., CSUKAİ, M. and HAYNES, K., 2015. A suite of gateway compatible ternary expression vectors for functional analysis in *Zymoseptoria tritici*. Fungal Genet. Biol., 79:180-185.
- STEİNERG, G., 2015. Cell biology of *Zymoseptoria tritici* Pathogen cell organization and wheat infection. Fungal Genetics and Biology, 79:17-23.
- STUKENBROCK, E.H., BATAİLLON, T., DUTHEİL, J.Y., HANSEN, T.T., Lİ, ZALA, R., M., MCDONALD, B.A., WANG, J. and SCHİERUP, M.H., 2011. The making of a new pathogen, in sights from comparative population genomics of the domesticated wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* and its wild sister species. GenomeRes, 21: 2157-2166.
- SUFFERT, F. and SACHE, I., 2011. Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. Plant Pathology, 60:878-889.
- THAKUR, M. and SHARMA, A.D., 2005. Salt-Stress Induced Proline Accumulation in Germinating Embryos: Evidence Suggesting a Role of Proline in Seen Germination. Journal of Arid Environments, 62: 517-523.
- TORRİANİ, S.F.F., BRUNNER, P.C., MCDONALD, B.A. and SİEROTZKİ, H., 2009. Qo Iresistance emergedin dependently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. PestManage. Sci., 65:155-162.
- TSUJİ, W., MEK, A., INANAGA, S. and SUGİMOTO, Y., 2003. Growth and gas exchange of three sorghum cultivars under drought stress. Biomedical and Life Sciences, 46(4):583-587.
- ÜNAL, G., 2015. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Buğdayda Septorya Yaprak Lekesi (*Septoria Tritici* Rob. Ex. Desm.)'Nin Yaygınlığının Belirlenmesi Ve Patojenin Moleküler Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 54s.

- ÜNAL, G., KAYIM, M., AY, T., YONES, A.M., 2017. Evaluation of disease intensity and molecular identification of *Zymoseptoria tritici* causing Septoria leaf blotch on wheat in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41:405-413.
- ANONİM, 2017. Uluslararası Tahıl Konseyi (IGC). 28 Eylül 2017 Raporu, Londra, İngiltere.
- VALUEVA, T.A. and MOSOLOV, V.V., 2004. Role of Inhibitors of Proteolytic Enzymes in Plant Defense against Phytopathogenic Microorganisms. *Biochemistry (Moscow)*, 69(11): 1305-1309.
- WAWRA S., DJAMEİ, A., ALBERT I, N.U., RNBERGER, T. and KAHMANN, R., 2013. In vitro translocation experiments with RxLR-reporter fusion proteins of Avr1b from *Phytophthora sojae* and AVR3a from *Phytophthora infestans* fail to demonstrate specific autonomous uptake in plant and animal cells. *Mol Plant Microbe Interact*, 26: 528-536.
- WIESE, R.A., 1987. Compendium of Wheat Diseases. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA, 43-45pp.
- YAKIT, S. ve TUNA, A.L., 2006. Tuz stresi altındaki mısır bitkisinde (*Zea mays* L.) stres parametreleri üzerine Ca, Mg ve K'un etkileri. *Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(1):59-67.
- ZHAN, F., XIE, Y., ZHU, W., SUN, D., MCDONALD, B.A. and ZHAN, J., 2016. Linear correlation analysis of *Zymoseptoria tritici* aggressiveness with in vitro growth rate. *Phytopathology*, 106:1255-1261.
- ZHAN, J. and MCDONALD, B. A. 2013. Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. *Annu. Rev. Phytopathol*, 51:131-153.
- ZHU, X.C., SONG, F.B. and XU, H.W., 2010. Arbuscular mycorrhizae improves low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis. *Plant and Soil*, 331(1):129-137.

## ÖZ GEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Nevzat KILINÇ  
**Uyruğu** : TC  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 05.04.1983 Adıyaman  
**Telefon** : 0544 639 38 32  
**e-Mail** : nvzt1298@gmail.com

### EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Anadolu Lisesi, Merkez-Adıyaman	2003
Üniversite	: Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Merkez-Şanlıurfa	2009
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Merkez-Şanlıurfa	2018

### İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2011	Adıyaman Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü	Ziraat Mühendisi
2016	Adıyaman Sincik İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü	Ziraat Mühendisi

### UZMANLIK ALANI

Bitki Koruma Fitopatoloji

### YABANCI DİLLER

İngilizce